

Université des Sciences et Technologies de Lille

N° d'ordre:

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE I

Discipline: Science de la Vie et de la Santé - Immunologie

Franck REMOUE

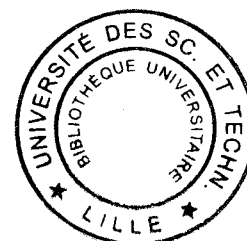
REPOSE IMMUNE SPECIFIQUE A UN CANDIDAT VACCINAL

CONTRE LA SCHISTOSOMIASE: DE L'EVALUATION

IMMUNO-EPIDEMIOLOGIQUE A L'ESSAI CLINIQUE

INSERM U167

Institut Pasteur de Lille



Présentée et soutenue publiquement le 5 juin 2000 devant le jury composé de:

Madame le Professeur G. SPIK

Président

Monsieur le Professeur A. CAPRON

Directeur de thèse

Monsieur le Docteur J.-P. CHIPPAUX

Rapporteur

Monsieur le Docteur O. GARRAUD

Rapporteur

Monsieur le Docteur G. RIVEAU

Examineur

Madame le Docteur B. VENNERVALD

Examineur

*A ma mère, à mon père,
Je vous dois tout*

*A mes amis,
Pour votre fidélité*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur André CAPRON

Je souhaite témoigner de mon plus profond respect et de ma sincère reconnaissance. Je vous exprime mes plus vifs remerciements pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut Pasteur de Lille et pour m'avoir permis de travailler à St-Louis du Sénégal. Merci pour votre soutien régulier et pour toute la confiance que vous m'avez témoignée depuis mon arrivée. C'est une chance de commencer une carrière de chercheur dans votre laboratoire et merci pour l'honneur que vous me faites d'être le directeur de ma thèse.

A Madame le Professeur Geneviève SPIK

Vous avez acceptée avec enthousiasme de présider le jury de la soutenance de ma thèse. Je vous en remercie très vivement.

A Monsieur le Docteur Jean-Philippe CHIPPAUX

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce manuscrit et pour les discussions enrichissantes que nous avons eu lors de nos rencontres . J'espère vivement travailler de nouveau avec vous dans les années à venir.

A Monsieur le Docteur Olivier GARRAUD

Vous vous êtes proposé avec enthousiasme d'être rapporteur de cette thèse. Je vous en remercie vivement. Merci également pour votre soutien au cours de la rédaction de ce manuscrit et pour votre collaboration sénégalaise si précieuse.

A Madame le Docteur Birgitte VENNERVALD

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour l'honneur que vous me faites de juger l'ensemble de ce travail. Merci pour votre enthousiasme professionnel que j'ai pu apprécier lors de nos brèves rencontres.

A Monsieur de Docteur Gilles RIVEAU

Comment pourrais-je trouver des mots alignés en quelques phrases pour exprimer tout le respect et la gratitude que j'ai pour toi? Depuis près de 7 ans, j'ai eu la chance de te connaître, de travailler avec toi et d'être entouré de ton enthousiasme qui m'a fait me surpasser de jour en jour. Je ne te serais jamais assez reconnaissant pour la confiance que tu m'as témoignée et pour toutes les responsabilités que tu m'as confiées. Tu "donnes" tellement aux personnes qui t'entourent que c'est un devoir et un véritable plaisir de te "le rendre". Je souhaite à tout jeune chercheur de découvrir une certaine vision de la recherche auprès de toi. Merci.

A Madame le Professeur Monique CAPRON

Je tiens à vous exprimer mon profond respect et toute ma reconnaissance pour votre soutien et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Merci également pour votre enthousiasme communicatif.

Je tiens à remercier les **Docteurs Jean-Claude Mani et Martine Pugnère** pour m'avoir accueilli chaleureusement dans leur laboratoire à Montpellier et pour leur collaboration fructueuse.

Un grand merci au **Docteur Helen Guyatt** pour sa compétence statistique et ses encouragements réguliers.

L'essai clinique BILHVAX de Phase 1a fut une aventure inoubliable pour moi. Je tiens à remercier particulièrement le **Professeur Christian LIBERSA** pour sa disponibilité ainsi que toutes les infirmières du Centre d'Investigation Clinique de Lille pour leur organisation.

J'ai passé de formidables années au sein de l'Unité 167 grâce aux personnes que j'ai pu y rencontrer:

En particulier, un gigantesque merci à **Anita**, ma "maman de labo", pour ton soutien moral de tous les jours et à **Manu** pour ton amitié de longue date. Il est bon d'avoir des amis comme vous.

Je souhaite à tout le monde de rencontrer une personne comme **Jean-Pierre**. Merci pour ta joie de vivre et : "ne t'en vas pas".

A **Manu** le parisien. Tu nous manques beaucoup depuis que tu es partis. Merci pour les moments passés ensemble.

J'ai pu partager l'enthousiasme que j'ai pour mon travail avec **Véronique**. Merci à toi, Véro, pour ta bonne humeur et ta "pêche".

Merci à Catherine (...eeee!), pour nos discussions africaines et ton caractère si agréable.

Un grand merci également: à **Karine**, soeurette de DEA depuis le premier jour, à **Josette** pour tes conseils et ta sympathie; à **Jeff** pour tes petits mots dans le couloir, à **Ricardo** pour ton humour brésilien, à **Jean-Loup** pour ton aide informatique, à **Jamal** pour ce congrès qui m'a permis de te connaître et à **Jean-Marc** pour tes photos et ta rougeur de joue.

Je tiens à remercier particulièrement le personnel de la laverie sans qui tout travail de recherche ne peut être mené à bien. Merci à **Danièle, Nicole, Patricia, Marie-Andrée et Myriam**. Vous soulevez toujours une "vague" d'enthousiasme quand vous passez dans notre laboratoire.

Merci également à l'équipe de l'animalerie et en particulier à **Francis Lepage** et **Pierre Billaut**.

Un très grand merci aux secrétaires de l'U167 pour leur accueil et pour tous les services rendus et aux bibliothécaires sympathiques pour leur indispensable organisation. Merci à **Charlotte, Pilou, Monique, Claudine, Jacklyn** et **Chantal**.

L'utilisation d'antigènes parasitaires était nécessaire à notre travail. Je remercie donc les membres du laboratoire de production et plus particulièrement **Anita, Suzanne, Isabelle** et **Michèle**.

Quel plaisir quotidien de passer quelques minutes en compagnie de nos gestionnaires de charme! Le week-end, vous nous manquez! Merci de tout coeur à **Nadine** et **Maria** ("les filles") pour les nombreux services de dernière minute que vous m'avez rendus, pour votre écoute et tout simplement pour vos personnalités si attachantes.

Un grand merci à **Isabelle** pour ta façon de "voir la recherche" et pour nos collaborations enrichissantes. Par ta franchise, tu es un exemple pour les jeunes chercheurs.

Merci à **Olivier-Steven** pour son calme imperturbable et pour nos discussions bilharziennes.

J'ai eu la chance de travailler sur le terrain à St-Louis du Sénégal où j'ai appris énormément au contact des personnes du programme ESPOIR, toutes animées d'un véritable esprit d'équipe. C'était un réel plaisir de travailler dans cette ambiance caractéristique de ce pays.

Un énorme merci à toi, **François**. Tu m'as fait découvrir tellement de choses là-bas et notamment le travail sur le terrain. Merci à toi et à **Hilde** pour votre accueil dès le premier jour, pour votre soutien moral dans les moments difficiles et pour votre amitié. Avec vous, c'est vraiment "la famille".

A **Jean-Pierre**, oh toi oh grand chef. Merci pour ta sérénité communicative et pour ton "Y'a pas de problème!". Je regrette vraiment de ne pas avoir travaillé quotidiennement avec toi mais j'espère que notre aventure commune continuera pendant longtemps.

A **Tine** et à **Guindo**, les compères inséparables aux personnalités si complémentaires. Le travail du programme ESPOIR serait difficile sans votre compétence. Un énorme merci pour nos discussions qui m'ont permis de mieux comprendre le sens de notre travail. Merci à toi, **Tine**, pour les moments passés en ta compagnie dans le village de Guidakhar.

A **Philippe**, pour les trop courts mois passés ensemble à St-Louis. Merci de m'avoir fait découvrir l'aspect médical de la bilharziose et pour ton amitié. Mais l'histoire de notre travail commun ne fait que commencer!

Un grand merci aux personnes du laboratoire de Sor où on se sent vraiment comme chez soi. A toi, **Nicole**, pour ton professionnalisme, ta droiture et ton soutien. Le laboratoire de Sor a bien changé depuis que tu en es responsable! Merci à toi, Sophie, pour nos grandes discussions sénégalaises et pour ta façon de "voir les choses". A **Denis** et à **Nicolas**, vous avez activement participé à ce travail, je vous en remercie vivement. Merci à **Denis** pour ta confiance et à **Nicolas** pour ton enthousiasme. Merci à **Edith** pour le soin quotidien de ton travail.

A **Aïda**, à **Mère-Marie** et à **Moussa** pour votre aide et en souvenir de l'aventure de Guidakhar.

A **Dick**, pour nos réunions dans ton bureau qui sont un moment privilégié pour moi. J'ai hâte de travailler de nouveau avec toi.

Merci au **Professeur Jozeph VERCYUSSE** pour ta disponibilité et ta collaboration qui est à la base de mon travail. Merci également pour tes invitations si enrichissantes à Gand.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon respect à **Monsieur le Docteur Malick NIANG** et à **Monsieur le Docteur A. LY**. Merci également pour votre accueil chaleureux à chacune de mes visites.

Je souhaite particulièrement remercier les habitants et les chefs des villages de Guidakhar, d'Ourou-Madiou et de N'Dioungue M'Beresse pour leur "Téranga" inoubliable. Je me souviendrais pendant longtemps des paroles prononcées un soir par le chef du village d'Ourou-Madiou. Cette sagesse fut une véritable leçon de vie.

Enfin, j'en viendrais au groupe Immunopharmacologie Vaccinale que j'ai vu évoluer au cours de ces années en gardant continuellement l'âme d'une équipe solidaire, ouverte et incroyablement dynamique. Merci pour ces années qui furent un enrichissement énorme pour moi, à la fois professionnel et humain.

A **Odile**, pour ton esprit vif et ton aide fréquente.

A **Nathalie I.**, qui m'a encouragée à commencer ce sujet de thèse.

A **Nathalie M.**, pour ton calme impressionnant et ta joie de vivre qui reflète tellement ta personnalité.

A **Cath**, pour ta gentillesse communicative et ta bonne humeur à toute épreuve.

A **Zabeth**, pour ton expérience qui apporte beaucoup au groupe.

A **Sylvie**, la petite nouvelle. Jour après jour, tu apportes ta pierre à "l'esprit IPV".

A **Mohamed**, ta sympathie et ton sens de l'humour n'ont pas été oubliés.

A **Luc**, nous reparlerons de ton passage pendant longtemps. Merci pour ta participation à notre travail et pour nos discussions pathologiques.

A **Benoît**, un très grand merci pour tes corrections anti-javanaises et pour l'intérêt que tu as souvent porté à mon travail. J'espère avoir l'occasion de travailler plus directement avec toi dans un avenir proche. Merci également pour tous ces fou-rires partagés.

A **Jan**, merci pour ton soutien régulier et ton aide dans mon travail. Ton professionnalisme m'a beaucoup apporté et merci pour ta confiance. Travailler avec toi ne peut aboutir qu'à la réussite.

A **Lolo**. Tu as été un élément moteur dans la construction de "l'esprit IPV". Merci pour ton amitié et pour nos moments de folie. Depuis ton départ, nous n'entendons plus les animaux mais tu es toujours présent. On ne rencontre pas tous les jours quelqu'un comme toi!

A **Maxou**, la teigne. Mille merci pour ton aide précieuse et ton soutien moral au cours de cette thèse. Ta vivacité d'esprit et ta clairvoyance ont largement contribué à l'aboutissement de mon travail. Merci également pour nos longues discussions sénégalaises et ces nombreux instants de délires. Il fut très important pour moi de partager avec toi cette même passion pour notre travail.

Gilles, je tiens de nouveau à te remercier tout simplement pour ce que tu es. Même si tu penses le contraire, c'est toi qui instaure cette âme fantastique qui caractérise le groupe IPV et le programme ESPOIR. Ton écoute des autres et ton humanisme font de toi une personne rare, capable de trouver la force et le courage pour "soulever des montagnes". Merci pour ton amitié fidèle et pour toutes les discussions extra-professionnelles qui m'ont fait "grandir".

Enfin, à **Anne-Marie**. Je ne pourrais jamais assez te remercier pour ton soutien amical de tous les jours et ton professionnalisme exemplaire. Le travail réalisé au cours de cette thèse est un travail commun effectué dans un esprit de confiance mutuelle nécessaire à toute réussite. Je te dédie donc cette thèse. Je souhaite à tout thésard d'avoir un jour la chance de travailler avec toi. Très sincèrement, merci pour tout.

***Publications et
Communications personnelles***

Publications:

Publications concernant le sujet de la thèse:

- **F. Remoué**, F. Rogerie, M.C. Gallissot, H. L. Guyatt, J.L. Neyrinck, M.M. Diakkhate, M. Niang, A. E. Butterworth, C. Auriault, A. Capron and G. Riveau. Gender-dependent neutralizing antibodies response to *Schistosoma mansoni* 28GST vaccinal antigen in infected human population. 2000. *J. Infect. Dis.* 181: 000-000

- **F. Remoué**, D. To Van, A.M. Schacht, M. Picquet, O. Garraud, J. Vercruysse, A. Ly, A. Capron and G. Riveau. Gender-dependent specific immune response during chronic human schistosomiasis. *soumis*.

- **F. Remoué**, J.C. Mani, M. Pugnère, A.M. Schacht, A. Capron and G. Riveau. Specific binding of testosterone to *Schistosoma* 28GST protein inhibits the Glutathione S-Transferase enzymatic activity. *en préparation*

- G. Riveau, O. Poulain-Godefroy, L. Dupré, **F. Remoué**, N. Mielcarek, C. Locht and A. Capron. Glutathione S-transferases of 28kDa as a major vaccine candidates against schistosomiasis. 1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.93: 87-94.

Autres publications:

- **F. Remoué**, O. Poulain-Godefroy, N. Mielcarek, R. Pierce, A. Capron, C. Locht and G. Riveau. Local transient Production of inflammatory cytokines after intranasal administration of recombinant *Bordetella pertussis*. 1997. *Microb. Pathogenesis*. 22: 305-313.

- N. Mielcarek, G. Riveau, **F. Remoué**, A. Capron and C. Locht. Attenuation increases immunogenicity of live *Bordetella pertussis* vaccine for homologous and heterologous vaccine. 1998. *Nature Biotech.* 16: 454-457.

- O. Poulain-Godefroy, N. Mielcarek, N. Ivanoff, **F. Remoué**, A.M. Schacht, N. Phillips, C. Locht, A. Capron and G. Riveau. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin enhances the immunogenicity of liposome-delivered antigen administered intranasally. 1998. *Infect. Immun.* 66 : 1764-1767

- M. Marguerite, M.C. Gallissot, M. Diagne, C. Moreau, M.M. Diakkhate, M. Roberts, **F. Remoué**, A. Thiam, C. Decam, F. Rogerie, F. Cottrez, A.E. Butterworth, R.F. Sturrock, J.P. Piau, B. Daff, M. Niang, I. Wolowczuk, G. Riveau, C. Auriault and A. Capron. Cellular immune responses of a Senegalese community recently exposed to *Schistosoma mansoni* : Correlations of infection level with age and inflammatory cytokine production by soluble egg antigen-specific cells. 1998. *Trop. Med. Intern. Health.* 4 : 530-543

- F. Rogerie, **F. Remoué**, P. Desreumaux, J. L. Neyrinck, S. Tin, S. Guindo, M. Niang, C. Cellier, A. Capron and G. Riveau. Causes of diarrhea in an area of high exposure to *Schistosoma mansoni* in Senegal. 1997. *Med. Trop.* 57 : 361-363.

- O. Roye, N. Delhem, F. Trottein, **F. Remoué**, S. Nutten, J. P. Declavel, M. Delacre, V. Martinot, J. Y. Cesbron, C. Auriault and I. Wolowczuk. Dermal endothelial cells and keratinocytes produce interleukin-7 in vivo after human *Schistosoma mansoni* percutaneous infection. 1998. *J. Immunol.* 161: 4161-4168.

- Ph. Bonnard, N. Kalach, J.F. Cadranel, **F. Remoué**, G. Riveau and A. Capron. Manifestations digestives et hépatiques de la bilharziose. *Gastro-enterol. Clin. Biol. sous presse.*

- Ph. Bonnard, R. Lanuit, J.P. Dompnier, **F. Remoué**, A. Diop, A. Ly, A. Capron and G. Riveau. Critères échographiques prédictifs d'hypertension portale due à *Schistosoma mansoni* dans une zone d'endémie récente. *soumis.*

Communications orales:

- **F. Remoué**, A. Capron and G. Riveau. Age-dependent acquired immune responses to *Schistosoma* 28GST vaccinal antigen. Cours "Modern Approaches to Epidemiology and the Control of Infectious Diseases". 1997 (Septembre). Department for Continuing Education. *University of Oxford* - U.K.
- **F. Remoué**, F. Rogerie, M.C. Gallissot, J.L. Neyrinck, M. Niang, A. Capron and G. Riveau. Age-dependent acquired immune response to *S. mansoni* 28GST in recently infected population : relationship between inhibition of enzymatic activity and infection level. 1997 (19-24 Octobre). International Symposium on Schistosomiasis : National meeting on Schistosomiasis. *Belo Horizonte, Brazil*.
- **F. Remoué**, N. Milliard, D. Tovan, M.C. Gallissot, A. Capron et G. Riveau. Evolution chez l'homme de la réponse immune spécifique à l'antigène vaccinal *S. haematobium* 28GST en fonction de l'âge et du sexe. 1998 (06-07 Février). Congrès de la "Société Ouest Africaine de Parasitologie". *Dakar, Senegal*.
- **F. Remoué**, A. Capron et G. Riveau. Evolution chez l'homme de la réponse immune spécifique à l'antigène vaccinal *S. haematobium* 28GST. 1998 (05-07 Mai). Séminaires des "Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie médicale". *Mont St-Odile, France*.
- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, M. Picquet, O. Garraud, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Régulation de la réponse immune Th3 spécifique à l'antigène vaccinal *S. haematobium* 28 GST en fonction du sexe de patients chroniquement infectés. 1998 (04 Novembre). Formation Doctorales en Immunologie. *Université Libre de Bruxelles, Belgique*.
- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, M. Picquet, O. Garraud, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Mise en évidence d'une réponse immune de type Th3 chez les femmes chroniquement infectées par *S. haematobium*. 1998 (25-27 November). Congrès annuel de la "Société Française d'Immunologie". *Paris, France*.
- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, M. Picquet, O. Garraud, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Regulation of Th subsets during Human Schistosomiasis : Evidence of a gender-dependent Th3 specific immune response». 1999 (09-15 Janvier). "Type 2 cytokines in allergy and helminth infections". Keystone Symposia. *Lake Tahoe, USA*
- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, F. Rogerie, M.C. Galissot, M. Picquet, O. Garraud, J. Vercruysse, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Schistosomiase humaine : évolution de la réponse immune en fonction du sexe. 1999 (26 Juin). 1^{er} congrès de la "Société Sénégalaise d'Immunologie". *Dakar, Sénégal*.

- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, M. Picquet, O. Garraud, J. Vercruysse, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Gender-dependent regulation between Th3 and Th1 specific immune response during human schistosomiasis. 1999 (25-30, Septembre). "Cytokines, Hormones and Immunity" European Research Conference. *Castelvecchio Pascoli*, Italie.
- F. Remoué**, A. Capron and G. Riveau. Human Schistosomiasis : regulation of specific immune response according to sex of infected individuals. Invité par le Prof. E. Heinen. 1999 (15 Novembre). *Université de Liège*, Belgique.
- **F. Remoué**, M. Hervé, N. Charrier, D. De Clerck, A.M. Schacht, S. Pillet, J-P. Dompnier, J. Vercruysse, Ly, A. Capron et G. Riveau. Réponse immune spécifique à l'antigène vaccinal Sh28GST chez des enfants infectés par *Schistosoma haematobium* : influence de la co-infection par *S. mansoni* ou par *Plasmodium falciparum*. 1999 (24-26 Novembre). Congrès annuel de la "Société Française d'Immunologie". *Lille*, France.
- **F. Remoué**, A. Capron and G. Riveau. Antigen-dependent immune response : Special case of *Schistosoma* 28GST antigen. 1999 (10-12 Decembre). 2^{ème} congrès du "Schistosomiasis Vaccine Network". Rio de Janeiro, Brésil

Posters:

- M. Marguerite, M.C. Gallissot, M. Diagne, E. Bassene, **F. Remoué**, C. Auriault, G. Riveau, M. Niang, A.E. Butterworth and A. Capron. Analysis of the immune status of *S. mansoni* infected individuals in northern Senegal. 1995 (10-13 Avril). The year of L. Pasteur international symposium (Etiology and pathogenesis of infectious disease). *Dakar*, Senegal.
- **F. Remoué**, O. Poulain-Godefroy, N. Mielcarek, R. Pierce, A. Capron, C. Lochet et G. Riveau. Production transitoire de cytokines inflammatoires après l'administration intranasale d'une souche recombinante de *Bordetella pertussis*. 1996 (18 Septembre). "Journée des jeunes chercheurs". *Institut Pasteur de Lille*, France.
- **F. Remoué**, O. Poulain-Godefroy, N. Mielcarek, R. Pierce, A. Capron, C. Lochet et G. Riveau. Production transitoire de cytokines inflammatoires après l'administration intranasale d'une souche recombinante de *Bordetella pertussis*. 1997 (09 Janvier). Colloque Institut Pasteur de Lille - Université Libre de Bruxelles. *Bruxelles*, Belgique.
- N. Mielcarek, G. Riveau, **F. Remoué**, A. Capron and C. Lochet. Toxin deletion increased immunogenicity of live *Bordetella pertussis* vaccine used for homologous and heterologous protection. 1997 (10-13 Avril). 28 th Annual Meeting of Scandinavian Society for Immunology. *Geilo*, Norway.

- **F. Remoué**, N. Milliard, M.C. Gallissot, A. Capron et G. Riveau. Evolution chez l'homme de la réponse immune spécifique à l'antigène vaccinal *S. haematobium* 28GST en fonction de l'âge et du sexe. 1997 (26-28 Novembre). Congrès annuel de la "Société Française d'Immunologie". *Marseille, France*.

- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, M. Picquet, O. Garraud, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Mise en évidence d'une réponse immune de type Th3 chez les femmes chroniquement infectées par *S. haematobium*. 1998 (25-27 Novembre). Congrès annuel de la "Société Française d'Immunologie". *Paris, France*.

- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, M. Picquet, O. Garraud, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Regulation of Th subsets during Human Schistosomiasis : Evidence of a gender-dependent Th3 immune response to protective antigen. 1999 (09-15 Janvier). "Type 2 cytokines in allergy and helminth infections" Keystone Symposia. *Lake Tahoe, USA*.

- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, F. Rogerie, M.C. Galissot, M. Picquet, O. Garraud, J. Vercruysse, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Schistosomiase humaine : évolution de la réponse immune en fonction du sexe. 1999 (04 Mai). "Journée des jeunes chercheurs". *Institut Pasteur de Lille, France*.

- **F. Remoué**, D. ToVan, A.M. Schacht, M. Picquet, O. Garraud, J. Vercruysse, A. Ly, A. Capron et G. Riveau. Gender-dependent regulation between Th3 and Th1 specific immune response during human schistosomiasis. 1999 (25-30 Septembre). « Cytokines, Hormones and Immunity » European Research Conference. *Castelvecchio Pascoli, Italy*.

- **F. Remoué**, M. Hervé, N. Charrier, D. De Clerck, A.M. Schacht, S. Pillet, J-P. Dompnier, J. Vercruysse, Ly, A. Capron et G. Riveau. Réponse immune spécifique à l'antigène vaccinal Sh28GST chez des enfants infectés par *Schistosoma haematobium* : influence de la co-infection par *S. mansoni* ou par *Plasmodium falciparum*. 1999 (24-26 Novembre). Congrès annuel de la "Société Française d'Immunologie". *Lille, France*.

I.4) Le diagnostic	34
I.4.1) Méthodes indirectes non spécifiques	34
I.4.1) Méthodes spécifiques	35
I.5) Les moyens de lutte contre les schistosomiasés	37
I.5.1) L'éducation pour la santé et les mesures d'hygiène	37
I.5.2) Lutte contre l'hôte intermédiaire	38
I.5.3) La chimiothérapie anti-bilharzienne	39
I.5.3.a) <i>Les médicaments:</i>	39
I.5.3.b) <i>Une synergie entre le PZQ et les réponses immunes de l'hôte</i>	41
I.5.3.c) <i>Les limites de la chimiothérapie</i>	41
II) Les schistosomiasés dans la vallée du Fleuve Sénégal : une endémie particulièrement dramatique	44
II.1) La Région du Fleuve Sénégal	46
II.2) L'infection bilharzienne avant la mise en service du barrage de Diama	47
II.3) L'évolution dramatique des schistosomiasés depuis 1988	48
II.3.1) L'apparition de l'infection à <i>S. mansoni</i> :	48
II.3.2) L'augmentation de l'infection à <i>S. haematobium</i>	49
II.3.3) Le développement rapide et dramatique des pathologies	50
II.4) Etat actuel de l'endémie	51
II.5) Le programme ESPOIR : un programme de lutte contre les bilharziosés dans la vallée du Fleuve Sénégal	54
II.5.1) L'organisation du programme ESPOIR	55
II.5.2) Les réalisations	55

III) Réponse immunitaire au cours de la schistosomiase	58
III.1) Immunité innée	58
II.2) Réponse immune spécifique dans les modèles expérimentaux	59
II.2.1) L'immunité concomitante	59
II.2.2) Réponse cellulaire spécifique	60
III.2.3) Réponse cellulaire et granulome bilharzien	62
III.3) Réponse immune spécifique au cours de l'infection humaine	64
III.3.1) Notions d'immunologie chez l'homme	64
III.3.1.a) <i>Isotypes et cytokines</i>	64
III.3.1.b) <i>Profils Th1 et Th2</i>	66
III.3.2) Immunité spécifique au cours de la schistosomiase humaine	68
III.3.2.a) <i>Un consensus : la balance IgE/IgG4</i>	69
III.3.2.b) <i>La controverse pour les autres isotypes</i>	71
III.3.2.c) <i>Réponse cellulaire dans la schistosomiase humaine</i>	75
III.3.2.d) <i>Immunité et prédisposition génétique</i>	78

IV) Stratégies vaccinales contre les schistosomiasés	79
IV.1) Objectifs de la vaccination contre les schistosomiasés	80
IV.2) Approches classiques	82
IV.2.1) BCG	82
IV.2.2) Cercaires irradiées	82
IV.2.3) Extraits parasitaires	83
IV.3) Antigènes recombinants	84
IV.4) Les antigènes 28GST: de la découverte aux essais cliniques	88
IV.4.1) Historique	88
IV.4.2) Les 28GST : caractéristiques et fonctions	88
IV.2.a) Différences avec les GST d'autres espèces	88
IV.2.b) Les 28GST des différentes espèces de schistosome	89
IV.2.c) Expression et fonctions au cours des stades parasitaires	90
IV.4.3) Immunogénicité:	91
IV.4.3.a) Mise en évidence des épitopes majeures dans les modèles animaux	91
IV.4.3.b) Réponse immune anti-28GST dans les populations infectées	93
IV.4.4) Efficacité vaccinale des antigènes 28GST	94
IV.4.4.a) Efficacité sur différents stades parasitaires	94
IV.4.4.b) Vectorisation de l'antigène vaccinal	98
IV.4.5) Bilhvax : les premiers essais cliniques contre la schistosomiase	102
IV.4.5.a) Etude préclinique de toxicologie de la préparation vaccinale Bilhvax	103
IV.4.5.b) Les essais cliniques chez l'homme	104
Objectifs généraux	107

RESULTATS	109
I) Réponse immune spécifique à la Sh28GST acquise au cours de l'infection par <i>S. haematobium</i> : variations en fonction de l'âge et du sexe.	110
I.1) Population étudiée et paramètres d'infection	110
I.2) Profil de la réponse isotypique spécifique en fonction de l'âge	113
I.3) Réponse isotypique anti-Sh28GST en fonction du sexe	115
I.4) Réponse cellulaire spécifique à la Sh28GST : analyse du profil de production des cytokines après stimulation <i>in vitro</i>	117
I.4.1) Réponse IgG3 et production de cytokines spécifique: 16-34 ans	117
I.4.2) Réponse IgA et production de cytokines spécifique : ≥ 35 ans	119
I.5) Reconnaissance hétérologue de la 28GST de <i>S. mansoni</i>	124
I.6) <u>Résumé et discussion</u> : effet de l'âge et du sexe sur le profil de la réponse immune spécifique à la Sh28GST	125
I.6.1) Variation en fonction de l'âge	125
I.6.2) Variation en fonction du sexe : association entre les réponses anticorps et la production <i>in vitro</i> des cytokines :	126
I.6.3) Effet des hormones sexuelles dans l'orientation de la réponse immune spécifique ?	134

II) Influence des hormones sexuelles: Liaison à la Sh28GST	138
et effet sur l'orientation de la réponse immune spécifique	
II.1) Dosage des hormones sexuelles dans le sérum des patients	138
infectés par <i>S. haematobium</i> :	
II.2) Liaisons spécifiques entre les hormones sexuelles et la Sh28GST:	143
effet sur l'activité enzymatique GST	
II.2.1) Liaisons spécifiques entre la Sh28GST et les hormones sexuelles	144
II.2.2) Liaisons entre les hormones et les peptides majeurs de la Sh28GST	147
II.2.3) Effet des hormones sexuelles sur l'activité enzymatique de la Sh28GST	150
II.2.4) <u>Résumé et discussion</u> : les liaisons Sh28GST-hormones sexuelles	153
pourraient elles jouer un rôle dans le développement du parasite?	
II.3) Réponse immune anti-Sh28GST induite après immunisation	157
chez la souris : effet du sexe et régulation par l'estradiol	
II.3.1) Profil de la réponse anticorps anti-Sh28GST en fonction du sexe	157
II.3.2) Effet <i>in vivo</i> de l'estradiol sur la réponse IgA anti-Sh28GST	160
II.4) <u>Discussion</u> : hormones sexuelles et Sh28GST	162
III) Réponses IgG3 et IgA spécifiques aux 28GST :	164
rôle dans l'immunité protectrice?	
III.1) Population étudiée et résultats parasitologiques	164
III.2) Réponse anticorps anti-Sm28GST : variation en fonction	165
du sexe et de l'intensité d'infection.	
III.3) Réponses IgG3 et IgA dirigées contre les peptides N et C	168
terminaux impliqués dans le site enzymatique de la Sm28GST	
III.4) <u>Résumé et discussion</u> : Importance et spécificité épitopique des	172
réponses IgG3 et IgA anti-Sm28GST dans l'immunité protectrice	

IV) Effet du traitement par le praziquantel sur l'orientation de la réponse immune spécifique à la Sh28GST	175
IV.1) Population étudiée et paramètres d'infection	176
IV.2) Effet du traitement par le PZQ sur la réponse humorale anti-Sh28GST: population totale	177
IV.3) Effet du traitement par le PZQ sur les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST en fonction du sexe	179
IV.4) Effet du traitement et de la réexposition sur les réponses IgG3 et IgA spécifiques des peptides N et C terminaux en fonction du sexe	184
IV.5) Effet du traitement sur la réponse immune anti-Sh28GST influence à long terme?	187
IV.6) <u>Résumé et discussion</u> : traitement par le PZQ et maturation de la réponse immune spécifique	188
V) Réponse immune spécifique aux 28GST chez les enfants infectés: Effet du traitement par le praziquantel et influence de co-infections parasitaires	193
V.1) Effet du traitement par le PZQ sur la réponse immune anti-Sh28GST chez des enfants infectés par <i>S. haematobium</i>	194
V.2) Effet d'une co-infection bilharzienne sur la réponse immune anti-28GST chez les enfants infectés	196
V.2.1) Influence de la co-infection par <i>S. haematobium</i> sur la réponse immune anti-Sm28GST	196
V.2.2) Influence de la co-infection par <i>S. mansoni</i> sur la réponse immune anti-Sh28GST	199

V.3) Réponse immune anti-Sh28GST chez des enfants : influence de la co-infection par <i>Plasmodium falciparum</i> .	201
V.4) <u>Résumé et discussion</u> : Maturation de la réponse immune anti-28GST chez les enfants infectés	204
V.4.1) Effet du traitement au PZQ chez les enfants	205
V.4.2) Maturation différente selon le type de co-infections?	207
VI) Essai clinique "Bilhvax" de Phase 1a :	212
Résultats d'immunogénicité	
VI.1) Protocole de l'étude	213
VI.2) Réponse humorale spécifique induite après administrations:	215
VI.2.1) Résultats après deux administrations	215
VI.2.2) Effet d'une troisième administration	218
VI.3) Réponse cellulaire spécifique induite après administrations	221
VI.3.1) Lymphoprolifération après stimulation par la Sh28GST	221
VI.3.2) Production des cytokines spécifique de la Sh28GST	221
VI.4) Reconnaissance de la Sh28GST native et des GST des différentes espèces de schistosomes par les anticorps induits après immunisation	223
VI.4.1) Inhibition de l'activité enzymatique GST de vers adultes	223
VI.4.2) Inhibition de l'activité enzymatique des différentes 28GST de schistosomes	225
VI.5) <u>Résumé de discussion</u> : Profil et fonctionnalité de la réponse immune induite après administration de la Sh28GST	227
VI.5.1) Profil de la réponse immune induite	227
VI.5.2) Capacité fonctionnelle de la réponse immune induite	232

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	235
I) Immunité anti-schistosome au cours de l'infection humaine: particularité de la réponse immune spécifique aux 28GST?	236
I.1) Réponses anti-28GST et anti-Ag totaux : évolution différente au cours de l'infection?	237
I.1.1) Réponse immune anti-28GST et profil Th2	237
I.1.2) Immunité anti-parasitaire en fonction du sexe	239
I.2) Antigène spécifique : particularité de la 28GST?	240
II) Maturation de la réponse immune anti-28GST	243
II.2) Au cours de l'infection	243
II.2.1) Balance IgG3/IgA	243
II.2.2) Maturation de la réponse immune spécifique : vers l'isotype IgA?	244
II.2) Après administration de la Sh28GST	246
II.2.1) Profil de la réponse immune spécifique : essai clinique de phase I	246
II.2.2) Administrations du candidat vaccinal chez les individus infectés	248
III) Orientation de la réponse immune spécifique : influence des hormones sexuelles	252
III.1) Influence des hormones sur la production des cytokines	252
III.2) Liaison entre les hormones sexuelles et la Sh28GST : rôle dans l'orientation de la réponse immune spécifique?	256
III.2.1) Influence des hormones sexuelles : rôle de la Sh28GST?	257
III.2.2) Orientation de la réponse épitopique par les hormones?	261

Conclusion générale 264

Bibliographie 268

Annexes 289

Résumés

Abréviations

a.a	acide aminé
Ac	anticorps
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ag	antigène
Alun	hydroxyde d'aluminium
APC	Antigen Presenting Cell
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CAA	Circulating Anodic Antigen
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DO	Densité Optique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPG	Eggs Per Gram
ESPOIR	European Special Program for Operational and Integrated Research
FU	Filtration Urinaire
GSH	Glutathion
GST	Glutathion <i>S</i> -Transferase
HTP	HyperTension Portale
Ig	Immunoglobuline
IFN α	Interferon gamma
IL	Interleukine
kDa	kilo Dalton
LPS	LipoPolySaccharide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PZQ	praziquantel
Sb28GST	Glutathion <i>S</i> -Transferase de 28 kDa de <i>Schistosoma bovis</i>
Sh28GST	Glutathion <i>S</i> -Transferase de 28 kDa de <i>Schistosoma haematobium</i>
Sj26GST	Glutathion <i>S</i> -Transferase de 26 kDa de <i>Schistosoma japonicum</i>
Sj28GST	Glutathion <i>S</i> -Transferase de 28 kDa de <i>Schistosoma japonicum</i>
Sm28GST	Glutathion <i>S</i> -Transferase de 28 kDa de <i>Schistosoma mansoni</i>
SEA	Soluble Egg Antigens
SWAP	Soluble Worm Antigen Preparation
TGF β	Transforming Growth Factor beta
Th	cellules T auxiliaire (T helper)
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Cadres du travail

Laboratoire d'accueil:

Le travail présenté au cours de cette thèse a été réalisé au sein de l'Unité INSERM U167, à l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction du Prof. André CAPRON et plus particulièrement sous la responsabilité du Dr. Gilles RIVEAU, dans le groupe d'ImmunoPharmacologie Vaccinale.

Depuis de nombreuses années, l'équipe du Prof. André Capron s'attache à mieux comprendre les relations cellulaires et moléculaires complexes entre le parasite schistosome et son hôte. Les travaux menés dans ce sens ont aboutit à la caractérisation de protéines parasitaires prometteuses dans l'élaboration d'un vaccin contre les schistosomiasis. En particulier, l'immunisation avec les enzymes de la famille des Glutathion *S*-Transferases (GST) des différentes espèces de schistosomes a montré une grande efficacité de protection dans de nombreux modèles animaux. Cette vaccination permet non seulement de réduire la charge vermineuse mais principalement de neutraliser la fécondité des vers ce qui aboutit à la prévention de la pathologie bilharzienne.

Afin de confronter les données expérimentales et les observations épidémiologiques de "terrain", les réponses immunes humorale et cellulaire spécifique à la Sm28GST ont été évaluées chez des populations infectées par *S. mansoni* au Kenya, au début des années 1990. Ces études montraient que la réponse immune anti-Sm28GST pouvait participer à l'acquisition d'une résistance à la réinfection. En revanche, aucune étude concernant la réponse immune spécifique à la Sh28GST (GST de 28 kDa de *S. haematobium*) n'avait été réalisée chez des populations infectées.

Les très nombreux résultats acquis au laboratoire ont conduit en 1998 à la mise en place des premiers essais cliniques contre la schistosomiase, nommés BILHVAX. Dans un premier temps, l'objectif était de tester l'innocuité et l'immunogénicité du candidat vaccinal Sh28GST chez des volontaires sains (Phase 1a; Centre d'Investigation de Lille) puis chez des enfants non infectés mais vivant en zone d'endémie (Phase 1b; Programme ESPOIR, St-Louis du Sénégal). L'Institut Pasteur de Lille, représenté par le Prof. A. CAPRON, était l'investigateur principal de la Phase 1a et le promoteur de la Phase 1b. Le Dr. Gilles RIVEAU a coordonné la mise en place et la réalisation de ces deux essais et la Phase 1b a été monitoré par le Dr. J. DE BONT. J'ai eu le privilège de participer activement à ces deux essais cliniques en travaillant à l'élaboration des protocoles et au suivi des études d'immunogénicité. Les résultats très encourageants, tant d'un point de vue de l'innocuité que de l'immunogénicité, obtenus au cours de ces Phases 1 nous ont permis d'envisager la réalisation des Phases II chez des individus infectés.

L'objectif de cette thèse s'inscrit donc dans la démarche d'une stratégie vaccinale contre les schistosomiasés. Plus particulièrement, notre objectif est d'évaluer la réponse immunitaire spécifique au candidat vaccinal Sh28GST chez des populations infectées. La composante "terrain" de mon travail de thèse a été réalisée au Laboratoire d'Immunologie Cellulaire de Sor à St-Louis du Sénégal dans le cadre du Programme ESPOIR (programme de lutte contre les bilharzioses dans la vallée du Fleuve Sénégal), dirigé par le Médecin-Chef de la Région Médicale de St-Louis, le Dr. M. NIANG puis le Dr. A. LY. J'ai eu l'opportunité de commencer cette thématique de recherche à St-Louis en 1995 en tant que Coopérant au Service Nationale puis d'être responsable des études immuno-épidémiologiques menées dans le laboratoire de Sor depuis 1996. Cette responsabilité a fait l'objet de l'encadrement de Denis To Van, Nicolas Milliard et Maxime Hervé, coopérants rattachés au Laboratoire de Sor (1996-2000).

Les études immunologiques de notre travail étaient intégrées aux études épidémiologiques réalisées par l'équipe du prof. J. VERCRUYSSSE et organisées notamment par le Dr. M. PICQUET puis le Dr. D. DE CLERCQ.

Collaborations

Nos études immuno-épidémiologiques n'auraient pas pu être réalisées sans la collaboration précieuse de l'Institut Pasteur à Dakar, et en particulier avec le Prof. O. GARRAUD qui a assuré notamment la formation en immunologie cellulaire des coopérants du laboratoire de Sor.

Il était important d'évaluer la réponse immunitaire spécifique à la Sh28GST chez des populations infectées mais vivants dans d'autres foyers que ceux du Sénégal. Ceci a pu être réalisé en collaboration avec le Dr. Denis BOULANGER du CERMES (Centre de Recherche sur les Méningites et les Schistosomoses; dirigé par le Dr. J.P. CHIPPAUX) à Niamey (Niger). Ce programme avait notamment pour objectif d'analyser l'évolution de la réponse immunitaire spécifique après traitement par le praziquantel suivi d'une période de réinfection par *S. haematobium*.

Les études immuno-épidémiologiques réalisées au cours de cette thèse ont nécessité une analyse statistique approfondie et relativement complexe. La collaboration avec le Dr. Helen GYUATT de l'Université d'Oxford nous a apporté une aide importante.

En outre, un projet concernant le rôle de l'IL-7 au cours de la schistosomiase a été initié par les Dr. Isabelle WOLOWCZUK et Olivier ROYE (CNRS URA 1854, Institut Pasteur de Lille). Les données obtenues dans les populations infectées au Sénégal ont été confrontées aux résultats observés dans des modèles expérimentaux. Cette complémentarité intéressante a permis de commencer une collaboration plus large avec cette équipe de recherche.

Un aspect de recherche plus fondamental de mon travail a pu être développé grâce à l'aide du Dr. Jean-Claude MANI de la Faculté de Pharmacie de Montpellier (CNRS UMR 9921). Cette collaboration a permis d'évaluer l'affinité de liaison entre la Sh28GST et les hormones stéroïdiennes par l'utilisation de la technologie BIACORE.

Des collaborations ont également été développées au sein de l'Unité INSERM U167. En particulier, l'influence de la co-infection par *Plasmodium falciparum* sur la réponse immune développée chez des individus infectés par *S. haematobium* a été étudiée avec Véronique ANGELI (groupe du Prof. Monique CAPRON). Enfin, une collaboration avec Catherine CETRE-SOSSAH (groupe du Dr. Jamal KHALIFE) a permis de caractériser la réponse immune spécifique à la Sh28GST induite après immunisation de rats par la préparation vaccinale BILHVAX.

Enfin, j'ai le privilège d'être membre du Schistosome Vaccine Network (SVN; action concertée de la Communauté Européenne; contrat IC18CT98-0360) qui a été initié en 1998 et est organisé par le Dr. G. RIVEAU. L'objectif principal de ce réseau européen est de coordonner la recherche de laboratoire et celle du terrain dans le cadre d'un développement d'un vaccin contre la schistosomiase. Plusieurs équipes de recherche composent le SVN: Institut Pasteur de Lille (Dr. G. RIVEAU, responsable du SVN; DR. J. DE BONT, secrétaire), Université de Gand (Pr. J. VERCRUYSSSE), University of Edinburgh (Pr. M. WOOLHOUSE), University of York (Pr. A. WILSON), Institute of Tropical Medicine (Anvers, Dr. B. GRYZEELS), Centro de Pesquisas R. Rachou (Brésil, Dr R. CORREA-OLIVEIRA), Kenya Medical Research Institute (Dr. K. GACHUHI) et CERMES-OCGE (Niger, Dr.D. BOULANGER).

Financements

Les études immuno-épidémiologiques menées dans la région du Fleuve Sénégal ont pu être réalisées grâce au soutien financier de: la Communauté Européenne (Contrats INCO-DC IC18CT960041 et IC18CT970240); du Ministère de la Coopération Française (Contrat FAC 88/CD/9101); et de la Région Nord-Pas-de-Calais.

Les essais cliniques BILHVAX sont soutenus par: l'INSERM et la Communauté Européenne (Projet de Démonstration BIOTECH, BIOCT98-0219).

Le travail réalisé dans l'Unité 167 n'aurait pu être mené à bien sans le soutien de: l'Institut Pasteur de Lille et de l'INSERM.

Enfin, j'ai bénéficié d'une bourse doctorale de 3 ans de la Région Nord-Pas-de-Calais (co-financement avec l'Institut Pasteur de Lille) puis d'un contrat de co-coordonateur du Schistosome Vaccine Network (année 2000).

Introduction

I) Les Schistosomiasés:

Les schistosomiasés ou bilharziosés sont des infections parasitaires à transmission aquatique. Ces infections sont engendrées par la présence dans les vaisseaux sanguins de vers trématodes à sexes séparés qui pénètrent chez l'homme par voie transcutanée. Les vers femelles émettent des oeufs dont une partie est éliminée dans les excréments, selles ou urines, selon l'espèce en cause. L'autre partie des oeufs est emprisonnée dans les tissus de l'hôte et est à l'origine de la pathologie bilharzienne.

Cinq espèces du genre *Schistosoma* sont parasites de l'homme :

- Schistosoma haematobium*, agent de la bilharziose urinaire
- S. mansoni*, bilharziose intestinale
- S. intercalatum*, bilharziose rectale d'Afrique Centrale
- S. japonicum*, bilharziose artérioveineuse sino-japonaise
- S. mekongi*, bilharziose intestinale de la péninsule indochinoise

Les schistosomiasés sont des maladies endémiques des régions tropicales et subtropicales qui touchent 76 pays. Cette infection constitue à l'heure actuelle un problème grave de santé publique dans les pays en voie de développement où elle représente la seconde endémie parasitaire après le paludisme. Maladie chronique insidieuse, la bilharziose est peu dépistable aux stades précoces. Sa transmission est particulièrement liée à l'agriculture et aux systèmes d'approvisionnement en eau. Il s'agit typiquement d'une maladie de la pauvreté car les conditions de vie dans les pays touchés génèrent la propagation de l'infection, et les malades n'ont pas accès à des soins appropriés ni à des mesures efficaces de prévention.

Même si des progrès ont été réalisés dans certains pays, les derniers chiffres provenant de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indiquent l'importance du problème:

- Population à risque : 500-600 millions
- Population infectée : 200 millions (en 1947, l'estimation était de 114 millions)
- Malades : 20 millions souffrent d'une pathologie sévère
- Mortalité : 500 000 personnes chaque année. Cette mortalité est principalement causée par les cancers de la vessie (bilharziose urinaire) et la fibrose hépatique (bilharziose intestinale).

La lutte contre la bilharziose est essentiellement basée sur les différents moyens d'interrompre le cycle du parasite. Ainsi, de nombreux organismes internationaux ont mis en place des programmes destinés à la prévention, à la surveillance épidémiologique, à la chimiothérapie et à la recherche d'un vaccin. L'avancée majeure dans cette lutte est venue de l'application massive d'une chimiothérapie efficace depuis 1975. Malgré tout, ce seul traitement ne semble pas diminuer la prévalence de cette parasitose, essentiellement parce qu'il n'empêche pas la réinfection, souvent quotidienne dans les régions endémiques. Le développement de

stratégies vaccinales constitue donc un objectif majeur dans le contrôle de la schistosomiase. En particulier, la mise au point d'un vaccin prévenant l'apparition de la pathologie représente une orientation prioritaire pour de nombreux groupes de recherche. Le sujet de cette thèse s'inscrit dans cette démarche.

I.1) Le Parasite et son Hôte:

I.1.1) Historique

L'infestation bilharzienne est connue, dans la vallée du Nil, depuis des millénaires puisque des oeufs calcifiés ont été retrouvés dans la région pelvienne de momies égyptiennes. Pendant la campagne d'Égypte, des soldats de Napoléon furent atteints d'hématuries (présence de sang dans les urines). Le ver fut découvert par Théodor Bilharz dans les veines mésentériques d'un égyptien du Caire en 1851. Il démontra par la suite que ces vers pondaient des oeufs qui s'éliminaient avec les urines (Bilharz, 1852). Cependant, il ne distingua pas *S. haematobium* de *S. mansoni*. Ce fut Manson qui, en 1893, soupçonna que les helminthes dont les oeufs présentaient un éperon latéral (*S. mansoni*) étaient différents de ceux chez qui l'éperon est terminal (*S. haematobium*). Il identifia ainsi la présence d'oeufs de *S. mansoni* dans les selles d'un sujet des Caraïbes d'origine africaine (Manson, 1902). Les années suivantes, la forme intestinale de la maladie fût décrite à Porto Rico, au Brésil et au Venezuela. Sambon proposa alors le nom de *S. mansoni* pour le parasite produisant des oeufs à éperon latéral (Sambon, 1907).

L'espèce *intercalatum* fût donné par Fisher en 1934 pour décrire l'agent d'une bilharziose intestinale dont les oeufs, retrouvés dans les selles d'individus en Afrique Centrale (Zaïre), présentaient un éperon terminal. Il a été fait mention pour la première fois de *S. japonicum* par Fuji, au Japon en 1847 (Fuji, 1847) mais c'est Kasai qui découvrit les oeufs du parasite dans les selles en 1903. Fudjinami, en 1904, localise le ver dans la veine porte et Katsudara le décrit chez des chats et des chiens infestés (Katsudara, 1904). Le premier cas chinois est rapporté par Logan en 1905. La bilharziose à *S. mekongi* a été décrite dans le sud de la Thaïlande en 1950 et attribuée à *S. japonicum*. D'autres cas ont été vus par la suite dans la vallée du Mékong.

C'est en 1909 qu'il a été établi que la peau constitue la porte d'entrée des parasites (Fujinami *et al.*, 1909) confirmant les premières observations d'Allen (Allen, 1888). Enfin, les travaux de Leiper au Japon et en Égypte ont permis d'aboutir à la description du cycle complet

des schistosomes. Ils montraient clairement l'existence d'espèces distinctes de schistosomes pénétrant par la peau sous forme larvaire et transmises par différents gastéropodes d'eau douce (Leiper *et al.*, 1915).

I.1.2) Taxonomie

Les schistosomes sont des vers plats hématophages appartenant à :

- l'embranchement des Plathelminthes : vers plats non segmentés
- la classe des Trématodes : appareil digestif avec caecum
- la sous-classe des digènes : deux hôtes
- le super-ordre des prostomata : bouche antérieure
- l'ordre des distomes : deux ventouses (buccale et ventrale)
- au sous-ordre des schistosomoidea : deux sexes séparés
- la famille des Schistosomatidae : furcocercaires libres
- au genre *Schistosoma*

Chez les helminthes, l'embranchement des plathelminthes représente sans doute l'un des groupes d'animaux les plus primitifs à présenter une symétrie bilatérale, caractéristique commune de toutes les formes animales évoluées. Au niveau de la classification, nous pouvons nous rendre compte de la position charnière des schistosomes. Ces parasites peuvent être considérés comme appartenant aux plus évolués des organismes primitifs ou comme membre des plus primitifs des organismes évolués.

Contrairement à l'immense majorité des trématodes, les schistosomes ont des sexes séparés et présentent un très fort dimorphisme sexuel. Cependant, il semble que le schistosome soit malgré tout capable d'hermaphrodisme (Basch *et al.*, 1990). Chez le schistosome, l'accouplement est permanent, le mâle loge la femelle dans son canal gynécophore. Sans cet accouplement, les femelles restent de petite taille et sont incapables de parvenir à maturité sexuelle (Basch *et al.*, 1990). Le mâle n'a besoin, ni d'être fertile, ni d'être de la même espèce, pour induire la maturation des femelles.

I.1.3) La relation hôte - parasite

Par définition, les parasites vivent aux dépens de leur hôtes. D'une part, les parasites doivent tirer leurs éléments nutritifs du sang de leur hôte et ainsi les schistosomes utilisent pour leur métabolisme: du glucose, du cholestérol, des acides gras et des facteurs de croissance dérivés de leur hôtes (Basch, 1991). D'autre part, une forme d'équilibre est atteinte pour que le parasite ne porte pas de préjudices trop importants à son hôte, qui pourrait signifier une perte de son habitat ou de sa niche écologique. Ainsi, de nombreuses maladies parasitaires, telles que les schistosomiasés sont chroniques et n'évoluent que lentement vers des formes pathologiques graves, après de nombreuses années d'infection.

En plus de l'utilisation à leurs fins de produits de leur hôte, les parasites ont su tirer profit de leur hôte au cours de leur évolution commune et ainsi développer des mécanismes de communication extrêmement élaborés. Un véritable langage moléculaire s'établit donc durant les différentes étapes de migration et de maturation du parasite dans son hôte afin d'atténuer les défenses immunitaires développées par l'hôte. A ce titre, les schistosomes semblent avoir mis en place un ensemble de stratégies moléculaires visant à se prémunir des agressions de l'hôte. Citons quelques exemples : la variation antigénique, le camouflage avec des molécules de l'hôte, un équipement enzymatique très évolué afin de détoxifier les composés oxydants néfastes (Capron *et al.*, 1995).

I.1.3.a) Les principales espèces de schistosomes infectant l'homme

Le genre *Schistosoma* rassemble 19 espèces (Ripert, 1998) dont cinq sont des parasites de l'homme : *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* et *S. mekongi*. Trois d'entre elles, *S. haematobium*, *S. mansoni* et *S. japonicum* constituent une menace plus grave pour la santé publique du fait de leur fréquence, de l'étendue de leur distribution et de leur pathogénicité. La distinction entre les espèces est basée sur des critères morphologiques des oeufs, qui peuvent être ovales et munis d'un éperon latéral (*S. mansoni*), ovales et munis d'un éperon terminal (*S. haematobium*, *S. intercalatum*) mais aussi des paramètres parasitologiques (localisation géographique, hôtes intermédiaires et définitifs) et pathologiques (localisation tissulaire).

Les caractéristiques des quatre espèces majeures sont présentées dans le tableau suivant:

Caractères distinctifs des quatre espèces *Schistosoma* infectant l'homme:

	<i>S. mansoni</i>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. intercalatum</i>	<i>S. Japonicum</i>
<u>Vers adultes</u>				
localisation	Veine mésentérique inférieure	Plexus veineux vésical	Veine mésentérique inférieure	Veine mésentérique supérieure
<i>Mâles</i>				
longueur (mm)	6-13	10-15	11-14	10-20
largeur (mm)	1,10	0,90	0,30-0,40	0,55
testicules (nbre)	4-13	4-5	2-7	6-7
tubercules	gros	fins	fins	absents
<i>Femelles</i>				
longueur (mm)	10-20	16-26	10-14	20-30
largeur (mm)	0,16	0,25	0,15-0,18	0,30
ovaires (position)	avant	arrière	arrière	médiane
utérus (posit.,long.)	avant, très court	avant, long	avant, long	avant, court
<u>Oeufs</u>				
forme	ovale	ovale	ovale	ronde
taille	61 x 140	62 x 150	61 x 176	60 x 100
éperon	latéral	terminal	terminal	latéral (réduit)
nbre pondu/jour/fe.	100-300	20-300	150-400	3500
voie d'élimination	côlon/rectum	vessie	rectum	intest. grêle/colon
voie d'excrétion	selles	urine	selles	selles
<u>Hôte intermédiaire</u>	<i>Biomphalaria</i>	<i>Bulinus</i>	<i>Bulinus</i>	<i>Oncomelania</i>
<u>Hôte définitif</u> (majeur)	Homme, rongeurs	Homme	Homme, rongeurs	Homme, animaux d'élevage
<u>Rôle pathogène</u>	Bilharziose intestinale hépato-splénique	Bilharziose uro-génitale	Bilharziose rectale	Bilharziose artério-veineuse hépato-splénique

Il est à noter que des appariements interspécifiques au sein d'un même hôte peuvent entraîner l'apparition d'hybrides. Ces hybrides vont influencer l'hétérogénéité génétique des populations naturelles de parasite, ceci pouvant aboutir à des conséquences possibles sur le pouvoir infectieux de chaque espèce. Ainsi, l'évolution de la prévalence des porteurs hybrides *S. haematobium* - *S. intercalatum* entre 1984 et 1992 au Gabon est en faveur du développement de nouvelles formes d'infection (Richard-Lenoble *et al.*, 1993). Dans le cas de formation d'un couple hybride, la localisation du ver mâle détermine le lieu de la sécrétion des oeufs (urine ou selles) alors que la forme des oeufs pondus (éperon terminal ou latéral) est déterminée par la femelle.

Animaux : réservoir naturels des schistosomiases

La plupart des espèces respecte une certaine spécificité d'hôte. Néanmoins, certains mammifères sont infestés occasionnellement et d'autres constituent un authentique réservoir du parasite pouvant ainsi entretenir l'infestation entre eux, sans la présence de l'homme. Mais dans la plupart des cas, des animaux domestiques qui sont fréquents dans les régions endémiques représentent de véritables réservoirs mammifères naturels.

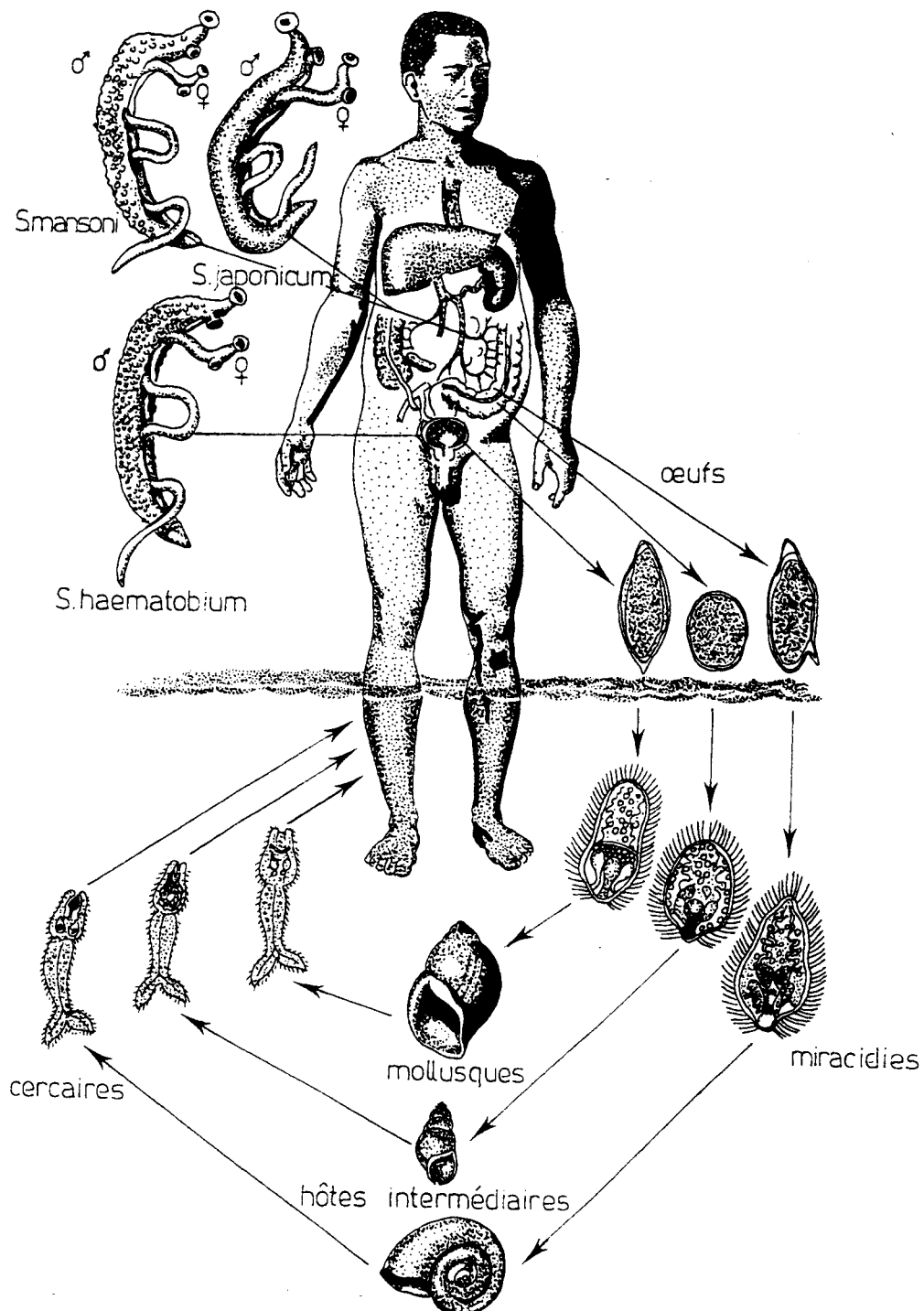
Par exemple, de nombreux rongeurs hébergent *S. mansoni* comme le rat sauvage *Rattus rattus*, particulièrement sensible à cette infection (Combes *et al.*, 1981). En Guadeloupe, ce rongeur vie dans la mangrove et est souvent parasité au voisinage des habitations (Rioux *et al.*, 1977). Au Zaïre, le rat noir est infesté ainsi que de nombreux autres rongeurs sauvages (Pitchford, 1977). Au Sénégal, dans la région de Richard-Toll, différentes espèces de rats (*Arvicanthis niloticus*, *Mastomys huberti*) ont été trouvés porteurs de *S. mansoni* et d'autres espèces étaient même sensibles à une infection pathologique (*Mastomys erythroleucus*, *Mus musculus*) (Sené *et al.*, 1996). Des mammifères, autres que des rongeurs sont aussi des hôtes de ce parasite en Afrique. Il s'agit surtout de primates (Cercopithèques, babouins), mais également de bovins ou ovins. Dans le cas de *S. japonicum*, les réservoirs animaux sont assez diversifiés : les bovins domestiques, les porcs, les chiens et les rats. En Indonésie, cinq espèces de rongeurs et certains animaux domestiques (vaches buffles, chiens, chevaux) sont infestés par ce parasite.

Vu leur haut degré d'infection (plus élevé quelquefois que celui des populations humaines) et de leur distribution géographique (fortement associée à la présence humaine), ces réservoirs animaux participent activement à la transmission de la schistosomiase dans les écosystèmes naturels.

Les hôtes définitifs autre que l'homme ont été rarement décrits pour l'infection à *S. haematobium*. Il a été montré en Zambie que des couples de parasites hybrides *S. matheei/S. haematobium* étaient retrouvés chez le bétail (11 %) (De Bont *et al.*, 1994). De plus, une étude récente dans cette même région vient de décrire une infection naturelle à *S. haematobium* chez le chien ce qui indique que ces animaux, fréquents dans les régions endémiques, pourraient être un réservoir de la bilharziose urinaire (Chiti *et al.*, 2000).

I.1.3.b) Le cycle parasitaire:

Le cycle évolutif s'effectue entre un hôte définitif mammifère et un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce. Ces mollusques sont spécifiques de chaque espèce: *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum* infectant respectivement les genres *Biomphalaria*, *Bulinus* et *Oncomelania*. Le cycle est présenté ci-dessous pour les trois espèces majeures de schistosomes infectant l'homme:

Cycle évolutif des schistosomes infectant l'homme:

La pénétration percutanée:

L'infestation de l'homme s'effectue lors du contact aux eaux douces contaminées. La pénétration dans l'hôte définitif de la forme infestante du parasite, la *furcocercaire* (issue du mollusque, recouverte d'un glycocalyx dense dans l'eau et appelée ainsi parce qu'elle porte une queue bifide) commence par une étape de fixation sur la peau par l'intermédiaire de la ventouse antérieure munie d'épines. Le changement le plus évident accompagnant cette phase est la perte de la queue. La pénétration dans l'épiderme s'opère par des contractions musculaires et des mécanismes de sécrétion d'enzymes protéolytiques. En effet, les parasites sont munis de glandes unicellulaires contenant notamment des protéases capables de dégrader la kératine, l'élastine, la gélatine, la laminine, la fibronectine et les collagènes de type I, IV et VII (Wylter, 1990). En outre, il semble que des prostaglandines et des acides gras provenant de l'hôte soient essentiels au mécanisme de pénétration (Salafsky *et al.*, 1984; Hass *et al.*, 1987). La traversée de l'épiderme se fait dans un intervalle d'une trentaine de minutes mais la migration est momentanément stoppée au niveau de la membrane basale qui constitue une première barrière.

Lorsque des cercaires tentent de pénétrer dans des hôtes non-adaptés, il arrive que l'infection soit totalement stoppée au niveau de la peau. C'est le cas de certains schistosomes aviaires qui commencent à pénétrer dans la peau humaine, mais dont la migration ne dépasse pas le tissu conjonctif subdermal.

Le stade pulmonaire:

Au bout de 2 à 4 jours, les parasites, appelés maintenant les *schistosomules*, parviennent finalement à traverser le derme et entrent dans les veinules post-capillaires ou dans des vaisseaux lymphatiques afférents, d'où ils sont transportés par le flux sanguin vers les poumons en passant par le cœur droit. Le stade pulmonaire du schistosomule va durer 3 à 4 jours au cours duquel le parasite s'allonge (de 300 μm à près de 900 μm) afin de pouvoir se faufiler dans les fins capillaires pulmonaires. A ce niveau, il semble que le changement de morphologie s'accompagne de modifications de la musculature ainsi que de modifications de surface rendant les schistosomules peu sensibles aux attaques du système immunitaire.

Une partie des parasites ne poursuit pas la maturation au delà des poumons. En effet, il est possible de retrouver, après une dizaine de jours, une délocalisation de certains schistosomules de l'espace intra-vasculaire vers les alvéoles pulmonaires, sans qu'un retour à la circulation sanguine ne soit possible (Crabtree *et al.*, 1986).

La maturation sexuelle:

Après leur passage obligé par les poumons, il semble que les schistosomules effectuent plusieurs passages par le coeur.

Le jeune parasite va alors se différencier en *schistosome* ou *vers adultes* et subir une maturation sexuelle. Les parasites mâles opèrent leur maturation sexuelle terminale en l'espace de quelques jours mais ce n'est qu'à la condition de rencontrer et de s'accoupler avec un schistosome mâle que la femelle peut atteindre également sa pleine maturité sexuelle (Moore *et al.*, 1954). Chez l'homme, les vers peuvent demeurer accouplés pendant une période de 2 à 18 ans. Les femelles se logent dans le canal gynécophore du mâle et les jeunes couples se déplacent à contre-courant vers les branches veineuses, grâce à leurs deux ventouses latérales et vont gagner leur lieu de ponte. Ainsi, c'est au niveau des veines mésentériques et de la veine porte à l'entrée du foie que les parasites vont stopper leur migration pour finalement se sédentariser pour le reste de leurs jours. Cette localisation définitive, vraisemblablement déterminée par le mâle, est observée pour l'ensemble des schistosomes infectant l'espèce humaine à l'exception de *S. haematobium* qui s'installe lui au niveau du plexus vésical ou vésico-uréto-vaginal.

La ponte des oeufs:

Au bout de 5 semaines, la ponte des oeufs commence et peut se poursuivre pendant une dizaine d'année, durée de vie estimée des parasites. Les femelles matures vont pondre des *oeufs* en continu qui seront ensuite disséminés dans divers organes internes (notamment foie ou vessie) où ils se retrouvent bloqués au niveau du rétrécissement des vaisseaux sanguins. Ils sont alors la cible d'une forte réaction inflammatoire aboutissant à la formation des "granulomes bilharziens", responsable de la pathologie (voir chap. I.3). La plus grande partie des oeufs, non entrappés dans les tissus, parviennent à franchir les muqueuses de l'appareil urinaire (*S. haematobium*) ou intestinal (*S. mansoni*, *S. japonicum*) en sécrétant des substances protéolytiques et des produits capables d'induire la production des cytokines proinflammatoires par l'organisme. En effet, cette réaction inflammatoire de l'hôte apparaît nécessaire à l'excrétion des oeufs et le rôle du TNF α semble ici prépondérant (Amiri *et al.*, 1992). Par ces deux phénomènes, les oeufs sont alors excrétés dans les urines ou les selles et ainsi libérés dans l'eau.

Le miracidium et son hôte aquatique:

Lorsque les oeufs excrétés par les hôtes définitifs infectés se retrouvent au contact de l'eau douce, ils éclosent à des conditions bien précises de pH, de salinité, de température

(proche de 30 °C) et de lumière. Ils libèrent une forme larvaire libre, le *miracidium*, capable d'infecter un gastéropode d'eau douce spécifique de l'espèce de schistosome. Cette spécificité semble être un facteur déterminant dans la distribution géographique des différentes schistosomiasés.

Les miracidiums mesurent environ 300 µm sur 100 µm et peuvent se mouvoir dans l'eau grâce à des cils vibratiles disposés sur l'ensemble de leur surface. En plus des cellules germinales primitives, ils comportent des cellules nerveuses et musculaires, un système d'excrétion et des glandes sécrétoires impliquées lors de la pénétration dans le gastéropode. La reconnaissance entre les deux partenaires semble être guidée par des facteurs chimiotactiques. Après la pénétration dans le mollusque, les miracidiums se transforment en *sporocystes primaires*. La reproduction asexuée des cellules germinales se met en place et des *sporocystes secondaires* se forment en l'espace d'une semaine par divisions cellulaires et différenciation. Ils sont alors constitués de leurs propres cellules germinales ainsi que d'un appareil musculaire et nerveux. Ils sont expulsés du sporocyste primaire et rejoignent alors l'hépatopancréas ou les gonades de l'hôte intermédiaire pour y subir un second cycle de reproduction. Cette seconde étape donne finalement naissance à des *furcocercaires* qui s'échappent par l'hémolymphe et traversent la surface tégumentaire du gastéropode.

Un seul miracidium peut aboutir à la production d'une dizaine de milliers de cercaires identiques. Les mollusques infectés et stimulés par la chaleur rejettent alors chaque jour dans l'eau environnante des milliers de cercaires aux heures chaudes de la journée. Ils peuvent survivre dans l'eau douce pendant 48 heures au maximum.

L'étude de la production cercarienne par le mollusque montre une ponctualité étonnante au cours de la journée. En effet, les furcocercaires, forme infestante, vont quitter leur hôte intermédiaire entre 10h et 15h, ce qui coïncide le mieux avec le moment où les populations humaines fréquentent le milieu aquatique (tâches ménagères et travail pour les adultes, loisirs pour les enfants) (Combes *et al.*, 1992). Pour *S. bovis*, espèce majeure du bétail, les cercaires sont émises dans l'eau à l'heure où les bovins viennent s'abreuver (pic à 9h).

I.1.4) Le mimétisme moléculaire

La surface des vers adultes est constituée d'un tégument formé d'un syncytium avec des connexions cytoplasmiques et un réseau de fibres musculaires. Bien que les schistosomes puissent ingérer des hématies par leur orifice oral, une partie importante des nutriments semble être absorbée par le tégument. La surface des parasites mâles comporte de nombreux tubercules parsemés de fines épines contrairement à la femelle qui présente un corps d'aspect plus lisse. La régénération perpétuelle de la surface tégumentaire est probablement un mécanisme crucial dans l'échappement du parasite vis -à-vis de l'attaque du système immunitaire de l'hôte.

Ce mécanisme est de plus couplé à la composition moléculaire du tégument qui est capable de mimer de nombreux facteurs de l'hôte. Ce processus, appelé mimétisme moléculaire, est probablement à la base de la parfaite relation du parasite vis-à-vis de son hôte. Au cours de sa transformation en ver adulte, le parasite semble en effet mimer des structures antigéniques et des molécules analogues à celles de son hôte. Il est à l'heure actuelle difficile de savoir clairement si ces molécules sont transférées directement de l'hôte ou bien codées par le génome du parasite. Cette seconde hypothèse pourrait résulter de transferts de gènes de l'hôte vers le parasite au cours de l'évolution des schistosomes. Ainsi, les parasites se recouvrent d'un véritable tapis moléculaire aboutissant à plusieurs phénomènes (Capron, 1995):

- les schistosomes peuvent devenir invisibles aux réactions immunes de l'hôte
- les parasites expriment également des composés actifs capables de détourner le système immunitaire et le système hormonal de l'hôte à leur profit.

Par exemple, les schistosomes détournent et recouvrent leur surface tégumentaire du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Sher *et al.*, 1978) et d'antigènes de groupe sanguin (Dean, 1974). Afin de contrôler les réponses immunes de l'homme, les schistosomes sont capables de produire de la β -endorphine, de l'adrénocorticotrophine (ACTH) et de l'hormone de stimulation des mélanocytes (α -MSH). La sécrétion de ces neuropeptides parasitaires induit une immunosuppression des monocytes de l'hôte définitif (Duvaux-Miret *et al.*, 1992). De plus, ces parasites peuvent contrecarrer l'action néfaste du complément sur leur survie en synthétisant un inhibiteur du complément (SCIP-1) ou des protéases (Marikovsky *et al.*, 1988). Des protéases sécrétées par le parasite sont également impliquées dans la lyse d'immunoglobulines qui peuvent se fixer sur des déterminants épitopiques exprimés à la surface tégumentaire (Marikovsky *et al.*, 1988).

I.2) La distribution géographique:

I.2.1) Régions endémiques:

Selon les dernières données de l'OMS, la schistosomiase est endémique dans 76 pays. Avec l'introduction de *S. mansoni* à Djibouti, en Mauritanie, au Sénégal et en Somalie au cours de cette dernière décennie, la schistosomiase intestinale touche actuellement 55 pays, dont la péninsule arabe, l'Égypte, la Libye, le Soudan, la plupart des pays d'Afrique subsaharienne, le Brésil, certaines îles des Caraïbes, le Surinam et le Venezuela.

S. haematobium est endémique dans 53 pays du Moyen-Orient et de la plupart du continent africain, y compris les îles de Madagascar et Maurice. Il existe également un foyer à *S. haematobium* en Inde mais il est mal défini.

S. intercalatum est signalé dans 10 pays d'Afrique de l'ouest. Sa présence au Mali, qui possède un environnement sahélien atypique, doit être confirmée tout comme la transmission de cette espèce en République Centrafricaine, au Tchad, au Congo et au Nigeria doit également être confirmée.

L'infection par *S. japonicum* est endémique en Chine, en Indonésie et aux Philippines et a été signalée en Thaïlande. *S. mekongi*, un autre schistosome oriental, est trouvé au Cambodge et au Laos.

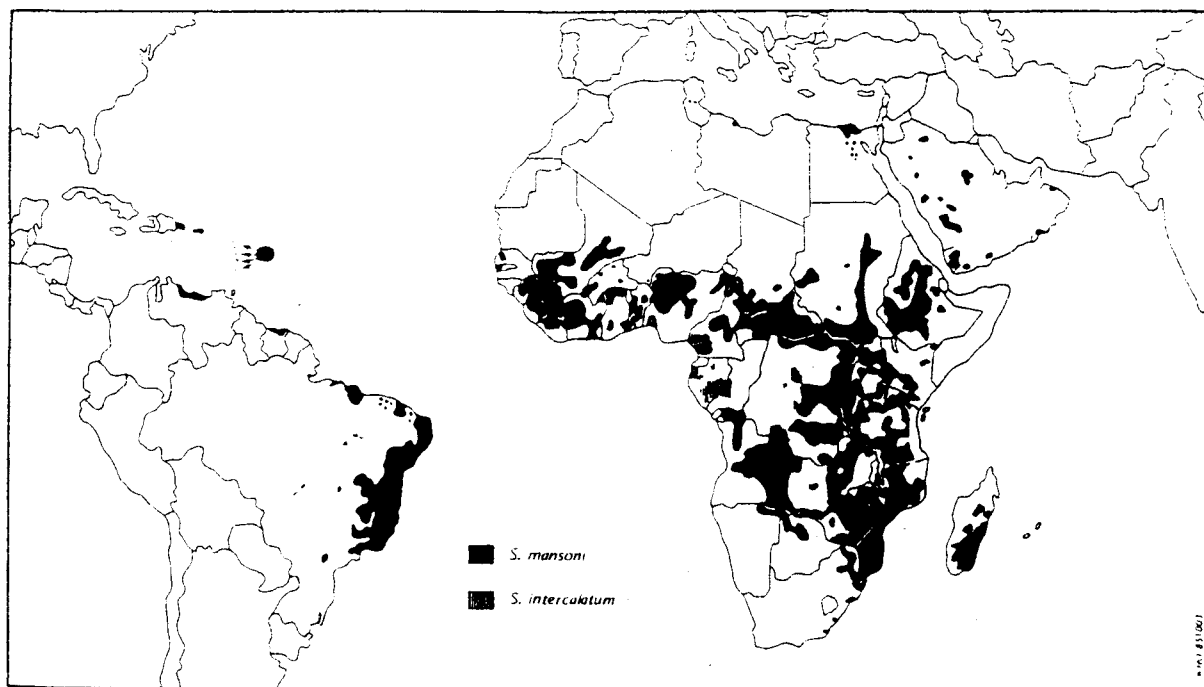
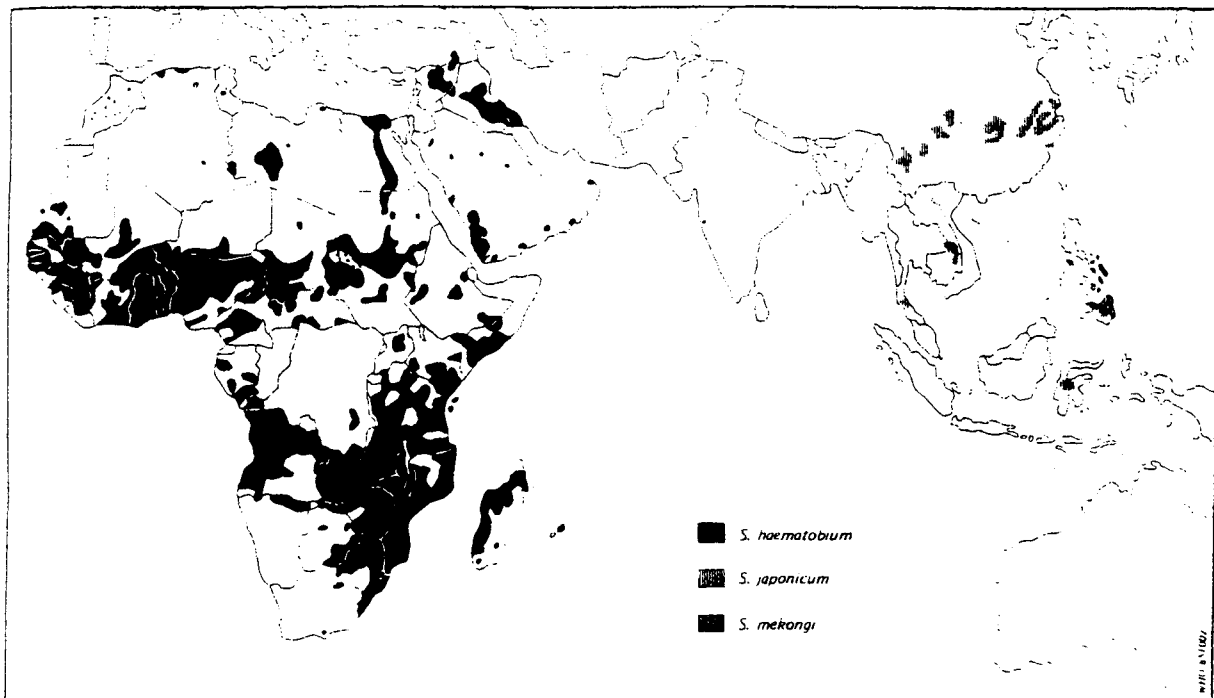
Les pays les plus gravement touchés en Afrique sont l'Angola, l'Égypte, le Ghana, Madagascar, le Malawi, le Mali, le Mozambique, le Nigeria, l'Ouganda, la République Centrafricaine, le Sénégal, la Tanzanie, le Tchad, la Zambie et le Zimbabwe. Le Brésil, avec 25 millions d'habitants dans les zones d'endémie et 3 millions de personnes infectées, est le pays le plus touché des Amériques. La Chine est le pays le plus touché en Asie, avec quelque 900 000 personnes infectées. Le Yémen est le pays le plus infecté du Moyen-Orient (jusqu'à 3 millions de personnes infectées).

La répartition géographique des cinq espèces infectant l'homme est indiquée sur les cartes suivantes:

Distribution mondiale des schistosomiases

Haut: *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*

Bas: *S. mansoni*, *S. intercalatum*



Bilharziose à *S. haematobium*:

La schistosomiase urinaire est la plus fréquente des bilharzioses humaines, mais elle n'est rencontrée qu'en Afrique et en Asie Occidentale.

Les populations établies près des côtes sont maintenant presque aussi exposées que celles vivants au coeur des continents. Les charges parasitaires les plus importantes se situent néanmoins dans la zone aride de la péninsule Afro-Orientale.

La bilharziose urinaire a une distribution en foyers, centrée sur les sites de transmission aquatique. Les foyers d'infestation peuvent être très dispersés et de petite taille, organisés autour d'un seul point d'eau hébergeant des mollusques, palmeraie saharienne ou village africain situé en milieu coutumier. Mais les foyers peuvent aussi être très étendus, le long de la vallée d'un grand fleuve (Nil, Niger, Sénégal) autour duquel se développe de nombreux système d'irrigation. La construction de barrages permettent souvent à des foyers de bilharziose urinaire de se constituer. Sur le continent africain, il est ainsi significatif de constater que la conversion de surfaces arides en périmètres irrigués provoque le développement, et peut même être à l'origine de l'installation de l'infection à *S. haematobium*, alors que le cadre naturel ne le permettait pas.

Bilharziose à *S. mansoni*

La schistosomiase intestinale à *S. mansoni* semble présente depuis longtemps en Afrique sub-saharienne, dans le delta du Nil et dans la Péninsule Arabique. A cause des déplacements des populations, elle est actuellement bien implantée dans l'Arc Caraïbe et sur la façade Atlantique de l'Amérique du Sud. Elle se trouve particulièrement bien représentée dans les zones forestières ou de savane arborée, ou encore sur les hauts plateaux où les eaux de surface apparaissent relativement fraîches. Sur le continent africain, il est significatif de constater qu'elle s'étend plus avant en région forestière que la bilharziose urinaire.

Foyers africains d'infections mixtes

S. haematobium et *S. mansoni* sont très fréquemment rencontrés dans les mêmes foyers, en Egypte et Afrique Noire. Ceci est lié à la présence simultanée de leurs hôtes intermédiaires, *Bulinus* et *Biomphalaria*, dans un même biotope. *S. intercalatum* est aussi rencontré en association à *S. haematobium* dans certains foyers d'Afrique Centrale donnant même lieu à une hybridation entre ces deux espèces, comme il l'a été démontré au Cameroun (Ratard *et al.*, 1991).

Les pays où l'on rencontre à la fois *S. haematobium* et *S. mansoni* sont situés dans 28 pays situés sur le continent africain au sud du Sahara et à Madagascar. Récemment au Sénégal, le premier foyer mixte pour ces deux espèces a été décrit en 1996 (Picquet *et al.*, 1996) et leur nombre connaît à l'heure actuelle une forte augmentation dans ce pays (De Clercq, *et al.*, 1999).

I.2.2) Développement des foyers d'infection:

Du fait de l'augmentation de la population dans les zones d'endémie, un plus grand nombre de personnes sont à risque. Les mouvements de population à partir du nord-est du Brésil ont étendu la transmission à *S. mansoni* à de nouvelles zones. La nécessité d'un développement économique a conduit à la construction de vastes retenues d'eau pour l'électricité et l'irrigation. Ces installations peuvent entraîner une augmentation de la transmission des maladies parasitaires à transmission hydrique telles que les schistosomiasés bien souvent associées à l'expansion des filarioses et du paludisme.

La construction de barrages a introduit *S. haematobium* dans de nouvelles régions du Cameroun, de Côte-d'Ivoire, du Ghana, du Mali, de Namibie, du Sénégal et du Soudan. *S. mansoni* a été introduit dans de nouvelles régions du Ghana, du Mali, de l'Ouganda et du Sénégal. Les perturbations écologiques associées à la construction du haut barrage d'Assouan ont abouti à une augmentation de la prévalence de *S. mansoni* dans le Delta du Nil.

De nombreux programmes de lutte contre la schistosomiase ont été mis en place au cours des vingt dernières années. Ils concernent l'éducation pour la santé, la lutte contre les mollusques et principalement la chimiothérapie (ceci sera décrit précisément dans le chap. I.5). L'élimination et/ou l'éradication de l'infection sont maintenant à la portée des Caraïbes, de l'Iran, du Japon, de l'île Maurice et de la Tunisie. Le contrôle de la morbidité et de la mortalité est en progrès au Brésil, au Cambodge, en Chine, en Egypte, au Laos et aux Philippines. La lutte a également donné de bons résultats au Botswana et au Maroc où l'intensité de l'infection a été abaissée mais la transmission se poursuit à un niveau élevé.

Néanmoins, la schistosomiase demeure un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne, où très peu de pays ont entrepris une lutte durable. La construction d'ouvrages de mise en valeur des ressources en eau dans le cadre du développement social a conduit à une augmentation de la transmission. Cette évolution et l'introduction des différentes bilharzioses dans de nouvelles zones risquent d'entraîner un accroissement considérable de la morbidité et donc de la mortalité dans les années à venir.

I.3) Les pathologies:

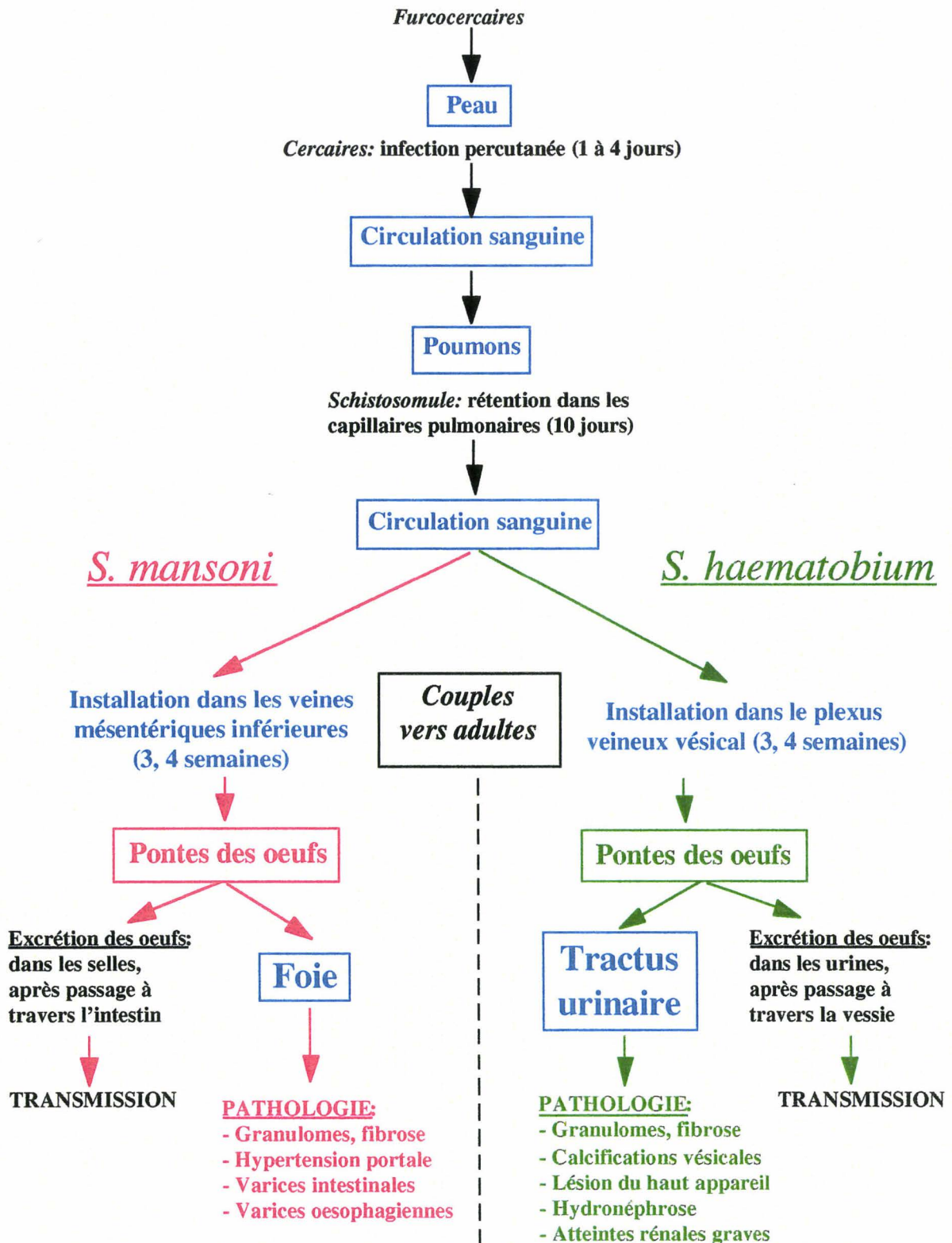
Des réactions inflammatoires de type allergique (fièvre de Katayama) ou des dermatites réversibles sont parfois associées à des infections par les schistosomes. Néanmoins, les principales manifestations pathologiques ne sont pas liées à la présence des vers eux-mêmes, mais aux oeufs non excrétés qui se retrouvent emprisonnés dans les tissus de l'hôte. En réalité la pathologie est induite, non pas par des toxines parasitaires, mais par les propres réactions de l'hôte conduisant à la mise en place d'une forte réaction inflammatoire aboutissant à la formation de granulômes. L'accroissement du nombre de ces granulomes bilharziens génère alors une fibrose pouvant conduire à la mort.

Nous pouvons alors imaginer que l'apparition de la pathologie est directement liée à l'intensité de la charge en oeufs dans l'organisme. Or, ce phénomène semble beaucoup plus compliqué et les années d'exposition au parasite semble être prépondérant dans l'apparition de la pathologie. En effet, l'intensité d'infection (mesurée par le nombre d'oeufs excrétés dans les selles ou les urines) la plus élevée est majoritairement observée chez les enfants dans la plupart des foyers d'infection (épidémique ou endémique). Cette intensité d'infection diminue avec l'âge. Néanmoins, l'évaluation du degré de pathologie par les études échographiques montrent que les adultes représentent la population la plus touchée. D'une manière intéressante, il a en effet été montré dans une population infectée par *S. mansoni* que les adultes (40 à 49 ans) excréant le moins d'oeufs étaient également ceux qui avaient la plus forte prévalence de fibrose hépatique avancée (Wiest, 1996).

A l'heure actuelle, peu d'études ont évalué l'infection en fonction du sexe des individus. En terme d'intensité d'infection, il semble impossible de tirer des conclusions claires car chaque foyer est différent et la fréquence du contact à l'eau entre les hommes et les femmes semble dépendre du foyer d'infection. Par exemple, il a été montré que la prévalence à *S. haematobium* en Ethiopie était plus élevée chez les femmes que chez les hommes tandis que le phénomène inverse était retrouvé au Kenya ou au Sénégal (Bundy, 1988; Remoué *et al.*, 2000). Une étude récente dans un foyer infecté par *S. mansoni* au Soudan a cependant montré que l'apparition d'une fibrose hépatique pouvait être dépendante du sexe des individus alors que les hommes et les femmes présentaient de faibles intensités d'infection (Mohamed-Ali *et al.*, 1999). En effet, les hommes âgés de 26 à 30 ans étaient porteurs d'une fibrose plus sévère que celle observée chez les femmes du même âge. Ces auteurs n'écartent pas le rôle d'une différence d'intensité d'infection en fonction du sexe ou l'intervention d'autres facteurs (génétique, durée de l'infection...) pour expliquer cette différence sexe-dépendante. Néanmoins, ce résultat suggère que le genre serait un paramètre important dans le développement de la pathologie bilharzienne.

Pour mieux comprendre le développement des pathologies bilharziennes intestinale et urinaire, le cycle des parasites *S. mansoni* et *S. haematobium* chez l'homme est présenté sur le schéma suivant:

Etapes de l'infection de *S. mansoni* et *S. haematobium* chez l'homme:



I.3.1) Manifestations cliniques communes:

Elles évoluent en trois phases, chacune d'entre elles correspondant à une phase physiopathologique du parasite chez l'homme. Les atteintes digestives existent pour ces deux types de bilharziose. Elles surviennent au cours de la localisation digestive des parasite et font suite aux phases de pénétration et d'invasion qui constituent les premières manifestations de la maladie. Leur symptomatologie est particulièrement intéressante, car elle permet le diagnostic des bilharzioses contractées par des voyageurs lors de courts séjours en pays d'endémie (Bonnard *et al.*, 2000).

La phase d'infection cercarienne:

Elle correspond à la pénétration transcutanée des furcocercaires et peut induire une dermatite allergique dans l'heure qui suit le bain infectant. Généralement, il s'agit d'un prurit précédant l'apparition d'un érythème. Ce phénomène peut persister pendant 10 à 15 jours et est communément appelé la "démangeaison du baigneur". Cette phase est discrète voire inapparente avec *S. haematobium*. Le prurit et la réaction urticaire disparaissent généralement en quelques heures, parfois en 1 à 2 jours dans la bilharziose à *S. mansoni*.

Cette phase est souvent silencieuse et est observée principalement dans le cas de primo-infection.

La phase d'invasion:

Elle débute 2 à 10 semaines après l'infection et traduit la réponse immuno-allergique à la migration sanguine et à la maturation des schistosomules dans les poumons. Elle est symptomatique essentiellement chez l'enfant et le voyageur non-immun. Elle est caractérisée par une fièvre élevée (fièvre de safari ou fièvre de Katayama) et est éventuellement associée à diverses manifestations: cutanées (urticaire), pulmonaires (toux), douleurs digestives (douleurs abdominales, diarrhée). Ces symptômes sont plus fréquemment observés au cours d'une primo-infection et peuvent durer de 2 à 12 semaines.

La phase de localisation digestive:

Elle s'exprime quelques mois à quelques années après le contact infectant. L'élimination des oeufs dans la lumière colique est une constante de toutes bilharzioses. Cependant, la gravité et l'intensité clinique varient selon l'espèce de schistosome. La gravité est fréquente et sévère pour *S. mansoni* mais rare et bénigne pour *S. haematobium*. L'infection par *S. mansoni* a un tropisme hépatique prépondérant tandis que *S. haematobium* n'induit que très rarement des lésions hépatiques cliniquement détectables.

De part la fragilisation de la muqueuse intestinale provoquée par le passage des oeufs de *S. mansoni*, la pathologie bilharzienne favorise bien souvent la pénétration et la virulence de nombreuses bactéries intestinales. En effet, la schistosomiase semble favoriser la morbidité des

shigelloses, salmonelloses et des infections à *Escherichia coli* entéro-toxinogène. Ces co-infections posent un problème majeur de santé publique dans les zones d'endémies comme nous l'avons montré dans la Région du Fleuve Sénégal (Rogerie *et al.*, 1997).

Les couples de vers adultes n'ont pas le même tropisme selon que la bilharziose est intestinale ou urinaire. Tandis que les couples de *S. mansoni* sont orientés vers les veines mésentériques inférieures où ils s'installent pour pondre les oeufs, ce phénomène se produit au niveau du plexus veineux vésicale pour *S. haematobium*. La pathologie qui est alors induite par la présence des oeufs est donc différente selon l'espèce considérée.

I.3.2) Tableau clinique de la Bilharziose intestinale à *S. mansoni*:

S. mansoni est l'espèce qui affecte le plus souvent le tube digestif avec la symptomatologie la plus marquée. Certains symptômes digestifs apparaissent trois mois environ après la contamination. La diarrhée est ainsi fréquente: les selles sont fréquentes, molles ou liquides et parfois sanguinolentes. L'évolution de l'atteinte intestinale peut disparaître spontanément et la diarrhée et les douleurs abdominales s'estompent en quelques mois.

Cependant, la pathologie la plus grave de cette bilharziose est représentée par l'atteinte hépatosplénique résultant de la formation de granulômes dans le foie, point de départ d'une fibrose.

I.3.2.a) Manifestations hépatiques

Le pronostic clinique de la bilharziose à *S. mansoni* est lié à l'atteinte hépatique. Les oeufs embolisés dans les veinules portes intra-hépatiques vont déclencher une réaction inflammatoire. Cette dernière, relayée par des lymphocytes T provoque un afflux de macrophages et d'éosinophiles qui vont, à terme, former le granulome bilharzien. Parmi les cytokines sécrétées par ces lymphocytes activés, certaines sont des substances chimioattractantes pour les fibroblastes (TGF β) ou d'autres induisent la synthèse de fibronectine et de collagène par ces cellules (TNF α) pour former le granulome (Wyler, 1992). C'est principalement la réponse inflammatoire de l'hôte qui conditionne la gravité de l'atteinte bilharzienne.

Une étude intéressante chez le singe a montré que le mode d'infestation conditionnait l'intensité de la réaction inflammatoire. En effet, une infestation massive unique engendre une réaction moins importante et donc une fibrose moins sévère, comparée à des expositions moins importantes mais multiples (Farah, 1997).

Au niveau de l'anatomopathologie, la lésion la plus fréquente est le granulome qui évolue vers une fibrose en "tuyau de pipe" dite "de Symmers". Cette fibrose entraîne une hypertension portale (HTP). A ce stade, on retrouve une fibrose des cloisons interlobulaires avec un phénomène de nécrose des hépatocytes mais l'architecture hépatique reste conservée. Une augmentation du flux sanguin splénique et une hypertension artérielle pulmonaire peut également survenir après une HTP.

L'examen clinique est longtemps normal. Les manifestations de l'HTP sont en règle générale tardive mais, une fois installée, l'HTP peut aboutir à la formation d'une circulation veineuse collatérale jusqu'à l'apparition de varices oesophagiennes. La maladie est souvent diagnostiquée à l'occasion d'une hémorragie digestive, source d'une forte mortalité.

I.3.2.b) Suivi médical de la pathologie : échographie hépato-splénique

L'échographie abdominale est un moyen non-invasif et fiable pour suivre l'évolution de l'atteinte pathologique de l'infection à *S. mansoni*. Différents critères des altérations échographiques ont été répertoriés par de nombreux spécialistes et ont été classés par l'OMS.

Deux types de classification ont été élaborées :

I. Grades échographiques : classification OMS, conférence du Caire (Egypte - 4/10/91)

Grades	0	1	2	3
Epaississement des vaisseaux portes (>3 mm)	0	+ / ++	+ / ++ / +++	++ / +++
Hauteur de la rate (>120mm)	0	0	+	+
Hauteur du lobe gauche du foie (>70 mm)	0	0 / +	+	+
Hauteur du lobe droit du foie (>140 mm)	0	0 / +	+	+
Calibre de la veine porte (>14 mm)	0	0	+	+
Calibre de la veine splénique (> 10 mm)	0	0	0	+
Présence d'une ascite	0	0	0	+

Le grade 1 semble peu spécifique d'une atteinte bilharzienne tandis que le grade 3 est caractéristique d'une pathologie hépatique sévère.

II. Score échographique : classification OMS. Atelier du Niger (Niamey - 26 octobre 1996)

Structures hyperéchogènes périphériques*	Absent = 0	Présent = 1	
Epaississement des vaisseaux portes	<2 SD [†] = 0	≥2 SD = 2	≥4 SD = 4
Veine porte (mesure diamètre interne)	<2 SD = 0	≥2 SD = 4	≥6 SD = 6
Veines collatérales	Absent = 0	Présent = 4	
Ascite dans l'abdomen	Absent = 0	Présent = 4	

* SHP : lésions ("spots") dans le parenchyme hépatique

[†]<2 SD = < valeur moyenne (sujets dans la zone d'étude) + 2 écarts-types

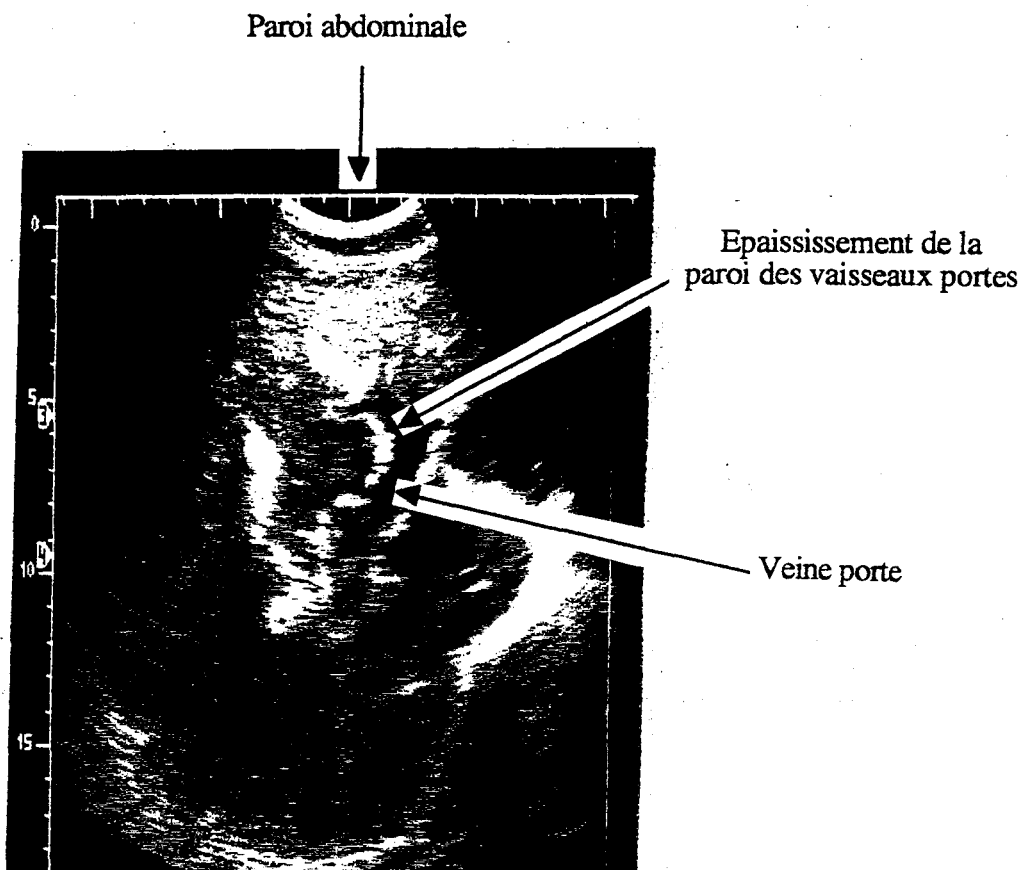
Score global individuel = index de sévérité

score = 0 : absence de pathologie

score = 1 : suspicion de bilharziose

score = 2-7 : lésions hépatiques dues à *S. mansoni*

score ≥ 8 : bilharziose hépatique avec hypertension portale

Exemple d'échographie hépatique d'un patient développant la pathologie:

La classification par score de Niamey est actuellement la plus utilisée sur le terrain et elle permet d'homogénéiser les observations qui sont bien souvent opérateurs-dépendantes.

Dans une étude récente chez une population infectée par *S. mansoni* au Sénégal, un nouveau score échographique prédictif de l'HTP a été établi en fonction de la présence de varices oesophagiennes (Bonnard *et al.*, soumis). En se basant sur la classification de Niamey, il comprenait l'augmentation de l'épaisseur des parois des vaisseaux portes, la dilatation des veines porte et splénique et l'aspect de la veine splénique pendant les mouvements respiratoires. L'échelle de score ainsi établie semblait être un bon témoin prédictif de développement de varices oesophagiennes.

Co-infections à tropisme hépatique

La pathologie bilharzienne survient fréquemment dans un environnement tropical où le système gastro-intestinale est déjà exposé à de nombreuses maladies infectieuses (parasites intestinaux, cholera, diarrhées bactériennes). De plus, la morbidité et la mortalité bilharzienne augmentent lorsque la maladie survient chez un patient porteur de virus de l'hépatite B ou C.

En effet, il a été montré chez des patients bilharziens que l'apparition d'une insuffisance hépato-cellulaire ou d'une ascite témoignait en règle générale d'une association avec une infection par le virus B ou C (Koshy *et al.*, 1993). La prévalence du VHC est plus élevée chez les patients infectés par *S. mansoni* que dans la population non infectée. Cette observation soulève l'hypothèse que l'immunodépression déclenchée par la schistosomiase pourrait diminuer l'arrêt spontané de la réplication virale et ainsi induire une propagation de l'infection virale VHB ou VHC (Ghaffar *et al.*, 1991). Les relations entre le virus VHB et la bilharziose semblent également importantes et sont probablement liées à une déviation de la réponse immunitaire engendrée par la présence du parasite chez l'hôte. En effet, il a été montré que la vaccination contre l'hépatite B était moins efficace chez les patients bilharziens (Bassily *et al.*, 1990). Les enfants nés de mères infectées par la schistosomiase répondaient également moins bien au vaccin contre l'hépatite B que les enfants nés de mère non infectée par la bilharziose (Ghaffar *et al.*, 1989).

I.3.3) Tableau clinique de la Bilharziose uro-génitale à *S. haematobium*

L'infestation par *S. haematobium* se manifeste en premier lieu par des troubles urinaires (hématurie) dont la gravité dépend principalement de l'intensité d'infection. Chez les enfants, les granulomes bilharziens représentent une réaction précoce et aiguë induisant des lésions urinaires très importantes pouvant aboutir à une uropathie obstructive et des ulcérations de l'uretère. En phase de chronicité, généralement chez les sujets âgés, on observe plus fréquemment une fibrose et une calcification de l'uretère et vésicale. Certaines lésions des voies urinaires sont réversibles chez l'enfant (après chimiothérapie) mais chez l'adulte, les lésions les plus importantes sont caractérisées par des calcifications vésicales et des atteintes reinales graves (dilatation, ou hydronéphrose).

L'atteinte du tube digestif est moins fréquente que lors d'une atteinte par *S. mansoni*. Néanmoins, l'infestation par *S. haematobium* peut aboutir à une atteinte rectale, souvent asymptomatique, comportant des lésions endoscopiques proches de celles observées au cours de la bilharziose intestinale. En zone d'endémie, les splénomégalies chroniques dues à *S. haematobium* sont observées et l'atteinte hépatique sous forme d'une fibrose périportale engendre quelquefois une hypertension portale.

I.3.3.a) Atteintes du tractus urinaire

L'ultrasonographie est une technique non invasive, sûre et efficace pour évaluer l'importance des lésions engendrées par la bilharziose urinaire. Elle peut être pratiquée sur le terrain avec du matériel portable et présente l'avantage de pouvoir être mise en oeuvre facilement pour les enquêtes de morbidité. L'échographie de l'appareil urinaire semble plus fiable pour caractériser la pathologie spécifique à *S. haematobium*, comparativement aux nombreuses difficultés rencontrées dans l'évaluation échographique de la morbidité à *S. mansoni*.

Comme pour *S. mansoni*, l'importance de la pathologie urinaire est évaluée par des critères échographiques, classés en grades ou en score:

I. Grades échographiques : classification OMS (Le Caire - 1992)

Grade 0 = absence de lésions de la vessie

Grade 1 = épaissement irrégulier de la paroi de la vessie

Grade 2 = excroissances (pseudolypes) de la paroi de la vessie

Grade 3 = calcification de la vessie

Grade 4 = dilatation de l'uretère jusqu'au rein et hydronéphrose

II. Scores échographiques : classification Atelier du Niger (Niamey - 26 octobre 1996)

Vessie

Forme de la vessie:

0 = normal (rectangulaire)

2 = arrondie (déformée)

Épaississement de la paroi:

0 = normal

1 = épaissement localisé ≥ 5 mm

2 = épaissement ≥ 5 mm multifocal ou diffus

Irrégularités de la face interne de la paroi:

0 = absence

1 = irrégularités localisées

2 = irrégularités multifocales ou diffuses

Masses : irrégularités localisées de la paroi > 10 mm (dans la lumière vésicale)

2 = unique

n+2 = multiples

Pseudolypes : excroissance de la paroi

2 = unique

n+2 = multiples

Uretères

Degré de dilatation

0 = absent, non visualisé

3 = dilaté

4 = fortement dilaté

Reins

Stade d'hydronéphrose de chaque rein

0 = rein non visible ou sinus rénal fusiforme

6 = dilatation modérée (> 2 cm de parenchyme)

8 = dilatation sévère (< 2 cm ou absence de parenchyme)

Score global individuel = index de sévérité

score ≤ 1 : bilharziose urinaire peu probable

score = 2 : bilharziose urinaire probable

score ≥ 3 : bilharziose urinaire très probable - possibilité d'une pathologie sévère

I.3.3.b) Complications de la pathologie à *S. haematobium*

L'infection par *S. haematobium* peut non seulement entraîner un dysfonctionnement de l'arbre urinaire mais également, de part la localisation de la pathologie qu'elle induit, elle peut provoquer de nombreuses complications. De plus, il a été reporté que cette infection pouvait entraîner des lésions importantes au niveau du système nerveux central (Pollner *et al.*, 1994). En effet, la présence d'oeufs au niveau du cerveau peut induire l'apparition de lésions inflammatoires destructives des tissus du cerveau et de la moelle épinière.

- Infection bactérienne urinaire:

Dans les régions endémiques, la présence d'une infection par *S. haematobium* semble prédisposer les sujets à des infections bactériennes urinaires (Abdalah, 1946). Une charge bactérienne plus importante est en effet retrouvée chez des individus dont les urines contiennent des oeufs comparativement à ceux qui n'en ont pas (Sunyer *et al.*, 1965).

- Pathologie génitale et stérilité:

L'infiltration par des oeufs de *S. haematobium* du petit bassin et des différents tissus conjonctifs de l'appareil génital féminin est souvent observée en zones d'endémie. La stérilité y est fréquente, notamment en Afrique, puisqu'il existe des régions entières où plus du quart de la population féminine présente cet état pathologique. Il apparaît néanmoins très difficile d'attribuer à la bilharziose seule un rôle important comme cause de stérilité, car d'autres infections chroniques sont souvent concomitantes à une schistosomiasé (Wright *et al.*, 1982). Récemment, il a été montré chez des femmes infectées par *S. haematobium* que l'intensité d'infection bilharzienne était fortement associée à l'apparition de lésions importantes du col de l'utérus (Poggensee *et al.*, 2000). De plus, le dépôt des oeufs semble fragiliser l'épithélium du col de l'utérus et la présence d'une schistosomiasé génital peut être considérée comme un facteur de risque pour l'expansion des maladies sexuellement transmissibles, telles que le VIH (Feldmeier *et al.*, 1994).

L'appareil génital masculin peut être également infiltré par les oeufs de *S. haematobium* ce qui peut aboutir à une prostatite ou une hémospérmié (Corachan *et al.*, 1995). On a récemment observé à Madagascar la présence d'oeufs de *S. haematobium* dans le sperme d'hommes infectés (dans 43 % des cas) (Leutscher *et al.*, 2000). Les auteurs suggèrent également que le dépôt des oeufs dans les organes génitaux mâles pourraient induire une forte inflammation locale accompagnée d'une accumulation de lymphocyte, d'éosinophiles et d'autres cellules immunitaires du sang. Chez des individus infectés par le VIH, ce phénomène pourrait augmenter la charge virale dans le sperme et favoriserait la transmission de ce virus.

- Cancer de la vessie:

La distribution géographique concordante de la bilharziose urinaire et celle du cancer de la vessie concordent et confirment un lien étiologique entre les deux maladies. Les lésions focales graves dues à *S. haematobium* évoluent vers la chronicité et peuvent provoquer un cancer qui apparaît 20 ans à 30 ans après la primo-infection, en zone d'endémie (Lucas, 1982). C'est le cancer vésical de type épithélioma spinocellulaire qui se rencontre dans les pays d'Afrique et de la Méditerranée Orientale. En Egypte, le cancer associé à la bilharziose est le plus fréquent de tous les cancers chez l'homme. L'ensemble des cancers de la vessie sont observés plus fréquemment chez les hommes que chez les femmes dans la plupart des zones endémiques, avec un âge moyen de 40 ans.

I.4) Le diagnostic:

Pour diagnostiquer la présence d'une schistosomiase, de nombreuses techniques et approches différentes peuvent être utilisées au niveau de l'individu comme de la population. Le diagnostic peut être basé sur la mise en évidence de l'infection, l'observation des symptômes ou sur la détection des marqueurs de morbidité, comme par exemple l'hématurie dans l'infection à *S. haematobium*. Comme nous venons de le décrire dans la partie traitant des pathologies bilharziennes, la morbidité de l'infection est également décelable à l'échographie.

La mise en place de questionnaires est en pleine évolution sur le terrain et la pertinence des résultats est souvent comparée avec les méthodes classiques de diagnostic. L'utilisation d'un questionnaire permet une identification rapide de l'infection dans les populations fortement exposées. Le questionnaire inclut de nombreux renseignements concernant les habitudes quotidiennes des populations (lieu des bains pour le travail, les tâches ménagères ou les loisirs; heures du contact à l'eau; endroit des déjections...). Il est souvent utilisé dans le cadre des programmes nationaux de contrôle de la schistosomiase et dans les études de contact (Mafe *et al.*, 2000).

I.4.1) Méthodes indirectes non spécifiques:

Infection à *S. mansoni*:

L'hyperéosinophilie sanguine est souvent utilisée mais elle est inconstante selon les phases parasitaires (Klotz, 1991). Elle peut être augmentée de 15% en cas de bilharziose mais n'a qu'une valeur d'orientation dans le diagnostic (Gentilini, 1993). Des perturbations de l'immunité cellulaire sont très fréquentes avec une baisse des lymphocytes T CD4+ et une augmentation des taux sériques de β 2-microglobuline (Feildmeir *et al.*, 1986). L'activité sérique des enzymes hépatiques telles que les transaminases et les phosphatases alcalines peut être utilisée pour le contrôle de la pathologie (Ahmed *et al.*, 1996).

Infection à *S. haematobium*

La présence d'une hématurie, d'une protéinurie ou leucocyturie est une méthode pratique et rapide grâce à l'utilisation de bandelettes spécifiques trempées dans les urines. Un fort score pour ces trois paramètres a été montré chez des patients infectés par *S. haematobium* avec une forte sensibilité (Gundersen *et al.*, 1996). Mais, ces facteurs ne sont pas spécifiques d'une

bilharziose car ils sont augmentés lors d'une infection bactérienne urinaire, assez fréquente dans les régions endémiques pour le parasite (Verlé *et al.*, 1994).

La numération des cellules immunitaires (neutrophiles, leucocytes, éosinophiles) reflète l'inflammation urinaire. Seule la mesure des éosinophiles dans les urines apparaît spécifique d'une bilharziose urinaire (Eltoum *et al.*, 1992). Mais cette technique est relativement lourde et la nécessité de développer une méthode indirecte de l'éosinophilie urinaire a été mise en place. Cette méthode indirecte consiste dans le dosage de l'Eosinophil Cationic Protein (ECP), protéine contenue dans les granules des éosinophiles.

Le dosage de l'ECP dans les urines semble représenter non seulement un marqueur de l'infection mais principalement un marqueur de morbidité de la bilharziose urinaire (Vennervald *et al.*, 1994). En effet, la quantification de l'ECP est largement associée à l'éosinophilie dans les urines de patients infectés par *S. haematobium* (Reimert *et al.*, 2000). Ces mêmes auteurs indiquent également une forte corrélation positive entre le dosage de l'ECP et la sévérité de la pathologie vésicale, évaluée par échographie. Alors que l'ultrasonographie est utilisable pour la caractérisation de la morbidité à un stade avancé, la détection de l'ECP dans les urines semble de plus être un marqueur adéquat pour mesurer les réactions inflammatoires précoces de l'infection. Il a été décrit au Kenya que l'ECP était un excellent marqueur de l'évolution de la morbidité suite à la chimiothérapie anti-bilharzienne (Reimert *et al.*, 1997). Un des avantages principaux de l'ECP est donc que sa détection est reconnue pour être un des premiers marqueurs de réinfection avant même la réapparition des oeufs dans les urines, 6 mois après le traitement.

Une technique ELISA de détection à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-ECP est maintenant largement utilisée (Reimert *et al.*, 1991) et le développement de bandelettes spécifiques est actuellement en cours. A terme, l'utilisation de ces bandelettes réactives apparaît importante et pratique pour évaluer le taux d'ECP directement sur le terrain.

I.4.1) Méthodes spécifiques:

- Sérodiagnostic:

Cette technique utilise des antigènes totaux purifiés des parasites. Elle est sensible et spécifique, bien qu'il existe des réactions croisées avec d'autres helminthoses (Core *et al.*, 1988). L'hémagglutination, l'immunoélectrophorèse et l'immunofluorescence indirecte donnent de bons résultats. La technique ELISA reste la méthode de choix avec une sensibilité de 98% et une spécificité de 95% (Robert *et al.*, 1984). Cependant, cette méthode est difficilement applicable sur le terrain et ne permet pas d'évaluer l'intensité d'infection.

- Evaluation de l'intensité d'infection:

Le diagnostic basé sur la mise en évidence d'oeufs dans les selles et les urines de l'hôte constitue la technique la plus courante pour démontrer la présence de l'infection et reste la référence pour toutes les autres techniques de diagnostic. Les principaux avantages de cette approche sont, d'une part, le fait que le diagnostic parasitologique présente une spécificité d'environ 100% et d'autre part, qu'il est quantitatif ce qui permet d'évaluer l'intensité d'infection. De plus, il est simple d'exécution sur le terrain et peu coûteux.

Pour la détection des oeufs de *S. mansoni* dans les selles, la méthode de Kato est la plus utilisée (Katz et al., 1972) et nécessite une lecture en duplicata de cinq échantillons de selles différents pour une meilleure sensibilité. Les résultats sont exprimés en nombre d'oeufs par gramme de selles (EPG).

Le diagnostic de l'infection à *S. haematobium* est évalué par le comptage des oeufs dans les urines des patients après filtration urinaire. C'est la méthode de référence mais elle peut présenter (tout comme la technique du Kato) l'inconvénient que la présence des oeufs dans les urines peut varier fortement d'un jour à l'autre et même en fonction de l'heure du prélèvement (Van Etten *et al.*, 1997). Les résultats sont ici exprimés en nombre d'oeufs dans 10 ml d'urine (nommé FU).

- Détection des antigènes circulants : évaluation de la charge parasitaire

Ce type de diagnostic reflète directement l'intensité de la charge parasitaire et semble très spécifique des bilharzioses. Deelder *et al.*(1989), ont développé une technique destinée à quantifier la présence des antigènes circulants de schistosome dans le sang ou l'urine grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques. A l'heure actuelle, seul les anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes de *S. mansoni* ont été produits. Néanmoins, ils peuvent détecter la présence d'une infection à *S. haematobium* avec une spécificité de 40 à 96% (De Clercq *et al.*, 1997).

Les tests les mieux étudiés sont ceux qui reposent sur la détection de deux antigènes glycoconjugués associés à l'intestin du parasite : le CAA (Circulating Anodic Antigens) et le CCA (Circulating Cationic Antigens). Le dosage du CAA dans le sang et celui du CCA dans les urines semblent apporter la plus grande spécificité et sensibilité (Al Sherbiny *et al.*, 1999). Toutefois, la sensibilité est, de même que pour le diagnostic parasitologique, influencée par l'intensité d'infection et peut varier de 30 à 100 % selon les foyers d'infection (De Clercq *et al.*, 1997). En particulier, la positivité du test peut être perdue chez des individus faiblement infectés et la détection de ces antigènes, notamment dans les urines, varie en fonction du jour de prélèvement (résultats observés sur 6 jours consécutifs) (Van Etten *et al.*, 1997).

I.5) Les moyens de lutte contre les schistosomiases:

Les objectifs prioritaires de la lutte anti-bilharzienne sont double:

- la rupture de la chaîne de transmission en intervenant au niveau des différents éléments du cycle parasitaire
- la prévention du développement de la morbidité bilharzienne

A l'heure actuelle et avant le développement d'une stratégie vaccinale, il s'agit de combiner, de façon appropriée, les armes disponibles suivantes:

- la réduction des risques d'infestation (éducation pour la santé, assainissement)
- la destruction des mollusques et la modification de l'environnement
- le contrôle du réservoir animal
- la chimiothérapie des sujets infectés ou le traitement de masse des populations

I.5.1) L'éducation pour la santé et les mesures d'hygiène

L'éducation pour la santé a pour objectif de promouvoir et de renforcer des comportements favorables pour la santé des populations, notamment en insistant sur l'utilisation de l'eau, élément indispensable (travail, tâches ménagères, pratiques religieuses...). Un programme d'éducation pour la santé est développé par de nombreux organismes internationaux et par les gouvernements des pays touchés mais sa mise en place sur le terrain s'avère difficile. Même si les différentes populations exposées dans le monde possèdent leurs propres coutumes et un "rapport avec l'eau" différent, l'OMS a publié en 1990 un ouvrage visant à aider les pays concernés et à élaborer un programme d'éducation pour la lutte contre la schistosomiase.

L'éducation pour la santé ne doit pas heurter la culture locale et doit tenir compte de la façon dont la maladie est perçue par les populations. La participation communautaire est essentielle dans tout programme de lutte. Une stratégie globale, incluant une politique d'assainissement du milieu, le dépistage de l'infection puis le traitement des populations infectées ainsi qu'une éducation sanitaire a déjà prouvé son efficacité à Porto Rico et en Arabie Saoudite. Mais en raison du coût de cette stratégie et des dispositions difficiles à mettre en place sur le terrain, elle n'a pas pu s'étendre à l'ensemble des pays touchés par la Schistosomiase (OMS, 1999).

L'adduction d'eau et la latrinitisation des villages semblent également importantes pour réduire la prévalence de l'infection. Ces procédés ont pour objectif d'améliorer les conditions sanitaires, la salubrité de l'eau et de réduire au minimum les contacts avec l'eau contaminée. Il

faut pour cela adopter une stratégie globale qui prenne en compte l'approvisionnement en eau des villages, l'évacuation des déjections, le drainage des eaux domestiques. Malheureusement, ces réalisations sont très onéreuses et sont ainsi difficilement réalisables dans les pays en voie de développement sans l'aide d'organismes internationaux (OMS, Fonds Européen de Développement, Banque Mondiale,...).

I.5.2) Lutte contre l'hôte intermédiaire:

Cette lutte anti-vectorielle vise à interrompre le cycle aquatique du parasite en détruisant les mollusques. Elle représente une méthode de choix pour enrayer la transmission de la schistosomiase mais elle présente de nombreux désavantages écologiques sur le biotope.

- Molluscicides chimiques

Leur intérêt dans la lutte anti-vectorielle semble dépendre des conditions épidémiologiques et écologiques rencontrées sur le terrain. L'utilisation de fortes doses de molluscicides dans toute une zone agricole est une méthode extrêmement coûteuse et probablement dangereuse pour la faune et la flore du milieu. L'utilisation peut se limiter à l'intérieur de collectivités où l'infection est élevée mais il apparaît difficile de choisir le lieu et le calendrier de la mise en place de cette stratégie car les endroits de contacts humains avec les eaux contaminées peuvent être dispersés et dépendent des saisons.

Ainsi, aucun molluscicide ne constitue à l'heure actuelle une réelle innovation et ne montre une grande efficacité. Seul le Niclosamide est souvent utilisé dans les programmes de lutte mais induit de nombreux risques écologiques. Ce procédé reste non spécifique des gastéropodes et doit être renouvelé fréquemment pour empêcher une éventuelle recolonisation des sites par le mollusque. De part son coût très élevé, cette approche anti-vectorielle n'est pas envisageable à grande échelle même si, actuellement, des études se poursuivent pour que son utilisation n'entraîne aucun risque écologique.

- Aménagement de l'environnement:

Certaines actions locales ont été mises en place afin de modifier le biotope naturel des mollusques (vase, roseau). Ainsi, la construction de canaux d'irrigation cimentés (vallée du Fleuve Sénégal et du Nil), l'assèchement de marécages et l'élimination de la végétation des plans d'eau ont entraîné une diminution du nombre de mollusques. L'aménagement de l'environnement en Chine, au Japon et aux Philippines a joué un rôle non négligeable contre *S. Japonicum*.

I.5.3) La chimiothérapie anti-bilharzienne:

L'objectif principal du traitement est de réduire l'infection bilharzienne chez l'hôte définitif et ainsi de prévenir l'apparition de la pathologie.

Depuis de nombreuses années, trois médicaments ont été utilisés. Le métrifonate, actif sur *S. haematobium* uniquement, est bon marché mais semble peu efficace. L'oxamniquine n'agit que sur *S. mansoni* et donne de bons résultats. Le praziquantel, actif sur toutes les espèces, est maintenant le médicament de choix mais c'est aussi le plus onéreux.

I.5.3.a) Les médicaments:

- Métrifonate Bilarcil® (Bayer)

En comprimé de 100 mg, il agit par inhibition de l'acétylcholinestérase des parasites. Il est actif seulement sur *S. haematobium*. Il est utilisé à la posologie de 10 mg/kg, par voie orale, avec deux ou trois cures à quinze jours d'intervalle. Il est bien toléré et peu coûteux. Utilisable en traitement de masse, la spécificité étroite de ce produit en limite l'emploi et ce médicament a été récemment retiré du marché (OMS, 1999).

- Oxamniquine Vansil® (Pfizer)

Le principe actif de ce médicament, présenté sous forme de gélules dosées à 250 mg, est un dérivé de la tétrahydroquinoline. C'est un schistosomicide qui agit sur les vers mâles immatures par un effet paralysant sur la musculature des parasites. Son action provoque la stérilité des vers femelles ce qui entraîne un arrêt de la ponte ovulaire. Il est administré par voie orale à la dose unique de 15-25 mg/kg. Des posologies plus élevées (60 mg/kg répartis sur deux à trois jours) sont nécessaires contre les souches de *S. mansoni* africaines plus difficiles à traiter avec ce médicament que les souches américaines. Des cas documentés de résistance à l'oxamniquine ont été rapportés (Cioli *et al.*, 1983). Son spectre est limité à *S. mansoni*, avec une efficacité clinique de 85 à 95 %. Des effets secondaires peuvent être observés tels que la somnolence, des vertiges et des nausées.

Il fut le médicament de choix du programme national brésilien de lutte pendant les 20 dernières années. Au cours des dernières années, le prix de l'oxamniquine n'a pas baissé autant que celui du praziquantel, de sorte que ce dernier médicament pourrait remplacer l'oxamniquine même au Brésil. Du fait de la baisse de la demande, la production de l'oxamniquine pourrait s'arrêter, comme cela s'est produit pour le métrifonate. Cela pourrait conduire à une situation dangereuse car le praziquantel resterait le seul médicament disponible contre la schistosomiase, avec de très graves conséquences en cas d'apparition d'une résistance du parasite.

- Artesunate:

L'artémisinine et ses dérivés (artésunate, arteméthère) sont connus pour être des médicaments actifs contre la malaria (White *et al.*, 1994). Leur administration par voie orale (12 mg/kg) est parfaitement tolérée. Il a été montré que son administration (6 mg/kg tous les 15 jours) induisait une baisse de l'infection à *S. japonicum*, dans un foyer chinois de haute endémie (Whang *et al.*, 1997).

Récemment, il a été montré au Sénégal qu'une dose totale de 12 mg/kg d'artésunate (4 mg/kg le premier jour, suivi de 2 mg/kg pendant 4 jours) induisait une réduction de la charge en oeufs de *S. mansoni* (54%). Cette réduction était équivalente à celle observée avec l'utilisation du praziquantel dans cette région de forte endémie (De Clercq *et al.*, 2000). Chez la souris infectée par *S. mansoni*, il a été démontré que l'effet thérapeutique de l'artésunate était principalement dirigé contre les vers immatures (85% de réduction) comparativement aux vers matures (30 % de réduction) (Xiao *et al.*, 1989).

L'association entre l'artésunate et le praziquantel (seulement efficace contre les vers adultes) est actuellement testée dans un village de la région du Fleuve Sénégal. De plus, dans des zones où le paludisme et la bilharziose sont endémiques, l'artésunate pourrait être un médicament de choix dans le contrôle de ces deux maladies parasitaires.

- Praziquantel Biltricide® (Bayer Pharma)

Une des avancées majeures en matière de lutte contre les schistosomiasés concerne la découverte de l'activité schistosomicide du praziquantel (PZQ), molécule développée à l'origine comme anxiolytique (Andrews, 1985). Cette molécule est une pyrazinoisoquinoline qui interfère avec le métabolisme glucidique du parasite, entraînant des lésions musculaires et tégumentaires. Le mode d'action est mal connu mais il semble que l'ensemble des atteintes portées aux vers se fasse via un influx massif d'ions Ca^{2+} (Redman, 1996). Cette action s'accompagne d'altérations du métabolisme des vers tels qu'une baisse d'incorporation du glucose, de relargage de lactate et des réserves de glycogène et d'ATP.

Il est actif sur toutes les espèces de schistosomes humains à la dose unique de 40 mg/kg (voie orale), avec des taux de guérison de 60 et 90 % (prévalence) et une baisse de 90 à 95 % du nombre moyen d'oeufs excrétés. Il est actif également pour d'autres trématodosés, mais aussi dans les cestodosés. Cependant, l'administration du PZQ peut induire des effets secondaires transitoires tels que des troubles digestifs, des céphalées, une somnolence ou de l'urticaire. Il est relativement bien toléré dans les bilharziosés sévères mais par prudence, il n'est pas prescrit à la femme enceinte ou allaitante.

I.5.3.b) Une synergie entre le PZQ et les réponses immunes de l'hôte

L'efficacité d'un traitement au PZQ semble dépendre du développement et de l'action des réactions immunitaires de l'hôte. Ainsi, elle semble réduite dans des populations nouvellement infectées au Sénégal qui n'ont pas encore développées une immunité naturelle importante, contrairement aux populations de foyers chroniques (Stelma *et al.*, 1995). Des évidences directes de l'action combinée entre PZQ et réponse immune sont venues d'expériences chez des souris déprimées en cellules B ou T, chez qui l'efficacité du PZQ diminuait fortement (Brindley *et al.*, 1987; Sabah *et al.*, 1985). Une chimiothérapie efficace est de plus restaurée par un transfert passif à ces animaux de sérum de lapin immunisé avec du SWAP (Fallon *et al.*, 1995).

Le traitement par le PZQ, quand à lui, modifie la réponse immune de l'hôte par son action directe sur les vers. En effet, le PZQ est capable de démasquer et d'exposer à la surface du parasite certains antigènes cryptiques. En particulier, certaines enzymes nécessaires à la détoxification du parasite, telles que des phosphatases alcalines et la glutathion *S*-transférase de 26 kDa de *S. japonicum* sont alors exposées et deviennent plus accessible aux anticorps spécifiques (Fallon *et al.*, 1994; Mc Tighe *et al.*, 1995). Récemment chez des souris infectées, il a été montré que la GST de 28 kDa de *S. mansoni* (Sm28GST) pouvait également être démasquée (Dupré *et al.*, 1999). Ce phénomène provoque non seulement une forte augmentation mais également une orientation de la réponse immune spécifique préalablement induite par une immunisation avec la Sm28GST. La conséquence est alors la survie des animaux associée à la réduction de la pathologie.

I.5.3.c) Les limites de la chimiothérapie:

La chimiothérapie anti-bilharzienne présente l'inconvénient majeur de ne pas prévenir la réinfection. Or, en zone d'endémie, la réinfection est pratiquement quotidienne et les oeufs sont retrouvés dans les selles ou les urines, seulement trois à six mois après un traitement. Il n'est pas rare d'observer que l'intensité d'infection est revenu à un taux initial un an après le traitement. Ceci implique que le contrôle de l'infection par cette chimiothérapie nécessiterait plusieurs traitements dans une seule année pour devenir efficace. Par son coût et ses nombreuses contraintes logistiques, cette approche est peu réalisable dans la plupart des pays endémiques. De plus, cette stratégie pourrait induire de nouvelles formes de résistance à la chimiothérapie comme il l'a été décrit après l'utilisation du PZQ ou de l'oxamniquine (Fallon *et al.*, 1996).

En effet, des taux de guérison très faible ont été rapportés avec le PZQ au Sénégal au début des années 1990, dans un foyer récent d'infection à *S. mansoni* (Stelma *et al.*, 1995).

Une augmentation de la dose à 60 mg/kg n'a pas amélioré sensiblement ces taux de guérison, tandis que l'oxamniquine était efficace aux taux attendus. La notion d'une résistance au PZQ chez l'homme était née.

De plus, la souche parasitaire issu de ce foyer sénégalais semblait présenter une certaine forme d'insensibilité intrinsèque au PZQ. En effet, les gastéropodes infectés recueillis dans cette région ont donné des schistosomes réfractaires au traitement, après passage chez la souris (Fallon *et al.*, 1995). De plus, un isolat présentant une résistance au PZQ a été obtenu à partir de parasite préalablement sensible mais soumis à des passages répétés chez des souris sous pression médicamenteuse (Fallon *et al.*, 1994). Mais il a été suggéré qu'une telle résistance pouvait être expliquée par la lenteur de la maturation de l'isolat sénégalais. De nombreuses expériences chez l'animal devront donc être réalisées pour confirmer ou infirmer l'existence d'une résistance intrinsèque du schistosome au PZQ.

Par opposition à certaines constatations suggérant l'existence d'isolat résistant, des études épidémiologiques réalisées ultérieurement dans la même région du Sénégal semblaient indiquer que la possibilité d'une résistance au PZQ avait été avancée hâtivement. En effet, ces études montraient que des taux faibles de guérison pouvaient être attendus lorsque la charge parasitaire est particulièrement élevée ce qui est observée dans cette région de forte endémicité (OMS, 1999). Dans ce cas, même avec une efficacité thérapeutique de 90 à 95 %, certains schistosomes survivront et continueront à pondre des oeufs. Par ailleurs, le taux de transmission extrêmement élevé dans cette zone sénégalaise pourrait augmenter la probabilité pour un individu d'être infecté une à cinq semaines avant le traitement, et donc d'héberger des parasites immatures (insensibles au PZQ). En effet, une dose unique donnait un taux de guérison faible dans une région voisine, mais une deuxième dose administrée 40 jours plus tard (lorsque tous les vers immatures sont devenus des adultes sensibles au PZQ) a donné le taux de guérison attendu (De Clercq *et al.*, 1998).

Même si certains isolats de schistosomes seraient moins sensibles au PZQ, la résistance au PZQ ne semble pas avoir été clairement démontré. Rien ne justifie donc de recommander une réduction de l'utilisation du PZQ mais une vigilance constante est nécessaire pour surveiller l'émergence possible d'une pharmacorésistance.

Une autre limite importante de la chimiothérapie vient de données récemment observées dans des foyers d'infection mixte à *S. mansoni* et *S. haematobium* qui émergent dans la partie ouest de la vallée du Fleuve Sénégal. En effet, il a été montré dans un village que le traitement au PZQ était totalement efficace sur l'espèce *S. haematobium* tandis qu'une augmentation dramatique (un facteur 7) de l'intensité d'infection à *S. mansoni* était observée (Ernould *et al.*, 1999). Dans un village voisin, le PZQ ne semblait avoir aucune efficacité sur l'infection à *S. mansoni* (intensité d'infection similaire avant et cinq semaines après le traitement) alors que l'infection à *S. haematobium* était fortement diminuée.

Dans la même région du Fleuve Sénégal, le phénomène inverse a pu être observé (De Clercq, communications personnelles). En effet, un traitement au PZQ semblait être totalement inefficace pour l'espèce *S. haematobium* tandis qu'il induisait une réduction de l'intensité d'infection à *S. mansoni* (village de N'Dioungue M'Beresse). Ces observations pourraient être liées à la particularité de ce foyer sénégalais qui apparaît fortement endémique pour les deux types de bilharziose. Cette particularité sera présentée dans le prochain chapitre.

Les nombreux moyens de lutte contre les schistosomiasés semblent présenter des limites d'efficacité importante. La bilharziose demeure un problème de santé publique mondial en particulier en Afrique subsaharienne car très peu de pays y ont entrepris une lutte chimiothérapique durable. De plus, la construction d'ouvrages de mise en valeur des ressources en eau pour répondre aux besoins en énergie électrique et au développement de l'agriculture a conduit à une augmentation de l'infection. A ce titre, le cas du Sénégal est un exemple frappant d'un foyer devenu endémique après la construction du barrage hydraulique de Diama.

La lutte définitive contre la schistosomiase ne pourra résulter que de l'utilisation de stratégies multiples et associées, s'appuyant notamment sur des outils modernes de l'immuno-intervention préventive et/ou thérapeutique. Le développement d'une stratégie vaccinale intégrée aux moyens de lutte, et notamment à la chimiothérapie, constitue donc l'espoir principal pour contrôler les schistosomiasés et prévenir les pathologies graves qu'elles induisent.

Le travail de cette thèse s'inscrit dans cette démarche. En effet, l'objectif de nos travaux est d'évaluer l'acquisition et la maturation de la réponse immune spécifique à un candidat vaccinal chez des populations infectées par la schistosomiase.

La suite de l'introduction nous permet de présenter plusieurs points essentiels à notre démarche:

- le lieu de notre étude : la vallée du Fleuve Sénégal
- les connaissances actuelles sur la réponse immune de l'hôte au cours de la bilharziose
- le développement des stratégies vaccinales contre les schistosomiasés

II) Les schistosomiasés dans la vallée du Fleuve Sénégal : une endémie particulièrement dramatique

La schistosomiasé urinaire est depuis longtemps endémique dans le région du fleuve Sénégal. En 1986, le barrage de Diama a été mis en service sur le fleuve Sénégal afin d'empêcher la remontée des eaux marines dans la vallée. Parallèlement à la mise en valeur des ressources en eau douce, l'endémie de la schistosomiasé urinaire a fortement augmentée dans le bassin du Fleuve Sénégal et de nombreux foyers infectieux sont apparus.

En outre, une véritable épidémie de schistosomiasé intestinale due à *S. mansoni* a touché la région du Fleuve, en particulier la région de St-Louis (districts de Richard-Toll et Dagana, cf. carte de la région). Les premiers cas d'infection à *S. mansoni* ont été découverts à Richard-Toll en 1988. Depuis, la prévalence (pourcentage d'individus infectés) dans cette ville et aux environs a progressivement augmenté pour passer de 42 % en 1989 à 80-90 % en 1997. Il n'est pas rare de rencontrer des villages où 100 % des habitants sont infectés. Dans le reste de la région, des enquêtes récentes ont fait état de taux moyens de prévalence de 90 % autour du lac de Guiers (lac intérieur communiquant avec le fleuve Sénégal), de 60 % dans les villages proches du fleuve, et de 30 % dans les villages un peu plus éloignés. Ces enquêtes ont également révélées de fortes intensités d'infection et une apparition très rapide des formes graves de la maladie.

La rapidité et l'intensité extrême de la progression de l'épidémie sont dues non seulement à la propagation de l'hôte intermédiaire grâce à la retenue d'eau douce liée au barrage, mais également à la compatibilité très forte entre le mollusque aquatique et le parasite, ce qui se traduit par des taux de transmission extrêmement élevés. Enfin, les forts déplacements de population, liés au développement important de l'agriculture dans cette région nouvellement dotée d'infrastructures hydrauliques, ont amplifié la propagation de l'infection.

Du fait de l'extension rapide de la schistosomiasé dans cette région, des programmes de lutte ont été financés et mis en oeuvre par l'état Sénégalais en collaboration avec des organismes internationaux tels que le Fond Européen de Développement ou la Banque Mondiale. L'outil principal de lutte est la chimiothérapie, réalisée dans le cadre de la prise en charge des personnes infectées dans les services de santé et par le traitement ciblé des écoliers. Dans la région de St-Louis, le traitement est appliqué en fonction du niveau de l'endémie: traitement de masse où la prévalence est égale ou supérieure à 50 % chez les enfants scolarisés et traitement ciblé des enfants dans les communautés où la prévalence est de 20 à 49 %.

La lutte antivectorielle (surveillance malacologique et nettoyage des sites de transmission) et la promotion de l'approvisionnement en eau saine et de l'assainissement sont considérées comme des stratégies secondaires par le programme national de lutte.

Après avoir dépister les premiers cas d'infection à *S. mansoni* à Richard-Toll en 1988 et suite à la demande des autorités sénégalaises, la mise en place du programme ESPOIR (European Special Programme for Operational and Integrated Research) a été initiée en 1990 par le Professeur André CAPRON de l'Institut Pasteur de Lille. Ce programme est intégré dans les structures de santé de l'état sénégalais et a comme objectif principal la recherche scientifique de nouveaux moyens de lutte contre la bilharziose. Il s'articule autour de plusieurs thématiques complémentaires:

- Etudes épidémiologiques et malacologiques de l'évolution de l'infection dans la vallée du Fleuve Sénégal
- Amélioration des protocoles de chimiothérapie
- Etudes immuno-épidémiologiques dans le cadre de stratégies vaccinales.

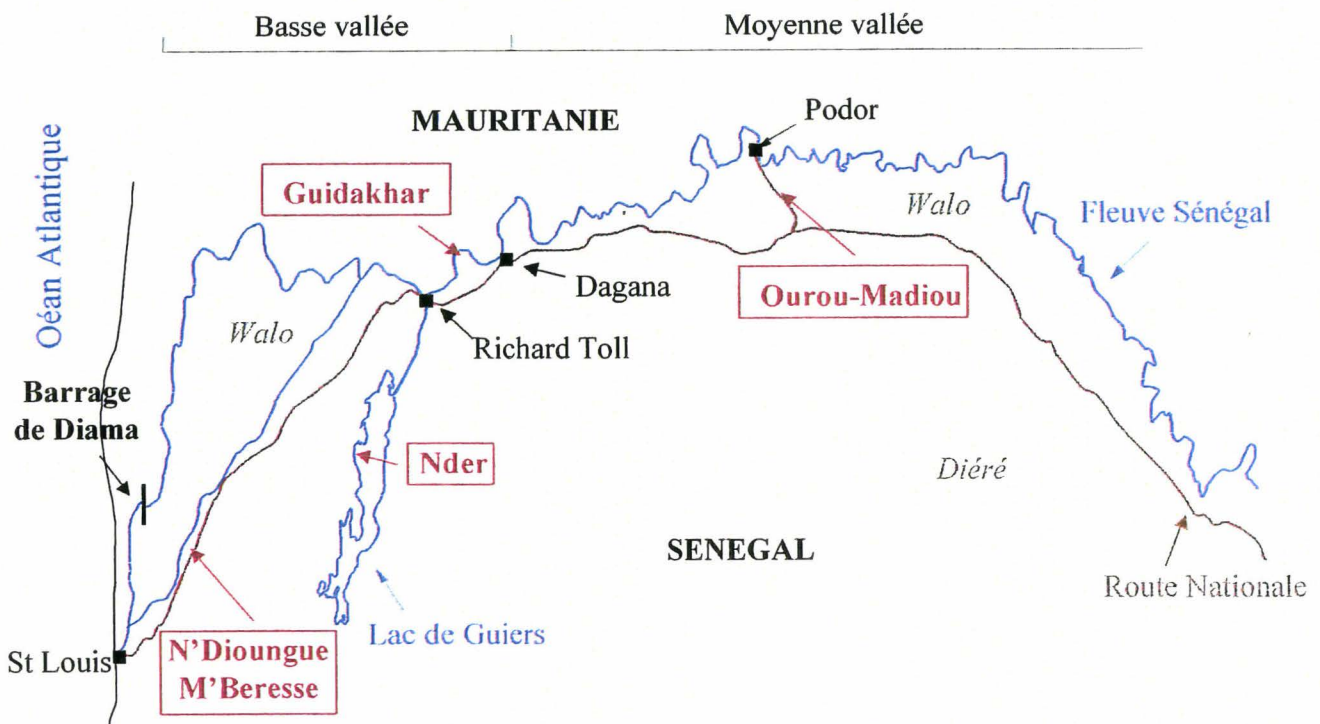
II.1) La Région du Fleuve Sénégal:

Cette région est située au Nord du pays dont le fleuve Sénégal représente la frontière naturelle avec la Mauritanie et le Mali (cf. carte ci-dessous).

La population de l'ensemble du bassin du fleuve était estimée à 1 700 000 personnes en 1987. Les ethnies Wolof, Toucouleur, Soninke, Peul et Maure sont les plus importantes dans cette région. Majoritairement rurale, la population est soumise depuis la construction des infrastructures hydrauliques à des migrations internes qui touchent une part importante de la population active masculine. Ces déplacements contribuent à l'accroissement de la population urbaine, en particulier vers St-Louis et Richard-Toll. L'implantation d'une industrie sucrière (Compagnie Sucrière Sénégalaise) à Richard-Toll en 1971 avait été l'occasion d'un développement important de cette agglomération. Cette ville est le site industriel principal de la région et exerce donc une forte attraction sur les populations du fleuve. Elle fait l'objet de nombreux mouvements de population au cours de la culture sucrière saisonnière. Depuis le développement de l'hydraulisme, après la construction du barrage de Diama (40 km en amont de l'embouchure du fleuve), la riziculture s'est imposée comme une activité agricole principale dans la région. Cette situation économique et démographique a joué un rôle essentiel dans le développement de l'épidémie bilharzienne au nord du Sénégal.

Carte de la vallée du Fleuve Sénégal:

Les études immuno-épidémiologiques présentées dans cette thèse ont été réalisées dans les villages indiqués en rouge.



II.2) L'infection bilharzienne avant la mise en service du barrage de Diama:

Avant la construction du barrage de Diama en 1986, des études de prévalence et de transmission de la schistosomiase avaient été réalisées dans les années 1980 par Chainé (1983) et Vercruysse (1985). Elles avaient montré que la schistosomiase intestinale à *S. mansoni* était totalement absente dans la basse et moyenne vallée (cf. carte de la région).

Cependant, la présence de *Biomphalaria pfeifferi*, un hôte intermédiaire de *S. mansoni*, avait été trouvée en très faible nombre dans la région (Chainé *et al.*, 1983). La vallée du Sénégal représentait donc à cette date, la limite nord de la distribution des mollusques à *S. mansoni* en Afrique de l'ouest.

En revanche, la présence de l'infection à *S. haematobium* avait été observée dans les années 1980. D'une manière générale, la prévalence de l'hématurie, signes cliniques de l'infection, était extrêmement faible dans les villages situés à proximité du fleuve et autour du Lac de Guiers alors qu'elle était plus élevée dans le diéré et à proximité de la ville de Podor (Chainé *et al.*, 1983; Cisse *et al.*, 1983, Vercruysse *et al.*, 1985). Dans le foyer de Podor (Guédé Chantier), la présence de *Bulinus senegalensis* et *Bulinus guernei*, deux hôtes intermédiaires de l'espèce *S. haematobium*, avait été détectées dans les rizicultures (Vercruysse *et al.*, 1985). Dans l'ensemble de la région, la prévalence de l'hématurie chez les enfants était comprise entre 2 et 33 %, le plus fort pourcentage étant retrouvé dans le foyer de Podor (Vercruysse *et al.*, 1985).

Le bilharziose urinaire existait donc dans la région avant la mise en eau du barrage de Diama. Sa prévalence était relativement faible mais aucune étude de l'intensité d'infection, évaluée par le nombre d'oeufs dans les urines, n'avait été réalisée. Néanmoins, le Prof J. Vercruysse avait alerté les autorités compétentes en 1985 indiquant que la surveillance régulière de ce nouveau foyer de transmission était nécessaire pour la santé publique des habitants de la région.

Avant 1986, les organismes internationaux (Banque Mondiale, OMS, USAID) et l'OMVS (Organisation pour la mise en valeur du Fleuve Sénégal) étaient ainsi informés de la situation mais le risque d'une épidémie bilharzienne n'avait pas été pris en considération. La mise en service du barrage associée à la culture du riz, nécessaire pour le développement de la vallée du Fleuve, pouvait donc être entrepris en 1986.

II.3) L'évolution dramatique des schistosomiasés depuis 1988:

Le barrage de Diama a été mis en service en 1986. Il permet de contenir l'intrusion d'eaux salées dans la basse vallée et empêche la remontée des eaux saumâtres qui pouvaient s'étendre jusqu'à 400 km en amont de l'embouchure. Ceci a permis l'alimentation continue en eau douce de nombreux canaux d'irrigation et notamment celui de la Taouey qui relie le lac de Guiers au Fleuve Sénégal à partir de Richard-Toll. L'augmentation des volumes d'eau dans ces canaux permet de limiter les écarts thermiques ce qui crée des conditions favorables aux mollusques sensibles aux fortes températures. Cette pérennisation des eaux de surface a ainsi induit des conditions favorables de développement pour les hôtes intermédiaires réduisant l'influence du contexte de chaleur et d'aridité de cette région du Sahel. Ce phénomène explique d'une part l'émergence d'un foyer de transmission à *S. mansoni* et d'autre part l'extension des foyers de *S. haematobium*, jusque là contenus par des conditions physico-chimiques restrictives.

II.3.1) L'apparition de l'infection à *S. mansoni*:

Le site de Richard-Toll est révélateur du déséquilibre écologique engendré par la mise en service du barrage. Le premier cas de bilharziose intestinale y est signalé en janvier 1988 au centre de santé de la ville. Le nombre de cas dépistés augmenta rapidement: près de 1500 prélèvements de selles positifs sur les 2000 effectués au cours du seul trimestre 1989 (Talla *et al.*, 1990). Une enquête parasitologique menée en août 1990 sur un échantillon représentatif de la population résidante révéla une prévalence globale de 60 %, également répartie sur l'ensemble des tranches d'âge (Talla *et al.*, 1992). Contrairement aux foyers chroniques où le pic d'infection est observé chez les enfants, ce foyer épidémique présente donc la particularité d'une prévalence étalée pour l'ensemble des classes d'âges. Ce dernier point semble lié au caractère récent de l'exposition chez des individus n'ayant jamais été en contact avec le parasite, c'est à dire ne présentant pas une réponse immune acquise.

En 1991, une étude menée dans le village de Ndombo (situé le long du canal de la Taouey) confirmait la très forte intensité de transmission. Une prévalence globale de 91 % y était observée et l'intensité d'infection était considérable atteignant une moyenne géométrique de 650 oeufs/gramme de selles avec 41 % des individus excréant plus de 1000 oeufs/gramme (Stelma *et al.*, 1992). Dans cette étude, aucune différence de prévalence n'avait été observée en fonction du sexe des individus infectés.

Dans ce même village, quatre ans après, une étude montrait que le traitement par le praziquantel (PZQ) était peu efficace (Stelma *et al.*, 1995) et la notion de résistance au PZQ avait ainsi vu le jour comme nous l'avions décrit ultérieurement (chap. I.5.3)

En 1995, l'infection à *S. mansoni* s'était étendue dramatiquement à l'ensemble de la basse vallée du Fleuve Sénégal avec de forte prévalence et de forte intensité d'infection rencontrées surtout auprès du barrage de Diama et autour du lac de Guiers (Picquet *et al.*, 1996). Au cours d'une étude en janvier 1995 dans le village de Guidakhar, situé à 15 km de Richard-Toll sur les bords du Fleuve, la prévalence de l'infection était proche de 100 % comme dans de nombreux villages aux alentours (Marguerite *et al.*, 1999).

II.3.2) L'augmentation de l'infection à *S. haematobium*

Si l'accroissement des ressources hydriques à Richard-Toll offre des conditions favorables à la transmission de *S. mansoni*, il n'en est pas de même pour *S. haematobium* qui n'infecte la population de cette ville que de manière très marginale. En effet, seul 1 % de prévalence y était observée en 1990 (Talla *et al.*, 1992).

A l'inverse dans la région de Podor, situé à 100 km à l'est de Richard-Toll, l'observation en 1993 de l'hôte intermédiaire *Bulinus senegalensis* pouvait signifier un renforcement des conditions favorables à une transmission locale de *S. haematobium* (Vercryusse *et al.*, 1994). En 1995, une augmentation de la prévalence, associée à une forte intensité d'infection était en effet observée dans les mêmes foyers étudiés 10 ans auparavant par J. Vercryusse (Picquet *et al.*, 1996). Une prévalence de 50 % est alors observée. Dans ces mêmes villages, une étude a été menée en 1996 et 1997 et avait pour objectif d'analyser les taux de réinfection après le traitement au PZQ (Shaw *et al.* 1999). Dans certains foyers, la prévalence et l'intensité d'infection était revenu à un état identique quinze mois après la chimiothérapie.

La principale région où une forte augmentation de la bilharziose urinaire a été observée se situe à environ 50 km au Nord-est de St-Louis (le Lampsar, cf. carte: alentours de N'Dioungue M'beresse). En 1991 et 1992, les enquêtes parasitologiques révélèrent une prévalence de 87 % d'infection à *S. haematobium* avec 30 % des individus présentant une forte intensité d'infection (> 50 oeufs/10 ml d'urine) alors que la bilharziose intestinale était absente (Kongs *et al.*, 1993). Dans ces foyers, cette forte prévalence était détectée pour l'ensemble de la population mais les enfants présentaient l'intensité d'infection la plus élevée (Verlé *et al.*, 1994). De plus, cette même étude montrait que le niveau d'infection redevenait initial seulement 12 semaines après un traitement au PZQ.

La bilharziose urinaire a donc dramatiquement évolué dans la vallée du Fleuve Sénégal. Présente avant la construction du barrage de Diama, cette infection a augmentée dans la région de Podor. L'évolution la plus dramatique a été observée près du barrage dans la région du Lampsar.

Vers les années 1995-1996, les foyers d'infection à *S. mansoni* ou à *S. haematobium* semblaient être géographiquement différents. En effet, la schistosomiase intestinale était

présente dans la région de Richard-Toll et autour du Lac de Guiers tandis que la bilharziose urinaire sévissait dans la région de Podor et dans le Lampar. L'infection à *S. haematobium* "entourait" donc géographiquement celle à *S. mansoni*.

II.3.3) Le développement rapide et dramatique des pathologies:

L'évolution particulière de la schistosomiase dans la vallée du Fleuve Sénégal a eu des conséquences dramatiques sur le développement des pathologies associées. Ainsi, une prévalence de 35 % de l'hépatomégalie était déjà observée en 1994 dans un foyer à de Richard-Toll tandis qu'elle n'était que de 6 à 8 % en 1991 (Stelma *et al.*, 1997). Cette augmentation était observée chez les individus présentant une faible ou une forte intensité d'infection.

D'autres études réalisées en 1996 avaient montré l'apparition des premiers signes graves (hypertension portale) liée à la bilharziose intestinale moins de 10 ans après l'apparition de l'infection à *S. mansoni* (Yazdanpanah *et al.*, 1997; Kardodorff *et al.*, 1996). En effet, près de 20 % des individus dans certains foyers présentaient déjà une pathologie de Grade II, d'après la classification de l'OMS présentée précédemment (en particulier, fort épaissement des vaisseaux portes).

Comparativement aux observations pathologiques observées dans des foyers chroniques d'infection dans d'autres pays, la précocité des manifestations pathologiques dans ce foyer jeune était inhabituelle et surprenante pour les spécialistes de l'échographie bilharzienne. Pour ces raisons, des études à Richard-Toll ont été initiées dans le cadre du programme ESPOIR par le Dr Ph. Bonnard fin 1996. Elles ont montré que 5 % des individus étaient déjà porteurs de varices oesophagiennes, formes graves de la morbidité bilharzienne (Bonnard *et al.*, soumis). L'apparition de ces formes graves fait craindre une augmentation importante de la mortalité liée à la schistosomiase dans cette région endémique. Ainsi, cette étude a inciter la mise en place de diagnostic et de surveillance des formes graves dans la région du Fleuve Sénégal. Une seconde étude en 1999 a également confirmé l'apparition dramatique des formes graves de la bilharziose à *S. mansoni* (Cassagnou *et al.*, soumis).

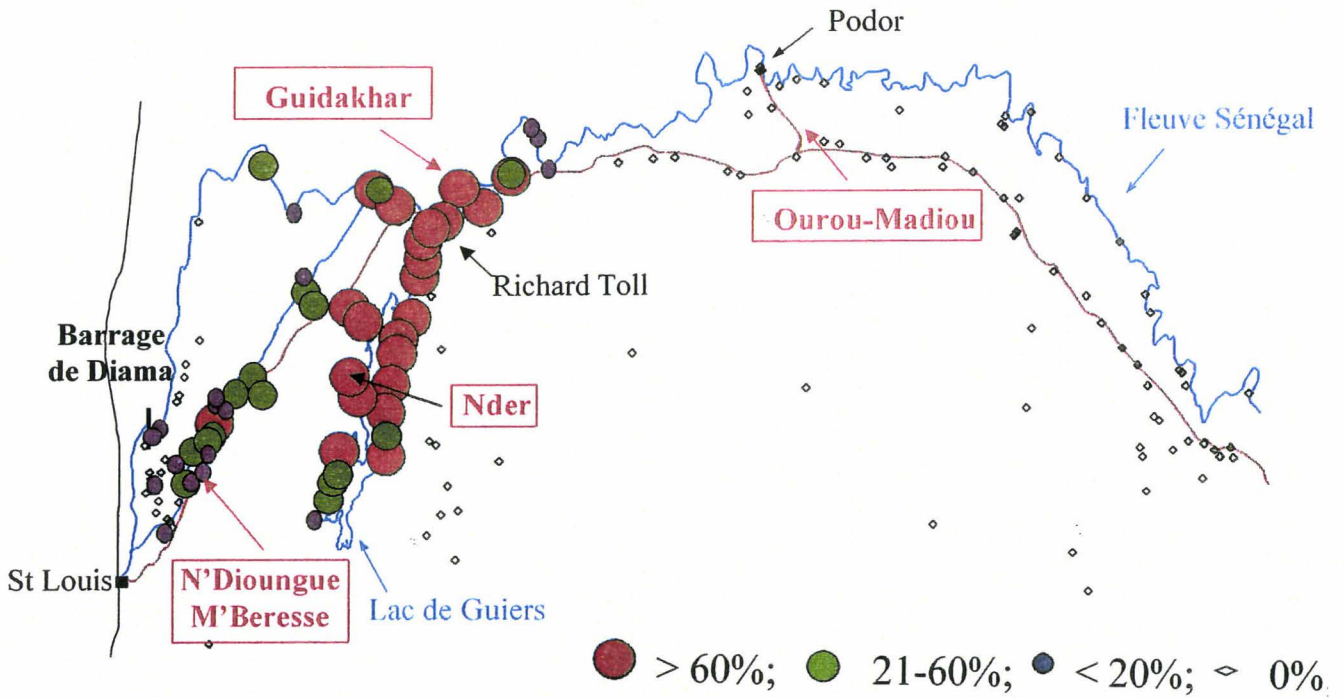
Dans la région de Podor, une étude de la morbidité de la schistosomiase urinaire a été réalisée dans un foyer récemment infecté (<6 ans; Delege *et al.*, 1998). Avant le traitement par le PZQ, des irrégularités de la paroi vésicale était observée chez 43 % d'individus infectés (seulement 6 % chez des individus non-infectés). La sévérité de la pathologie était corrélée à l'intensité d'infection. Après chimiothérapie, la prévalence des atteintes vésicales diminuait à 11 %. Ces résultats indiquaient qu'une morbidité sévère pouvait également être observée chez des individus récemment exposés à *S. haematobium*. Contrairement à ce qu'il peut être observé pour *S. mansoni*, le traitement semble être efficace pour diminuer certaines manifestations pathologiques liées à l'infection urinaire.

II.4) Etat actuel de l'endémie:

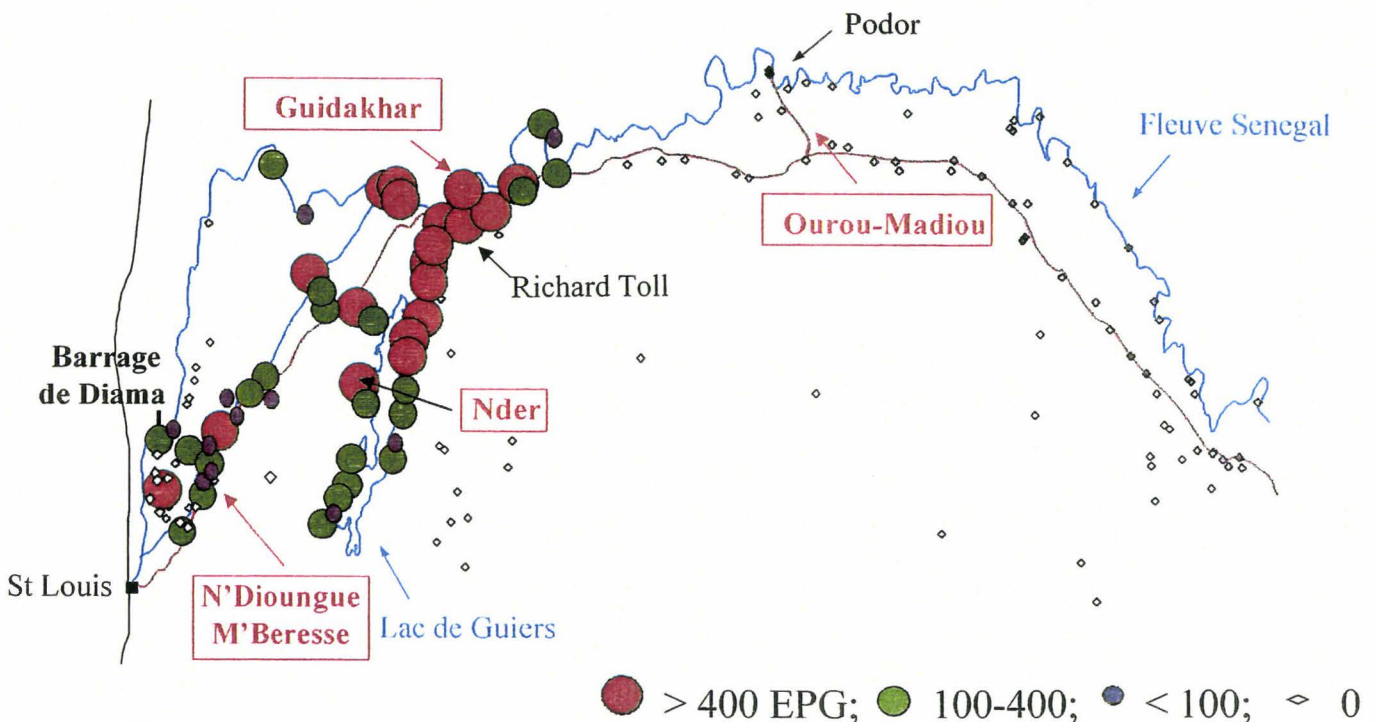
La cartographie des deux types de schistosomiase dans la vallée du Fleuve Sénégal a été réalisée en 1999 (aimablement fournie par le Prof. J. Vercryusse). Elle présente la prévalence et l'intensité d'infection de chaque bilharziose.

EPG: nombre d'oeufs de *S. mansoni* par gramme de selles.

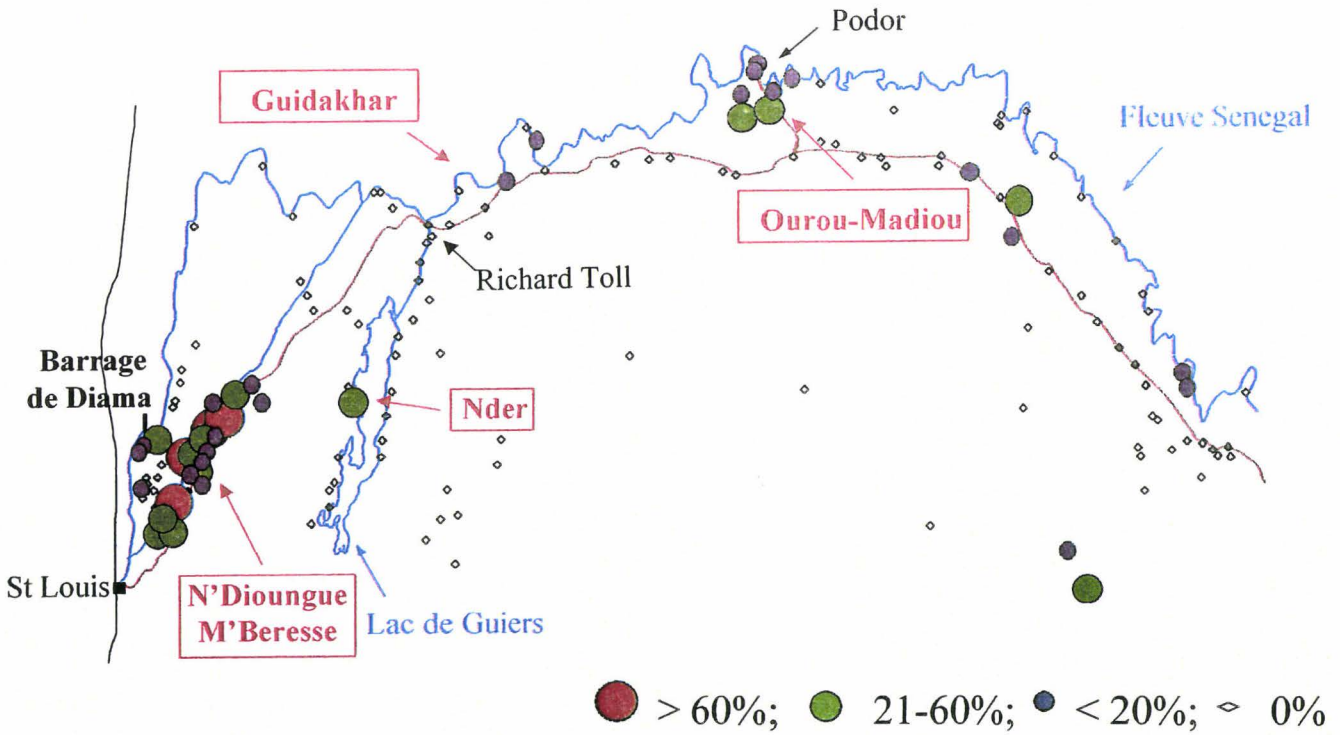
Prévalence de l'infection à *S. mansoni*



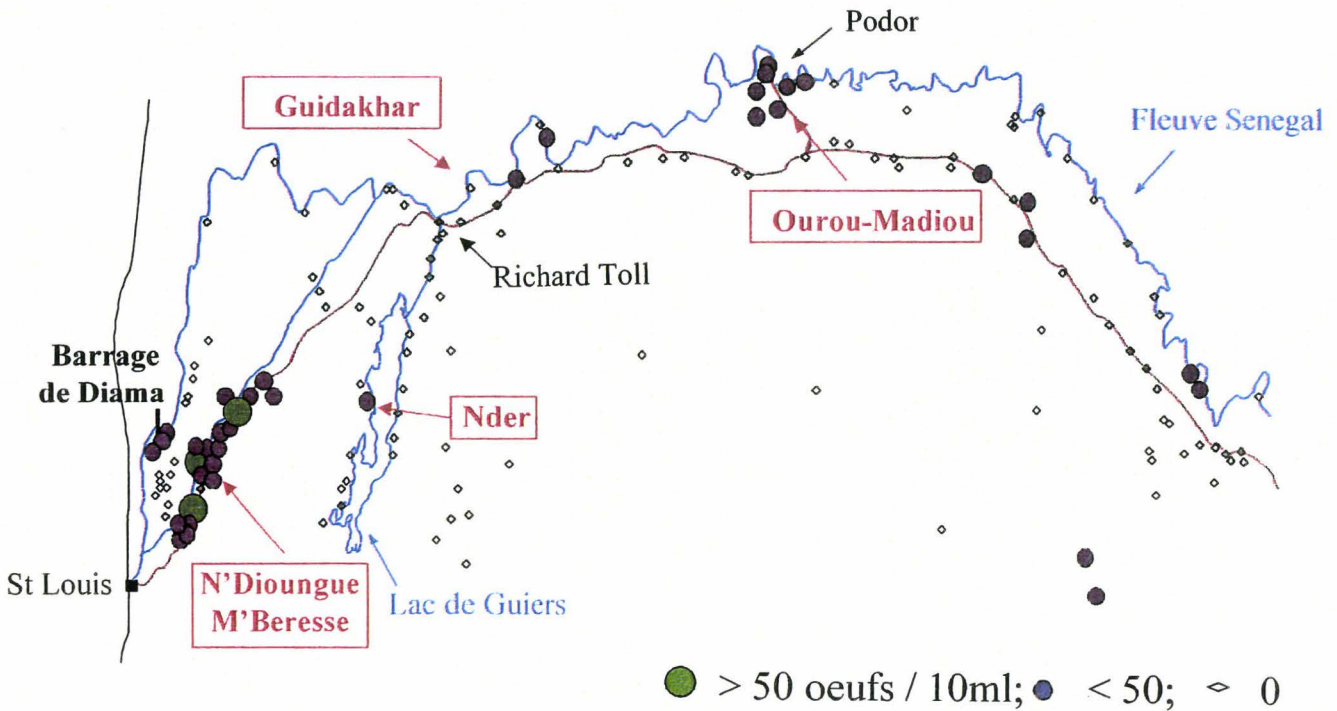
Intensité d'infection à *S. mansoni*



Prévalence de l'infection à *S. haematobium*



Intensité d'infection à *S. haematobium*



Nous pouvons remarquer que l'infection à *S. mansoni* est majoritaire dans la région de Richard-Toll (au sud de Guidakhar) et s'étend vers le lac de Guiers (forte prévalence et forte intensité d'infection). Par contre, le foyer ancien de bilharziose urinaire dans la région de Podor existe toujours mais la forte endémie à *S. haematobium* se situe dans la région du Lampsar au sud-est du barrage de Diama (région de N'Dioungue M'Beresse).

Dans cette dernière région, il est frappant de constater une juxtaposition de l'infection à *S. mansoni* et à *S. haematobium*. En effet, la bilharziose intestinale est apparue depuis peu dans cette région du Lampsar où l'infection à *S. haematobium* était uniquement présente depuis une dizaine d'année. L'apparition de foyers mixtes constitue ainsi une particularité dramatique de l'endémie bilharzienne depuis un ou deux ans.

Les études immuno-épidémiologiques présentées dans cette thèse ont été réalisées dans quatre villages (indiqués en rouge sur les cartes).

- un foyer où seul l'infection à *S. haematobium* est observée : Ourou-Madiou
 - prévalence: 55 %
 - intensité d'infection : 11,5 oeufs/10 ml d'urine (moyenne géométrique)
- un village où seul la bilharziose à *S. mansoni* est présente : Guidakhar
 - prévalence: près de 100 %
 - intensité d'infection: 456 EPG
- deux villages d'infection mixte *S. mansoni* et *S. haematobium*:
 - . Nder: le premier foyer mixte décrit au Sénégal (De Clercq *et al.*, 1999)
 - prévalence : *S. mansoni* = 91 %; *S. haematobium* = 28 %; mixte= 21 %
 - intensité : *S. mansoni* = 589 EPG; *S. haematobium* = 6,3 oeufs/10 ml
 - . N'Dioungue M'Beresse:
 - prévalence : *S. mansoni* = 53 %; *S. haematobium* = 68 %; mixte= 43 %
 - intensité : *S. mansoni* = 93 EPG; *S. haematobium* = 7,8 oeufs/10 ml.



European Special Program for Operational and Integrated Research

II.5) Le programme ESPOIR : un programme de lutte contre les bilharzioses dans la vallée du Fleuve Sénégal

Les études épidémiologiques, malacologiques et cliniques depuis 1990 et présentées ci-dessus ont toutes été réalisées dans le cadre du Programme ESPOIR. En 1988, Le Médecin-chef de la Région Médicale de St-Louis, le Dr Malick NIANG, a eu connaissance des premiers cas d'infection à *S. mansoni*, dépistés à Richard-Toll. Il a alors contacté le Prof. A. Capron. Devant la crainte d'un développement dramatique de l'infection et suite à la demande des plus hautes autorités sénégalaises, le Prof. A. Capron a initié ce programme en 1990.

ESPOIR se devait de mettre en place, outre un réseau scientifique international, dédié à l'étude de la maladie dans la région du Fleuve, les structures opérationnelles et logistiques permettant par la suite au Ministère de la Santé du Sénégal de poursuivre d'une façon autonome la lutte contre la bilharziose.

Les objectifs du programme sont les suivants:

- Recherche scientifique de nouveaux moyens de contre la bilharziose:
malacologie, épidémiologie, chimiothérapie, immuno-épidémiologie.
- Formation de chercheurs, médecins et techniciens sénégalais
- Education sanitaire des habitants
- Aide à l'implantation ou l'amélioration de structures de soins dans les villages
- Aide au contrôle de l'infection par l'information scientifique et médicale.

Son but est donc de coordonner les études entreprises par différents organisations de recherche nationales et européennes dans la Région du Fleuve Sénégal. Le programme apporte à ces opérations: une structure scientifique et technique (structure hospitalière, laboratoire de recherche, personnel technique de laboratoire ou de terrain), une structure logistique (au niveau du terrain, réseau de formation de techniciens et médecins sénégalais, réseau d'information aux populations) et une structure administrative.

II.5.1) L'organisation du programme ESPOIR:

Le programme ESPOIR est intégré aux structures de santé de l'état Sénégalais. Notamment, la direction du programme est assurée par le Médecin-Chef de la Région Médicale de St-Louis, actuellement le Dr A N'Diaye qui vient de succéder au Dr A. Ly et toutes les opérations sur le terrain se font sous le patronage et la responsabilité du Ministère de la Santé du Sénégal.

Le Directeur est assisté par un Directeur technique au Sénégal qui est un médecin de la Coopération Française, actuellement le Dr. J.P. Dompnier. L'animation scientifique et opérationnelle du programme est réalisée par le Directeur technique Europe, le Dr G. Riveau. La Direction scientifique est assurée par le Prof. A. Capron.

ESPOIR est une structure de coordination qui regroupe en son sein de nombreuses composantes internationales de recherche:

- Institut Pasteur de Lille (France): Prof. A. Capron
- Université de Gand (Belgique): Prof. J. Vercruysse
- Muséum d'Histoire Naturelle de Londres (U.K): Prof. V. Southgate
- Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique): Prof. B. Gryseels.

Dans le cadre des études immuno-épidémiologiques qui seront présentées au cours de cette thèse, un travail de collaboration avec de le Dr. O. Garraud de l'Institut Pasteur à Dakar a été très précieux. En plus de l'utilisation de l'infrastructure du programme, ces études ont pu être réalisées dans deux laboratoires du programme: le laboratoire d'immunologie de Sor à St-Louis et le Centre d'Investigation Biologique de Richard-Toll.

Depuis le début du programme ESPOIR, plusieurs organisations ont participé à son financement. La Coopération Française apporte une aide particulière dans les infrastructures et pour le personnel (coopérants français). La Région Nord-Pas de Calais subventionne une partie de son fonctionnement de base. Une collaboration avec l'ORSTOM a été entreprise particulièrement à Richard-Toll. Les activités de recherche sont largement financées par l'Union Européenne (DGXII, International Cooperation with Developing Countries).

II.5.2) Les réalisations:

En plus d'une action de formation théorique et technique du personnel sénégalais (stages en Europe, participation à des cours ou congrès, informatique), les principales réalisations concernent des actions de recherche scientifique et de santé publique (plus d'une trentaine à ce jour).

De plus, une page Web est en cours d'installation. Elle présente l'ensemble des structures et des réalisations du programme ESPOIR, ainsi que des généralités sur la Bilharziose, sa lutte, l'immunité anti-bilharzienne et l'endémie dans la Région du Fleuve Sénégal.

- Santé publique:

Dés qu'une étude est réalisée sur le terrain, un traitement par le PZQ de la population du village est systématiquement réalisé. La chimiothérapie dans la vallée du Fleuve est donc effectuée à la fois par le programme et à plus grande échelle par les projets de l'état Sénégalais assisté par le Fond Européen de Développement (FED, Union Européenne, DGVIII). La première dotation de PZQ a été faite par l'Institut Pasteur de Lille. Le don suisse comble actuellement les besoins, et permet de ramener le coût du traitement de 80 FF à 12 FF. Les autres maladies dépistées au cours des enquêtes sont soignées gratuitement puis suivies par les médecins du programme.

Une importante participation à l'assainissement du milieu a été réalisée par la construction de latrines et d'adduction d'eau dans le village de Mbodiène (42 latrines, pompages et traitement de l'eau à l'énergie solaire). Le programme a participé à de nombreuses remises en état de dispensaires dans les villages et à la construction d'un château d'eau à Richard-Toll.

L'éducation pour la santé représente un autre volet des réalisations du programme, notamment par des séances d'éducation et de formation pour l'hygiène. La rédaction d'un fascicule dans les cinq principales langues de la région ("Luttons contre la bilharziose") a été largement diffusé dans la Région.

- Actions de recherche scientifique

Le programme ESPOIR a coordonné toute une série d'études scientifiques ou de santé publique relatives à l'infection dans les nouveaux foyers de la région du Fleuve, et plus particulièrement dans les régions de Richard-Toll, de Podor et du Lampsar où les deux types de bilharziose étaient fortement endémiques.

Les études épidémiologiques et malacologiques décrites précédemment (Chap. II.3 et II.4) ont permis non seulement de dépister l'infection et d'évaluer son évolution depuis 1990, mais également d'identifier la dramatique émergence de foyers mixtes et le fort niveau des réinfections dans cette région. De nombreux protocoles de lutte chimiothérapique ont été réalisés afin d'améliorer leur efficacité. En particulier, l'utilisation de l'artésunate est sans doute une avancée importante dans la chimiothérapie contre la schistosomiase et le paludisme (De Clerq *et al.*, 2000).

De nombreuses études échographiques avaient pour objectif de caractériser le développement des pathologies associées à *S. mansoni* et *S. haematobium*. Ainsi, l'apparition particulière d'une morbidité grave a été mise en évidence moins de dix ans après le début de l'infection ce qui a abouti à mettre en place un programme de surveillance des pathologies dans la région (Hôpital de St-Louis). La présence de co-infections bactériennes, parasitaires et virales et leur impact clinique et immunologique ont été également évalués.

L'étude du statut immunitaire des populations infectées par les schistosomes s'est greffée dans un grand nombre d'études épidémiologiques et/ou cliniques. L'évaluation des réponses immunes spécifiques est partagée en deux projets complémentaires dans le programme. Tout d'abord, l'équipe du Prof. B. Gryseels, qui concentre ces études dans la région de Richard-Toll, a pour objectif de déterminer si la réponse immune contre la bilharziose s'acquière en fonction de l'âge des individus infectés ou en fonction de leur exposition au parasite.

Les études menées par l'équipe du Prof. A. Capron s'inscrivent dans une stratégie vaccinale contre la schistosomiase. Le but est ainsi d'évaluer l'évolution de la réponse immune spécifique au candidat vaccin 28GST en fonction de paramètres tels que l'âge, l'infection, le sexe, l'influence du traitement au PZQ et de co-infections. Une partie de ce travail est décrite au cours de cette thèse.

Enfin, le premier essai vaccinal de Phase I contre la schistosomiase a été récemment réalisé à l'hôpital de St-Louis et au laboratoire de Sor dans le cadre du programme ESPOIR (juin 1999). L'Institut Pasteur de Lille, en la personne du Prof. A. Capron, est le promoteur de l'essai clinique. Le Dr. G. Riveau, Directeur Technique Europe du programme, assure sa coordination et le Dr. J. De Bont, son monitoring. La responsabilité d'investigateur principal était attribuée au Directeur Technique (Dr. J.P. Dompnier). Cet essai de Phase I a été contrôlé par l'OMS, représenté par le Dr B. Vennervald. C'était la première fois qu'un essai clinique de Phase I était mis en place dans un pays en voie de développement. Son objectif était d'évaluer l'innocuité de la préparation vaccinale Bilhvax (Sh28GST) chez des enfants (6-10 ans) non-infectés par la bilharziose mais vivant en région endémique. Les infrastructures du programme permettront de commencer en avril 2000 les premiers essais cliniques de Phase II chez des adultes infectés (village de N'Dioungue M'Beresse). L'objectif sera alors d'évaluer la tolérance immédiate à la vaccination associée à la chimiothérapie au PZQ.

De la mise en évidence de la dramatique évolution de la schistosomiase jusqu'à la mise en place d'essai clinique, l'objectif d'ESPOIR reste le même : un programme de recherche pour l'obtention de nouveaux moyens de lutte contre la schistosomiase. Il est intégré aux politiques de santé de l'état Sénégalais ce qui garantit l'efficacité de ces activités dans cette région endémique.

III) Réponse immunitaire au cours de la schistosomiase

Les études sur les modèles animaux montrent que les comportements du rat et de la souris sont différents vis-à-vis de l'infection bilharzienne. En effet, le rat est un hôte semi-permissif puisqu'il est capable d'éliminer les vers 21 à 28 jours après infestation expérimentale. Ce modèle permet ainsi d'évaluer la réponse immune spécifique du ver lors d'une primo-infection et son évolution au cours de la réinfection. A l'inverse, la souris est un hôte permissif puisque le cycle du parasite y est complet. L'intérêt principal de ce modèle est qu'il est alors possible d'évaluer la réponse immune induite après la ponte des oeufs. En outre, ces deux modèles partagent des caractéristiques communes avec l'infection humaine qui seront développées au cours de ce chapitre. Comme dans de nombreuses infections, l'existence d'une immunité innée, non spécifique, semble présenter une efficacité contre l'infection.

III.1) Immunité innée :

L'implication de l'immunité non spécifique dans la réponse immune développée contre le parasite est plus difficile à appréhender que celle de l'immunité spécifique. Dans le cas de l'immunité spécifique, le parasite est en effet directement affecté, voire détruit, par une réponse humorale ou cellulaire effectrice. Néanmoins, des mécanismes non spécifiques semblent intervenir dans la résistance de l'hôte et sont probablement effecteurs contre les premiers stades de maturation du schistosome.

En effet, les cercaires et les schistosomules ont la capacité d'activer la voie alterne du complément *in vitro* qui peut alors détruire ces deux formes parasitaires (Machado *et al.*, 1975; Sher *et al.*, 1976). Cette activité du complément peut être amplifiée en présence de cellules exprimant à leur surface la molécule C3b, et ceci en l'absence totale d'anticorps spécifiques (Ottesen *et al.*, 1977; Mc Kean *et al.*, 1981). De plus, il a été montré *in vivo* que la déplétion du complément chez l'animal conduisait à une forte diminution de l'immunité à la réinfection (Santoro *et al.*, 1982).

L'augmentation d'une activité de type Natural Killer (NK) a été rapportée dans la schistosomiase murine mais aucune démonstration du rôle direct de ces cellules sur les larves de schistosome n'a pas été clairement réalisée (Attalah *et al.*, 1980; Abe *et al.*, 1983). De plus, une altération de l'activité NK a été suggérée au cours des infections aiguës ou des formes graves de la bilharziose humaine (Barsoum *et al.*, 1984).

L'activation du macrophage peut conduire dans certains cas à la mort du schistosomule, ceci en l'absence d'anticorps spécifiques (Bout *et al.*, 1981). Chez le rat, les macrophages présentent également une activité schistosomicide en présence du complément et après stimulation par des IgG (Auriault *et al.*, 1981). Ces mécanismes macrophagiques pourraient également jouer un rôle au cours de la schistosomiase humaine (Olds *et al.*, 1981; Nogueira-Machado *et al.*, 1983).

II.2) Réponse immune spécifique dans les modèles expérimentaux:

L'intensité d'infection chez l'homme semble dépendre de l'âge des individus infectés. Alors que les enfants présentent le niveau d'infection le plus élevé, une diminution de l'intensité d'infection est observée chez les adultes. L'acquisition d'une immunité spécifique au cours de l'infection semble jouer un rôle prépondérant dans ce phénomène. Malgré de nombreuses observations immuno-épidémiologiques qui seront présentées ultérieurement, les bases du mécanisme expliquant cet équilibre ne sont pas encore élucidées. L'utilisation de modèles animaux offrent de nombreuses possibilités d'études afin de répondre à de nombreuses questions.

Il est à noter cependant que toutes les études décrites dans ce chapitre ont été réalisées après infestation expérimentale par le parasite *S. mansoni*. Le cycle à *S. haematobium* chez la souris n'a été mis en place qu'en 1998 à l'Université de York (Lane *et al.*, 1998) et, à l'heure actuelle, aucune étude avec cette espèce n'a été réalisée chez le rat.

II.2.1) L'immunité concomitante:

Le rat de laboratoire (*Rattus norvegicus*) est un hôte semi-permissif, contrairement aux rats sauvages, hôtes naturels de *S. mansoni*. Le cycle parasitaire chez le rat de laboratoire n'arrive pas à son terme car les parasites ne se développent pas en adultes matures. Ils restent atrophiés et la ponte d'oeufs n'a pratiquement jamais lieu. Une caractéristique remarquable de l'infection chez cet animal est qu'une première infestation expérimentale avortée permet la mise en place d'une résistance vis-à-vis d'une réinfection. Ce phénomène est nommé immunité concomitante. Les nouveaux parasites sont alors la cible de mécanismes immunologiques développés au cours de la première infection et sont ainsi rapidement éliminés alors que la population parasitaire de la première infection reste intacte. Ainsi, les parasites de la primo-infection ont induit une immunité spécifique des stades immatures qui devient pleinement

efficace et effectrice vis-à-vis des parasites de la seconde infestation. Ce type de protection naturelle observée chez le rat pourrait s'apparenter à l'immunité anti-bilharzienne chez l'homme qui s'acquière après de multiples infections, au cours de nombreuses années.

Les mécanismes immunitaires impliqués dans l'immunité concomitante sont maintenant bien connus dans l'infection du rat. Ils font appel à l'action combinée d'anticorps spécifiques d'antigènes du parasite et de cellules contenant des granules toxiques et sont appelés : cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). Seules certaines classes d'anticorps chez le rat semblent induire cette ADCC. Il s'agit des anticorps anaphylactiques IgG2a et principalement des IgE (Capron *et al.*, 1975; 1981; 1987). C'était la première fois qu'il avait été démontré un rôle bénéfique de ces isotypes car ces classes d'anticorps étaient alors connues pour participer à des phénomènes pathologiques, en particulier dans l'allergie. A l'opposé l'isotype IgG2c est capable de bloquer les mécanismes d'ADCC IgE et IgG2a-dépendants chez le rat (Grzych *et al.*, 1984).

Les partenaires cellulaires impliquées dans ces réactions conduisant à la destruction parasitaire sont les éosinophiles, les macrophages et les plaquettes (Capron *et al.*, 1992). En particulier, les éosinophiles jouent un rôle primordial dans l'ADCC car ils expriment à la fois un récepteur de haute (Fc ϵ RI) et basse affinité (Fc ϵ RII) aux IgE à leur surface (Guonni *et al.*, 1994; Capron *et al.*, 1984). La fixation d'IgE spécifiques à la surface du ver entraîne, grâce à la présence des Fc ϵ R sur les éosinophiles, les mécanismes de cytotoxicité caractérisés par la sécrétion des médiateurs cytotoxiques tels que la peroxydase, la Major Basic Protein (MBP) et l'Eosinophil Cationic Protein (ECP) (Butterworth *et al.* 1979; Mc Laren *et al.*, 1981). Ces médiateurs cytotoxiques sont alors capables de détruire l'intégrité tégumentaire du parasite exerçant leur activité schistosomicide. La forte interaction entre l'éosinophile, le schistosome et les mécanismes cytotoxiques induits semble être maintenue par la présence de sélectines et de molécules d'adhérence de type Lewis(X) à la surface des schistosomules (Nutten *et al.*, 1999).

II.2.2) Réponse cellulaire spécifique:

L'apparition des mécanismes d'ADCC au cours de l'infection mais principalement au cours de la réinfection semble être associée à la mise en place d'une réponse immune de type Th2 chez le rat. En effet, une augmentation des réponses IgE et IgG2a est observée après la réinfection et est associée à la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 (Cêtre *et al.*, 1999).

Néanmoins, la souris est plus particulièrement un modèle de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires contrôlant l'infection bilharzienne. Comme chez l'homme, le parasite y effectue un cycle complet et les oeufs se localisent et s'accumulent dans les mêmes organes. Même si un mécanisme de type ADCC a été rapporté chez la souris (Ramalho-Pinto *et al.*,

1979), son efficacité semble être limitée. Ceci pourrait être attribué au fait que les souris n'expriment pas de récepteur de haute affinité aux IgE, contrairement à l'homme et au rat. La reconnaissance de schistosomules par les IgE spécifiques s'avèrerait ainsi inefficace dans la capacité de cet isotype à induire l'activation des cellules cytotoxiques.

Les mécanismes de régulation contrôlant l'ensemble des réponses immunes au cours de l'infection murine dépendent de lymphocytes de type Th1 ou de type Th2, de macrophages ou d'éosinophiles.

L'autre intérêt de ce modèle animal réside dans le fait que les deux types de réponse lymphocytaire Th1 et Th2 ne semblent pas induits au cours des mêmes stades de l'infection. En effet, la réponse cellulaire commute d'un profil de type Th1 (début de l'infection jusqu'à 4 semaines) vers un profil de type Th2 (à partir de 8 semaines post-infection) chez la souris (Fallon, 2000). Cette caractéristique fait de l'infection murine un modèle essentiel non seulement pour comprendre la régulation immunologique entre ces deux profils immunitaires mais également pour évaluer leur rôle au cours de l'infection. Alors que les schistosomules semble induire préférentiellement une réponse immune de type Th1 au début de l'infection par *S. mansoni* (production d'IFN γ et d'IL-2), la ponte puis l'apparition des oeufs déposés dans les tissus conduit à une réponse cellulaire de type Th2 (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991). La mise en place du profil Th2 régule alors négativement l'immunité de type Th1 préalablement installée. Il est à noter que ce même mécanisme immunitaire a également été observée au cours de l'infection murine par *S. haematobium* (Lane *et al.*, 1998). La commutation vers un profil de type Th2 semble liée à des facteurs intrinsèques à l'oeuf parasite, tels que des oligosaccharides (Lewis X) présents à leur surface (Velupillai *et al.*, 1994). Ces structures sont en effet capables de stimuler la production d'IL-10 inhibant la prolifération des cellules Th1.

L'utilisation de souris invalidées pour l'IL-4, ne développant pas de réponse Th2, a permis de montrer les effets protecteurs de cette cytokine après une infection par *S. mansoni* (Pearce *et al.*, 1996). L'efficacité protectrice de cette cytokine semble principalement intervenir dans le contrôle des manifestations pathologiques au cours d'une primo-infection et dans la réduction de la charge vermineuse observée après une réinfection (Rosa-Brunet *et al.*, 1997).

L'infection de souris par des cercaires irradiées est également une stratégie intéressante pour étudier la réponse immune induite au cours des premiers stades parasites. En effet, ces cercaires transformées sont incapables de maturer en schistosomes adultes car elles sont ralenties au niveau de la peau puis ne mûrent pas au niveau des poumons. Ceci facilite la mise en place de réponses immunes plus efficace. L'immunisation par les cercaires irradiées induit une réponse de type Th1 prédominante, caractérisée par une forte production d'IFN γ et aboutit à la protection des souris (Mountford *et al.*, 1992). Cette protection est réduite si les animaux sont traités par des anticorps neutralisant l'activité de l'IFN γ (Smythies *et al.*, 1992). Le rôle majeur de l'IFN γ dans l'immunité protectrice est également confirmé *in vitro* par sa capacité à activer

les macrophages ce qui aboutit à la lyse des schistosomules (Pearce *et al.*, 1993). L'action de l'oxyde nitrique (NO) semble jouer un rôle important dans ce phénomène cytotoxique et la production de ce médiateur est induit par l'IFN γ et le TNF α (James *et al.*, 1989).

Suite à ces données observées chez le rat ou la souris, il apparaît difficile de définir un type de profil immunitaire particulier intervenant dans la protection contre l'infection ou la réinfection. En effet, alors qu'une réponse immune de type Th2 semble clairement associée à une protection chez le rat, les deux types de profil immunitaire pourraient intervenir, dans le contrôle de l'infection chez la souris. Chez ce dernier modèle, la protection semble dépendre du stade parasitaire étudiée. Néanmoins, la souris reste un modèle important pour étudier la régulation immunitaire au niveau du granulome bilharzien.

III.2.3) Réponse cellulaire et granulome bilharzien

Après infestation, les granulomes hépatiques se développent chez la souris et partagent des caractéristiques communes avec ceux observés au cours de l'infection humaine. Contrairement à l'infection humaine, la pathologie murine apparaît précocement et après une seule infestation massive. Néanmoins, le modèle murin peut apporter de nombreuses informations concernant la régulation de la réponse cellulaire locale.

La sécrétion d'antigènes par les oeufs vivants entraîne une réaction inflammatoire appelée granulome qui est caractérisé par un recrutement massif de neutrophiles, d'éosinophiles et de lymphocytes (Moore *et al.*, 1997). Le granulome est classiquement considéré comme une réaction inflammatoire à médiation cellulaire ou hypersensibilité retardée (Warren *et al.*, 1967).

Chez la souris, il a été montré que les lymphocytes T de type CD4 $^+$ était une population cellulaire fortement impliquée dans la formation du granulome (Mathew *et al.*, 1986). Différentes cytokines pro- et anti-inflammatoires sont alors produites par les cellules présentes au voisinage du granulome. Certaines semblent réguler la réaction inflammatoire, d'autres semblent participer à l'induction de la fibrose hépatique.

Par exemple, l'IL-2 et l'IL-4 sont fortement impliquées dans le développement de la réaction granulomateuse après le dépôt des oeufs (Mathew *et al.*, 1986; Lukacs *et al.*, 1993). L'IL-2 serait en effet capable d'induire la mise en place d'une réponse immune de type Th2 car sa neutralisation conduit à une diminution de la production d'IL-4 et d'IL-5 par les cellules T du granulome (Wynn *et al.*, 1993, Metwali *et al.*, 1993). L'IL-5 induite semble jouer un rôle essentiel dans le recrutement des éosinophiles autour des oeufs déposés et ces cellules seraient directement productrices d'IL-4 et d'IL-5 (Rumbley *et al.*, 1999). Récemment, il a été montré que l'IL-13, autre cytokine de type Th2 chez la souris, semble également être un élément important dans le développement de cette réaction inflammatoire (Chiaromonte *et al.*, 1999).

Tout comme ces cytokines associées à un profil de type Th2, le $\text{TNF}\alpha$, cytokine inflammatoire, est nécessaire au développement d'une réaction granulomateuse. En effet, l'injection de cette cytokine est capable de restaurer la formation de granulome, chez des souris SCID (déficientes en cellules B et T) infectées (Amiri *et al.*, 1992).

En revanche, la présence d' $\text{IFN}\gamma$ et d'IL-12 semble inhiber la formation du granulome. L' $\text{IFN}\gamma$ serait en effet capable d'inhiber la production de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5) qui favorisent le développement du granulome (Lukacs *et al.*, 1993). Cette même action a été démontré pour l'IL-12 au niveau de granulomes pulmonaires (Wynn *et al.*, 1994). En plus d'un effet inhibiteur sur la formation du granulome, ces deux cytokines seraient impliquées dans la réduction de la fibrose hépatique (Czaja *et al.*, 1987; Wynn *et al.*, 1995).

D'après les données chez la souris, la présence des granulomes bilharziens semble être associée à une réponse immunitaire de type Th2 tandis que les cytokines de type Th1 interviendraient dans la modulation de la pathologie. Cette dichotomie semble être bien simple. En effet, le $\text{TNF}\alpha$ semble avoir un rôle primordial dans le déclenchement de la réaction inflammatoire qui serait alors régulée négativement par les cytokines de type Th2. Cette régulation Th2-dépendante interviendrait alors tardivement mais, par leur action de recrutement d'éosinophiles et de lymphocytes T, elles seraient capables de faire évoluer une réaction inflammatoire associée à un profil de type 1 vers la réaction granulomateuse de type 2. La cinétique de la formation du granulome semble donc ainsi prépondérante dans la régulation de la réponse immune.

Au cours de cette régulation, l'IL-10 semble jouer un rôle primordial. En effet, il a été montré que l'administration de cette cytokine chez la souris était capable non seulement de diminuer les réactions d'hypersensibilité retardée spécifique aux antigènes d'oeufs mais surtout de prévenir la formation du granulome hépatique (Flores-Villanueva *et al.*, 1996). Cette cytokine anti-inflammatoire est associée chez la souris à un profil de type Th2 et est capable de réguler négativement une réponse de type Th1. L'IL-10 semble donc avoir une action immunorégulatrice importante en inhibant le développement précoce du granulome bilharzien.

Le modèle souris semble apporter de précieuses informations concernant les régulations immunitaires précoces et tardives au cours du développement de la pathologie bilharzienne. Cependant, les données immuno-épidémiologiques observées au cours de l'infection humaine ne semblent pas clairement confirmer ces résultats. Chez l'homme, l'infection est quotidienne et se déroule pendant de nombreuses années. La régulation de l'immunité spécifique ne peut donc être que différente. Néanmoins, les mécanismes effecteurs de l'immunité humorale chez l'homme semblent partager des similarités avec ceux observés chez le rat (ADCC).

III.3) Réponse immune spécifique au cours de l'infection humaine:

Au cours de l'infection humaine par les schistosomes, la régulation de la réponse immune spécifique joue un rôle prépondérant, non seulement dans la résistance ou la susceptibilité à la (ré)infection mais également dans la modulation ou l'exacerbation des pathologies associées. La présence du parasite induit en effet la mise en place d'une réponse cellulaire spécifique régulant l'apparition de la réponse anticorps dirigée contre les antigènes parasitaires.

Les lymphocytes T activés à la suite de la reconnaissance spécifique des antigènes parasitaires produisent de nombreuses cytokines, dont certaines interviendront directement dans l'orientation des réponses isotypiques. Une étroite corrélation s'établit donc entre le profil de cytokines sécrétées spécifiquement par les cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T, et la production des différentes classes d'anticorps par les cellules B.

Avant de présenter les mécanismes immunitaires et le profil des réponses immunes spécifiques induits au cours de l'infection bilharzienne humaine, nous nous proposons de présenter une liste non exhaustive des mécanismes de l'immunologie chez l'homme. Malgré de fortes similarités avec les modèles animaux (rat et souris), la régulation des réponses immunes spécifiques chez l'homme présente de nombreuses spécificités.

III.3.1) Notions d'immunologie chez l'homme:

III.3.1.a) *Isotypes et cytokines:*

Au cours de cette thèse, nos études présentent l'évolution des réponses anticorps spécifiques au cours des schistosomiasis humaines. La production des différentes classes d'anticorps dépend de la stimulation des lymphocytes B par différentes cytokines sécrétées par les cellules T. Ce chapitre se concentrera donc à présenter les connaissances acquises chez l'homme concernant la régulation des différents isotypes par certaines cytokines immunorégulatrices. La stimulation de la sécrétion des différents isotypes dépend de plusieurs phénomènes distincts. D'une part, certaines cytokines interviennent directement dans la commutation isotypique aboutissant à la production des ARNm codant pour différentes classes d'anticorps. Et d'autre part, les cytokines sont capables d'induire la production des différents classes d'immunoglobulines, puis leur sécrétion par les cellules B.

De très nombreuses données concernant la régulation isotypique par les cytokines sont disponibles dans la littérature. Le tableau ci-dessous présente une liste d'observations communément acceptées.

Régulation isotypique par les cytokines chez l'homme:

Isotypes	Commutation isotypique	Production	Références
IgG1	IL-4 IL-10	IL-4 IL-10 IL-13 IFN- γ	Brière <i>et al.</i> , 1994a Cocks <i>et al.</i> , 1993 Fujieda <i>et al.</i> , 1995 Kawano <i>et al.</i> , 1994 Kitani <i>et al.</i> 1993 Widhe <i>et al.</i> , 1998
IgG2	IFN- γ	IFN- γ IL-4 IL-6	Kawano <i>et al.</i> , 1994 Kitani <i>et al.</i> 1993 Kotowich <i>et al.</i> , 1993
IgG3	IL-4 IL-10	IL-4 IL-10 IFN- γ	Brière <i>et al.</i> , 1994a Fujieda <i>et al.</i> , 1995 Kitani <i>et al.</i> 1993 Kotowich <i>et al.</i> , 1993 Widhe <i>et al.</i> , 1998
IgG4	IL-4 IL-13	IL-4 IL-10 IL-13 IL-5, IL-6 (IL-4 dépendant)	Akdis <i>et al.</i> , 1998 Fujieda <i>et al.</i> , 1995 Kitani <i>et al.</i> 1993 Maggi <i>et al.</i> , 1989 Pène <i>et al.</i> , 1988 Zurawski <i>et al.</i> , 1994
IgE	IL-4 IL-13	IL-4 IL-13 IL-5, IL-6 (IL-4 dépendant)	Cocks <i>et al.</i> , 1993 Gascan <i>et al.</i> , 1991 Maggi <i>et al.</i> , 1989 Pène <i>et al.</i> , 1988 Zurawski <i>et al.</i> , 1994
IgA	TGF- β IL-10	TGF- β IL-10 IL-4, IL-5, IL-6	Brière <i>et al.</i> , 1994b Defrance <i>et al.</i> , 1992 Kotowich <i>et al.</i> , 1993 Sonoda <i>et al.</i> , 1989 Van Vlasselaer <i>et al.</i> , 1992 Zan <i>et al.</i> , 1998

Contrairement aux autres isotypes, l'IFN γ est la seule cytokine décrite pour induire la commutation isotypique des IgG2. A l'inverse, l'IL-4 semble jouer un rôle pléiotropique dans la régulation de la commutation et/ou de la production des différentes classes d'anticorps.

Néanmoins, il a été démontré dans de nombreux modèles que cette cytokine régule préférentiellement les isotypes les IgE et IgG4. Dans certains cas, l'IL-4 peut également intervenir dans la production des IgG1 et des IgG3. La régulation des isotypes IgE et IgG4 est également fortement dépendante de l'IL-13. En revanche, l'IL-10 est probablement une cytokine clef dans l'orientation de la réponse immune vers la production d'IgE ou d'IgG4. Les résultats d'Akdis *et al.* (1998) ont en effet récemment démontré que la stimulation par l'IL-10 provoquerait une augmentation des IgG4 sans aucune action sur la production des IgE.

Comme nous pouvons le remarquer dans ce tableau, l'IL-10 semble jouer un rôle prépondérant dans la stimulation des sous-classes IgG. En particulier, elle permet la commutation isotypique des IgG1 et IgG3 (Brière *et al.*, 1994a).

De plus, cette cytokine coopère avec le TGF β dans l'induction de l'isotype IgA. Bien que le rôle commutatif de l'IL-10 vers les IgA soit plus suggéré que démontré (DeFrance *et al.*, 1992), cette cytokine immunorégulatrice semble plus particulièrement stimuler la production des IgA (Brière *et al.*, 1994b). Le TGF β est ainsi la cytokine intervenant surtout dans la commutation isotypique des IgA (Van Vlasselaer *et al.*, 1998).

III.3.1.b) Profils Th1 et Th2:

En 1986, Mosmann *et al.* décrivaient pour la première fois que deux sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ auxiliaires existaient chez la souris. Ces sous-populations nommées Th1 et Th2 étaient caractérisées par leur dichotomie dans le profil de cytokines sécrétées. A l'heure actuelle, de très nombreuses études ont permis non seulement de confirmer cette dichotomie de sécrétion des cytokines mais principalement de décrire une fonction différente de ces profils immunitaires dans de nombreux modèles infectieux ou pathologiques (Mosmann *et al.*, 1996).

Chez l'homme, cette dichotomie partagent de très fortes similarités avec celle observée chez la souris (Romagnani, 1992). Aujourd'hui, la notion de cellules Th1 ou Th2 s'est étendue à la description de profil immunitaire de type Th1 ou de type Th2. Ils ne concernent donc plus la sécrétion de différentes cytokines et la dichotomie fonctionnelle des seules cellules T CD4⁺ auxiliaires mais caractérisent un profil de la réponse immune spécifique incluant plusieurs types cellulaires.

Les profils Th1 ou Th2 sont associés non seulement à une production différente des cytokines mais principalement à une fonctionnalité bénéfique ou pathologique dans de nombreux modèles infectieux et immunitaires chez l'homme. Comme nous avons décrit précédemment que certaines cytokines étaient impliquées dans la production des différentes sous-classes d'anticorps, les isotypes sont eux aussi associés à un profil de type Th1 ou Th2.

L'ensemble des données est résumé dans le tableau ci-dessous. Les cytokines et isotypes indiqués en couleurs sont clairement caractéristiques de chaque profil.

Les profils Th1 et Th2 chez l'homme (d'après Romagnani, 1992)

	Profil Th1	Profil Th2
Cytokines	IFN-γ IL-2 IL-12 IL-18 TNF α , TNF β IL-3, GM-CSF	IL-4 IL-5 IL-10 IL-13 IL-6, IL-9 IL-3, GM-CSF
Isotypes	IgG2 IgG1 IgG3	IgG1 IgG4 IgE IgG3 IgA
Association bénéfique		
	Leishmaniose Trypanosomiase Lèpre, Tuberculose Infections virales Candidose Allergie	Autoimmunité (Arthrite rhumatoïde) Borreliose Infections helminthiques (schistosomes , nématodes) Grossesse
Association pathologique		
	Autoimmunité (sclérose en plaques, arthrite rhumatoïde) Nématodes Rejet transplantation	Leishmaniose Lèpre Infections virales Allergie et Asthme

Le profil Th1 est généralement impliqué dans les réponses immunes à médiation cellulaire lors d'infections par des pathogènes intracellulaires et dans les réactions d'hypersensibilité retardée. Il est caractérisé par la sécrétion d'IL-2, d'IFN γ et d'IL-12 et l'isotype IgG2 semble y être associé. Cependant il a été montré récemment au cours de la

maladie de Lyme chez l'homme, infection bactérienne associée à un profil Th1, que l'isotype IgG1 mais principalement IgG3 étaient majoritaires et associés à la production d'IFN γ (Widhe *et al.*, 1998).

La production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et dans la plupart des modèles d'IL-10 est associée au profil Th2 et induit la production des isotypes IgG4 et IgE. L'isotype IgG1 semble cependant majoritairement associé à un profil Th2 plutôt qu'à un profil Th1. La production des IgA dépend de la présence d'IL-10 et cet isotype est plutôt classé dans le profil Th2. Mais le TGF β n'étant pas associé clairement à l'un des deux profils, le classement des IgA au sein du profil Th2 est aujourd'hui de plus en plus contesté.

L'existence de ce profil Th2 est majoritairement associée à une réponse immune spécifique de type humorale et intervient dans la protection contre des infections par des pathogènes extracellulaires telles que les helminthes mais également dans la pathologie allergique.

III.3.2) Immunité spécifique au cours de la schistosomiase humaine:

L'ensemble des données épidémiologiques concernant l'évaluation du niveau d'infection bilharzienne en fonction de l'âge révèle un phénomène particulier. En effet, le nombre d'oeufs retrouvés dans les selles pour *S. mansoni* ou dans les urines pour *S. haematobium* décroît fortement en fonction de l'âge des individus infectés. Alors qu'il augmente au cours de la première décennie de la vie pour devenir maximum chez les personnes âgées de 7 à 15 ans, le niveau d'infection décroît rapidement chez l'adulte alors que l'exposition au parasite, évaluée par le contact avec l'eau contaminée, reste sensiblement le même quelque soit l'âge. Bien que ces fluctuations pourraient être reliées à des comportements différents en fonction de l'âge, il est maintenant bien admis que ces différences d'intensité d'infection trouveraient en fait leur origine dans l'acquisition progressive avec l'âge d'une immunité protectrice naturelle. Ce contrôle immunologique serait favorisé par des infections successives qui sont nombreuses au cours de la vie des individus infectés. Ainsi, la réponse immune spécifique s'acquerrait avec l'âge au cours de l'infection chez l'homme et interviendrait dans une sorte de protection naturelle à l'infection.

Un tel mécanisme d'immunité anti-bilharzienne a été confirmé par des études immunologiques réalisées quelques mois après traitement au PZQ. En effet, la réinfection parasitaire, évaluée par la présence d'oeufs dans les déjections, ne semble pas présenter les mêmes caractéristiques chez tous les individus et deux populations apparaissent distinctes après le traitement. La population dite "résistante à la réinfection" est caractérisée par les individus qui ne présentent plus d'oeufs après le traitement alors qu'ils sont continuellement exposés au

parasite. En revanche, des individus présentent de nouveau des oeufs dans les déjections 3 à 6 mois après le traitement et cette population est alors nommée "susceptible à la réinfection". La comparaison des réponses immunes spécifiques aux antigènes de schistosomes entre ces deux populations a permis de décrire des profils immunitaires associés à une résistance ou à une susceptibilité à la réinfection.

L'évaluation de l'immunité spécifique en fonction de l'âge avant le traitement au PZQ ou en fonction d'une résistance ou susceptibilité à la réinfection après la chimiothérapie a abouti à de nombreuses données immuno-épidémiologiques concernant le profil de la réponse immune protectrice contre les schistosomiasés.

III.3.2.a) Un consensus : la balance IgE/IgG4

L'évaluation de l'immunité anti-parasitaire se focalise principalement sur le rôle que jouent les réponses IgE et IgG4 dirigées contre les antigènes totaux parasitaires: le SWAP (Soluble Worms Antigens Preparation), les antigènes du ver et le SEA (Soluble Eggs Antigens), les antigènes de l'oeuf.

Comme décrit précédemment dans les modèles animaux, les mécanismes d'ADCC semblent jouer un rôle anti-parasitaire crucial au cours de l'infection humaine. Le rôle de l'isotype IgE y semble être prépondérant bien que l'activité cytotoxique ait lieu également en présence d'anticorps spécifiques de type IgG1 et IgG3 (Capron *et al.*, 1975; Capron *et al.*, 1984, Joseph *et al.*, 1983; Khalife *et al.*, 1989). Dans ces mécanismes, la lyse *in vitro* des schistosomes fait intervenir les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes (Capron *et al.*, 1982; Butterworth *et al.*, 1982).

Cependant, une étude menée chez des enfants kenyans infectés par *S. mansoni* a montré que la présence d'anticorps IgM, IgG2 et IgG4 spécifiques aux antigènes parasitaires étaient capables de bloquer *in vitro* l'activité ADCC médiée par les éosinophiles et dépendante des IgG1 et IgG3 effecteurs (Khalife *et al.*, 1986). De plus, le niveau des réponses isotypiques IgM, IgG2 et IgG4 spécifiques à des antigènes polysaccharides d'oeufs était plus élevé chez les individus susceptibles que chez les individus résistants à la réinfection. La présence des trois réponses isotypiques corrélait positivement avec l'intensité de réinfection après chimiothérapie. Ces trois isotopes semblent donc prédictifs d'une susceptibilité à la réinfection et sont désormais classés comme des anticorps "bloquants" les mécanismes d'ADCC IgG1- ou IgE-dépendants (Butterworth *et al.*, 1988; Capron *et al.*, 1994).

Dans de nombreuses études immuno-épidémiologiques, la balance entre les réponses IgE effectrices et IgG4 bloquantes a été évaluée au cours de l'infection par *S. mansoni* ou *S.*

haematobium. Les résultats les plus marquants sont indiqués sur le tableau ci-dessous et concernent l'évaluation des réponses IgE et IgG4 spécifiquement dirigées contre les antigènes parasitaires totaux (SWAP et SEA). Leur évaluation est présentée en fonction de l'âge des individus infectés, de l'intensité d'infection ou au cours de la réinfection parasite après chimiothérapie.

Balance IgE/IgG4 au cours de l'infection humaine:

		IgG4	IgE	Foyer	Références
Age	Enfants	+++	+	Sh - Gambie	Hagan <i>et al.</i> , 1991
	Adultes	+	+++	Sh - Zimbabwe Sm - Sénégal	Ndhlovu <i>et al.</i> , 1996 VanDam <i>et al.</i> , 1996
Intensité d'infection	Forte	+++	+	Sh - Zimbabwe Sh - Zimbabwe	Mutapi <i>et al.</i> , 1997 Ndhlovu <i>et al.</i> , 1996
	Faible	+	+++	Sm - Kenya Sm - Brésil Sm - Sénégal	Naus <i>et al.</i> , 1999 Viana <i>et al.</i> , 1995 VanDam <i>et al.</i> , 1996
Réinfection	Susceptible	+++	+	Sh - Gabon Sh - Zimbabwe	Grogan <i>et al.</i> , 1997 Ndhlovu <i>et al.</i> , 1996
	Résistant	+	+++	Sm - Kenya Sm - Kenya Sm - Brésil	Dunne <i>et al.</i> , 1992 Naus <i>et al.</i> , 1999 Demeure <i>et al.</i> , 1993

Même si des différences dans les réponses IgE spécifiques ont été montrées vis-à-vis de la reconnaissance du SWAP ou du SEA (Webster *et al.*, 1997), il semble exister un consensus entre les différentes études résumées dans ce tableau.

En effet, les réponses immunes IgE anti-SWAP et anti-SEA semblent jouer un rôle protecteur contre la schistosomiase urinaire et intestinale chez l'homme. Cette réponse isotypique se développe lentement en fonction de l'âge mais est maximale chez les adultes qui présentent l'intensité d'infection la plus faible. A l'inverse les réponses IgG4 spécifiques sont particulièrement importantes chez les enfants, individus présentant une forte intensité d'infection. Ces résultats sont confirmés après traitement par le PZQ, où l'isotype IgE est

associé à une résistance tandis que la réponse IgG4 était prépondérante chez les individus susceptibles à la réinfection.

III.3.2.b) La controverse pour les autres isotypes

Bien que le taux d'anticorps soit très variable selon les individus infectés, la réponse IgG1 spécifique au SWAP ou au SEA semble représenter la sous-classe majoritaire des IgG au cours de l'infection (Boctor *et al.*, 1990).

Contrairement aux similarités observées entre de nombreuses études dans l'évolution des réponses IgE et IgG4 spécifiques au cours de l'infection, il semble difficile d'établir un profil protecteur ou non pour les autres réponses isotypiques. En effet, des résultats divergents entre les foyers d'infection sont observés en fonction de l'âge des individus infectés ou de leur niveau d'exposition au parasite.

Différences en fonction de l'exposition au parasite:

Exposition	IgG1	IgG2	IgG3	IgA	Foyer	Références
pop. immigrante	+	+	+++		Sm, Kenya	Naus <i>et al.</i> , 1999
pop. chronique	+++	+++	+	ND		
pop. nouvellement exposée	+++	+++	+		Sm, Soudan	Satti <i>et al.</i> , 1996
pop. chronique	+	+	+	ND		
foyer de forte infection	+	+	+++	+	Sh, Zimbabwe	Mutapi <i>et al.</i> , 1997
foyer de faible infection	+	+	+	+++		

(pop. = population)

L'évolution des réponses isotypiques semble varier selon les populations considérées. En effet, il a été montré au Kenya que la réponse IgG3 était la réponse isotypique prépondérante dans une population immigrante donc nouvellement exposée depuis moins d'un an (Naus *et al.*, 1999). Ce résultat était comparé à celui observé chez une population chroniquement infecté du même village. A l'inverse, au Soudan, aucune différence des réponses IgG3 n'étaient observées entre les populations chroniquement ou nouvellement exposés alors que les IgG1 et IgG2 spécifiques étaient majoritaires chez les individus nouvellement en contact avec le parasite (Satti

et al., 1996). Ces résultats soulignent les différences observées entre les études en ce qui concerne ces trois réponses isotypiques.

De plus, chaque réponse isotypique semble être régulée différemment selon l'intensité d'infection observée dans les différents foyers. En particulier, la réponse IgG3 spécifique est plus élevée dans un foyer de forte infection comparativement à un foyer de faible intensité d'infection tandis que ce phénomène est inverse pour l'isotype IgA (Mutapi *et al.*, 1997).

Les différences entre ces trois exemples indiquent que l'évolution des réponses isotypiques IgG1, IgG2, IgG3 et IgA au cours de l'infection pourrait dépendre étroitement de la nature du foyer d'infection étudié.

Différences en fonction de l'âge des individus infectés:

Les résultats présentés dans ce tableau concernent uniquement les réponses anti-SWAP

IgG1	IgG2	IgG3	IgA	Foyer	Références
↓	↓	=	ND	Sm, Kenya	Naus <i>et al.</i> , 1999
↓	↑	↑	↑	Sm, Sénégal	Van Dam <i>et al.</i> , 1996
=	=	=	=	Sm, Kenya	Webster <i>et al.</i> , 1997a
↑	↓	=	↓	Sh, Zimbabwe	Mutapi <i>et al.</i> , 1997
=	ND	ND	↑	Sh, Zimbabwe	Ndhlovu <i>et al.</i> , 1996

↓ : diminution de la réponse isotypique avec l'âge

↑ : augmentation de la réponse isotypique avec l'âge

= : pas de différence de la réponse isotypique en fonction de l'âge

Comme nous pouvons le remarquer sur ce tableau, la variation des réponses isotypiques en fonction de l'âge des individus semble dépendre fortement de la population étudiée.

Ainsi, les réponses IgG1 anti-SWAP chutent avec l'âge dans une population immigrante nouvellement infectée (Naus *et al.*, 1999) et chez des individus provenant d'un foyer d'infection récent au Sénégal (Van Dam *et al.*, 1996). Par contre, dans des foyers chroniques à *S. mansoni* (Webster *et al.*, 1997a) ou à *S. haematobium* (Ndhlovu *et al.*, 1996), cette réponse isotypique ne varie pas. De plus, nous pouvons remarquer que, dans le même foyer d'infection à *S. haematobium*, la réponse IgG1 ne présente pas une évolution similaire (Ndhlovu *et al.*, 1996;

Mutapi *et al.*, 1997). La comparaison de la réponse IgA semble aboutir également à des observations inverses dans ce foyer de bilharziose urinaire.

L'ensemble de ces données indiquent donc que ces réponses isotypiques évoluent différemment en fonction de l'âge des individus selon les foyers considérés. Contrairement aux réponses IgE et IgG4, il semble ainsi difficile d'évaluer le rôle protecteur ou "bloquant" des isotypes IgG1, IgG2, IgG3 et IgA au cours de l'infection. En effet, aucune de ces quatre réponses isotypiques n'apparaît clairement augmenter en fonction de l'âge et aucune ne semble donc associée étroitement avec la résistance à l'infection acquise naturellement.

De plus, il est à noter que des résultats opposés peuvent être observés dans un même foyer d'infection ce qui souligne encore l'incapacité de déterminer réellement la part de ces isotypes dans la réponse immune acquise contre la schistosomiase.

Les réponses isotypiques présentées ci-dessus étaient spécifiquement dirigées contre le SWAP. Or, il est connu que les sous-classes d'IgG reconnaissent des structures antigéniques différentes qui sont présentes en quantité variable dans le SWAP ou le SEA. En effet, les réponses IgG2 semblent majoritairement dirigées vis-à-vis d'épitopes carbohydrates tandis que l'isotype IgG4 reconnaît uniquement des épitopes peptidiques (Langley *et al.*, 1994). En revanche, les isotypes IgG1 et IgG3 sont capables de reconnaître les deux types de structures.

Les antigènes totaux d'oeufs de schistosome semblent exprimer une plus forte quantité de composés carbohydrates que des antigènes de vers adultes. Cette propriété suggère que la reconnaissance du SWAP ou du SEA par les anticorps de l'hôte pourrait être différente selon l'isotype considéré.

Contrairement aux réponses IgE et IgG4 qui semblent similaires vis-à-vis du SWAP ou du SEA, le tableau ci-dessous montre les variations entre les autres réponses isotypiques dirigées contre le SWAP ou le SEA en fonction de l'âge des individus infectés.

Différences des réponses isotypiques dirigées contre le SWAP ou le SEA en fonction de l'âge des individus

IgG1	IgG2	IgG3	IgA	Foyer	Références
pas de diff.	pas de diff.	pas de diff.	pas de diff.	Sm, Sénégal	Van Dam <i>et al.</i> , 1996
SWAP: = SEA: ↓	SWAP: = SEA: ↓	SWAP: = SEA: ↓	SWAP: = SEA: ↓	Sm, Kenya	Webster <i>et al.</i> , 1997a
pas de diff.			SWAP: ↑ SEA: =	Sh, Zimbabwe	Ndhlovu <i>et al.</i> , 1996
pas de diff.	SWAP: = SEA: ↓	pas de diff.	pas de diff.	Sh, Zimbabwe	Mutapi <i>et al.</i> , 1997

↓ : diminution de la réponse isotypique avec l'âge

↑ : augmentation de la réponse isotypique avec l'âge

= : pas de différence de la réponse isotypique en fonction de l'âge

pas de diff : la réponse anti-SEA est similaire à celle dirigée contre le SWAP

Au sein du foyer sénégalais, la réponse immune dirigée contre le SWAP est similaire à celle observée contre le SEA (Van Dam *et al.*, 1996). Mais dans un foyer kenyan, les quatre réponses isotypiques anti-SEA chutent avec l'âge des individus alors que les réponses dirigées contre le SWAP ne varient pas (Webster *et al.*, 1997a). Dans une région où sévit l'infection à *S. haematobium* (Zimbabwe), Ndhlovu *et al.* (1996) ont montré une évolution différente entre les réponses IgA anti-SWAP et anti-SEA en fonction de l'âge alors que la reconnaissance des IgA était identique entre les deux extraits parasitaires totaux dans un second foyer (Mutapi *et al.*, 1997).

De plus, dans l'étude de Webster *et al.* (1997a), la réponse IgG1 anti-SWAP était significativement plus élevée chez les hommes comparativement aux femmes alors que cette différence n'était pas retrouvée vis-à-vis du SEA. A l'inverse, la réponse IgG1 dirigée à la fois contre le SWAP et le SEA était prépondérante chez les femmes infectées par *S. haematobium* dans un foyer au Zimbabwe (Mutapi *et al.*, 1997).

Les réponses isotypiques spécifiques acquises au cours de l'infection ne présentent donc pas un profil similaire selon l'extrait parasitaire étudié. Les conclusions concernant le rôle protecteur de tel ou tel isotype doivent donc tenir compte de la spécificité de reconnaissance entre le SWAP et le SEA.

Alors que pour les réponses IgE et IgG4 spécifiques, un certain consensus semble exister entre les différentes études, il semble difficile de définir clairement le rôle effecteur des anticorps spécifiques de type IgG1, IgG2, IgG3 et IgA au cours de la schistosomiase humaine. Ces différences dépendent non seulement du foyer d'infection étudié, de l'intensité d'exposition au parasite des populations mais également de la reconnaissance antigénique.

De plus, il n'est pas exclu que la spécificité isotypique soit capable de présenter des variations selon le mode préparatoire des antigènes parasitaires par les différents laboratoires de production. Pour cette raison l'OMS et le Schistosome Vaccine Network ont proposé d'utiliser des lots communs d'extraits parasitaires totaux (SWAP et SEA) afin d'homogénéiser au maximum les études immuno-épidémiologiques menées sur le terrain.

III.3.2.c) Réponse cellulaire dans la schistosomiase humaine:

- Profil Th2 et protection:

Au cours de l'infection, les études immuno-épidémiologiques montrent dans la plupart des cas que le profil de production spécifique des cytokines est associé à une réponse cellulaire de type Th2 chez l'homme (Dunne *et al.*, 1992). Ce phénomène semble être associé à la forte réponse anticorps IgE et IgG4 observée.

En effet, après restimulation *in vitro* par du SWAP des cellules mononuclées du sang (PBMC) de patients infectés par *S. mansoni*, une forte induction d'ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-5 et une forte production de ces deux cytokines dans les surnageants de culture ont été observées (Araujo *et al.*, 1996). A l'inverse, la production d'IFN γ n'a pas été détectée.

L'évaluation de la production spécifique des cytokines dans les populations résistantes ou susceptibles à la réinfection après traitement au PZQ est venu démontrer le rôle de la réponse de type Th2 dans l'acquisition d'une protection contre la schistosomiase. Ceci corrélait avec les observations épidémiologiques qui montraient que l'isotype IgE est associé à ce phénomène.

Dans un foyer chronique à *S. mansoni* au Kenya, la présence d'IL-5 spécifique au SWAP était associée à une résistance à la réinfection alors qu'une telle corrélation n'était pas retrouvé vis-à-vis de la production d'IFN γ (Roberts *et al.*, 1993). L'effet protecteur de la réponse de type Th2 semblait s'acquérir avec l'âge car elle était prépondérante chez les adultes, comparativement aux enfants. L'importance des populations de lymphocytes CD4⁺ a été montrée au cours de l'infection par *S. haematobium* (Grogan *et al.*, 1996). En effet, un

traitement par le PZQ était capable d'augmenter la production spécifique d'IL-4 par ces cellules alors qu'une déficience de production d'IFN γ et d'IL-2 était observée. Le rôle majeur des cellules Th2 dans la protection a été clairement analysé à un niveau clonal chez une population infectée par *S. mansoni* au Brésil (Couissinier-Paris *et al.*, 1995). Cette étude démontrait que la présence de lymphocytes T CD4⁺ de type Th0/2, sécrétant majoritairement de l'IL-4, était majoritaire chez les individus résistants à la réinfection tandis que les patients susceptibles présentaient majoritairement des sous-populations de type Th0/1, produisant de l'IFN γ .

De façon plus générale, la forte réponse Th2 induite au cours de l'infection bilharzienne est également capable de réguler la réponse immune vis-à-vis d'antigènes non parasitaires (Kullberg *et al.*, 1992). En particulier, des individus infectés par *S. mansoni* et vaccinés par l'anatoxine tétanique (TT) présentent une réponse Th1 (production d'IFN γ) spécifique à la TT plus faible que celle observée chez des individus vaccinés mais non-infectés par la schistosomiase (Sabin *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent donc qu'une vaccination induisant une réponse de type Th1 protectrice dans de nombreux modèles bactériens pourrait perdre de son efficacité chez des individus infectés par la schistosomiase.

Cependant, le profil de la réponse cellulaire semble présenter des différences selon la spécificité antigénique. En effet, une réponse cellulaire de type Th2 (IL-4 et IL-5) est observée après une restimulation *in vitro* par du SEA de PBMC d'individus infectés alors que le profil de production des cytokines était associé à une réponse Th0 (IFN γ , IL-5) après restimulation par du SWAP (Williams *et al.*, 1994).

Une différence dans le profil de réponse cellulaire spécifique au SWAP ou au SEA a également été démontré dans un foyer récent d'infection à *S. mansoni* au Sénégal (Marguerite *et al.*, 1999). Dans cette étude, nous avons montré que la réponse cellulaire présentait à la fois un profil de type Th1 et Th2 (production d'IFN γ , d'IL-2 et d'IL-5) et qu'elle semblait prépondérante chez les femmes. L'existence de ce profil mixte pourrait être liée à la particularité de ce foyer d'infection récent où les individus sont exposés au parasite depuis moins de 10 ans. Cette particularité semble être confirmée récemment par Montenegro *et al.* (1999) qui démontrent une régulation des deux profils immunitaires en fonction de la durée de l'infection. En effet, une forte production d'IL-10 spécifique est observée chez des individus chroniquement infectés alors qu'une infection précoce et aiguë est caractérisée par une production prépondérante d'IFN γ . Ces résultats soulignent également le rôle immunomodulateur importante joué par l'IL-10.

- IL-10 : un rôle clef dans l'immuno-modulation au cours de l'infection:

L'infection bilharzienne chronique due à une exposition au parasite pendant de nombreuses années est connue pour réguler négativement les réponses cellulaires, en particulier en inhibant la prolifération et la réactivité des cellules T spécifiques aux antigènes parasitaires (Yazdanbakhsh *et al.*, 1999). Au cours de l'infection chronique par *S. haematobium*, la faible capacité des lymphocytes T à proliférer est concomitante à une modulation des réponses de type Th1 et Th2 spécifiques, caractérisées par une faible production d'IFN γ et d'IL-5 respectivement (Grogan *et al.*, 1998).

L'IL-10 semble jouer un rôle primordial dans ce type de régulation lié à la chronicité de l'infection. En effet, cette cytokine immuno-régulatrice est impliquée dans des mécanismes d'anergie des lymphocytes T spécifiques aux antigènes parasitaires en inhibant l'expression des molécules co-stimulatrices B7 (King *et al.*, 1996).

L'IL-10 est connue pour son rôle inhibiteur des réponses immunes à médiation cellulaire ce qui en fait une cytokine d'intérêt dans l'étude du développement du granulome bilharzien. Ainsi, il a été montré chez l'homme que cette cytokine était capable d'inhiber la formation du granulome bilharzien *in vitro* (Falcao *et al.*, 1998). La relevance de ce résultat au cours de l'infection humaine a été démontré dans une étude qui évalue la réponse cellulaire développée chez des individus présentant des pathologies hépatospléniques graves (Malaquias *et al.*, 1997). Ces auteurs montraient le rôle important de l'IL-10 dans le contrôle immunitaire de la morbidité bilharzienne.

- Réponse cellulaire et pathologie bilharzienne:

La réponse immune de type 1 semble être prépondérante chez les individus présentant des formes pathologiques de la maladie telle que l'hépatosplénomégalie dans le cas d'une infection à *S. mansoni* (Fallon, 2000). En effet, une étude réalisée au Kenya a montré une production d'IFN γ et de TNF α spécifique aux antigènes parasitaires plus élevée chez les patients atteints d'hépatosplénomégalie, comparativement aux individus infectés mais qui ne présentent pas de formes pathologiques (Mwatha *et al.*, 1998). La régulation inverse était observée pour la production d'IL-5. La présence de cytokines pro-inflammatoires, majoritairement associées à une réponse immune de type 1, corrélée à une faible immunité de type 2 semblait donc être impliquée dans le développement de la pathologie bilharzienne. En revanche, les résultats de cette étude sont présentés uniquement chez des enfants âgés de 8 à 16 ans. Nous ne pouvons donc pas exclure que le profil des réponses cellulaires soit différemment régulé chez les adultes atteints d'hépatosplénomégalie.

Des conclusions similaires ont été rapportées dans une étude au Brésil indiquant que les formes hépatospléniques sont associées à un fort taux de $\text{TNF}\alpha$ circulant (Zwingerberger *et al.*, 1990).

III.3.2.d) Immunité et prédisposition génétique:

Le dernier aspect de l'immunité spécifique développée au cours de l'infection humaine concerne la mise en évidence d'un gène codominant contrôlant la susceptibilité à l'infection (Abel *et al.*, 1991). Récemment, un locus chromosomique relié à une résistance à l'infection par *S. mansoni* a été identifié après avoir analysé la ségrégation de marqueurs chromosomiques dans des familles brésiliennes considérées comme résistantes (Marquet *et al.*, 1996). La localisation génétique de ce dernier locus nommé Sm1 sur le chromosome 5, en position q31-q33, laisse présager la participation d'une ou de plusieurs molécules clés dans l'orientation des réponses immunes. En effet, ce locus chromosomique comprend les gènes codant pour l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 et une seconde étude indique que ce locus est relié à une région chromosomique régulant les niveaux d'IgE (Marsh *et al.*, 1994).

L'implication d'un déterminisme génétique semble également intervenir dans le développement des formes hépatospléniques graves de l'infection. En effet, une région nommée Sm2, a été identifiée sur le chromosome 6 en position q22-q23, et est reliée à la susceptibilité pathologique (Dessein *et al.*, 1999). De manière intéressante, ce locus comporte le gène codant pour le récepteur (R1) de l' $\text{IFN}\gamma$, cytokine associée aux formes graves de la maladie. De plus, le développement des hépatosplénomégalies semble être associé à une certaine spécificité HLA (Secor *et al.*, 1989).

Le déterminisme génétique de la susceptibilité à l'infection et à la pathologie pourrait être pris en considération dans les études immuno-épidémiologiques.

IV) Stratégies vaccinales contre les schistosomiasés:

Comme nous l'avions décrit précédemment (chap. I), les moyens actuels de lutte contre les schistosomiasés présentent tous des limites. En effet, les programmes d'éducation pour la santé ou d'assainissement des eaux sont des efforts à longs termes dont il est difficile d'en mesurer l'efficacité. Ces moyens ne peuvent être que complémentaires des stratégies de lutte "biologiques". La lutte anti-vectorielle n'a que rarement montré son efficacité et présente un danger écologique pour la faune et la flore locale. L'emploi du PZQ en traitement de masse ou sélectif depuis vingt ans a contribué à éradiquer la schistosomiasé dans certains pays et a conduit à une limitation des niveaux d'infection dans des foyers extrêmement suivis. Cependant, ce seul moyen de lutte ne peut faire reculer significativement et définitivement la maladie, en particulier dans les régions de forte endémie. En effet, la chimiothérapie n'est pas capable de prévenir les réinfections qui sont quotidiennes dans les foyers d'infection.

De part la limite de ces moyens de lutte, les schistosomiasés n'ont pas réellement régressé au cours des dernières années dans les pays touchés. Elles semblent d'ailleurs progresser dans les pays d'Afrique subsaharienne où elles deviennent un des problèmes majeurs de santé publique par absence de programmes de lutte durable qui sont économiquement coûteux et difficiles à mettre en place à l'échelle d'un territoire entier.

Une lutte efficace contre l'infection ciblée principalement contre le développement de la pathologie bilharzienne, ne pourra être effective que par l'utilisation de stratégies multiples et complémentaires. En particulier, l'utilisation des moyens d'immuno-intervention préventive et/ou thérapeutique semble représenter un espoir majeur. En effet, nous avons décrit en introduction le rôle central que joue la réponse immunitaire de l'hôte à de multiples niveaux dans le contrôle de l'infection et de la pathologie. De la formation des granulomes aux atteintes pathologiques, de l'efficacité de la chimiothérapie à l'acquisition d'une résistance à la réinfection, les mécanismes immunitaires interviennent à tous les niveaux de l'infection.

Le développement d'une stratégie vaccinale combinée à la chimiothérapie pourrait ainsi représenter le moyen de lutte le plus efficace contre les schistosomiasés. L'objectif principal de la vaccination sera donc de prévenir le développement de la pathologie qui est la plupart du temps définitive lorsqu'elle est installée.

IV.1) Objectifs de la vaccination contre les schistosomiases:

Un vaccin efficace contrôlant la pathologie pourrait agir à plusieurs niveaux au cours du cycle parasitaire. D'une part, il pourrait agir directement en induisant une réponse immunitaire capable de tuer les parasites au cours des premières phases de l'infection, en empêchant leur maturation vers le stade adulte. D'autre part, l'efficacité vaccinale pourrait intervenir dans l'inhibition du processus de ponte des oeufs par les parasites, enrayant ainsi le déclenchement des manifestations pathologiques. Enfin, un vaccin ou une immuno-intervention pourrait jouer un rôle thérapeutique en régulant le développement de la pathologie tissulaire après la ponte des oeufs. L'idéal serait bien sûr de pouvoir cibler en même temps ces trois mécanismes.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la réponse immune anti-parasitaire semble s'acquérir avec l'âge au cours de l'infection humaine et présenter ainsi un profil de type "protecteur" chez les adultes. Cependant, l'acquisition de cette immunité ne semble pas suffisamment efficace pour prévenir le développement de la pathologie, puisque les formes les plus graves sont retrouvées chez l'adulte. Un premier objectif pour une vaccination efficace serait donc d'induire une réponse immune protectrice le plus tôt possible dans la vie. Les enfants représentent ainsi la population cible mais une des grandes difficultés réside dans le choix de l'âge idéal de la vaccination. En effet, doit-on vacciner avant tout contact avec le parasite ou doit-on attendre que les enfants aient déjà développé une immunité anti-parasitaire?

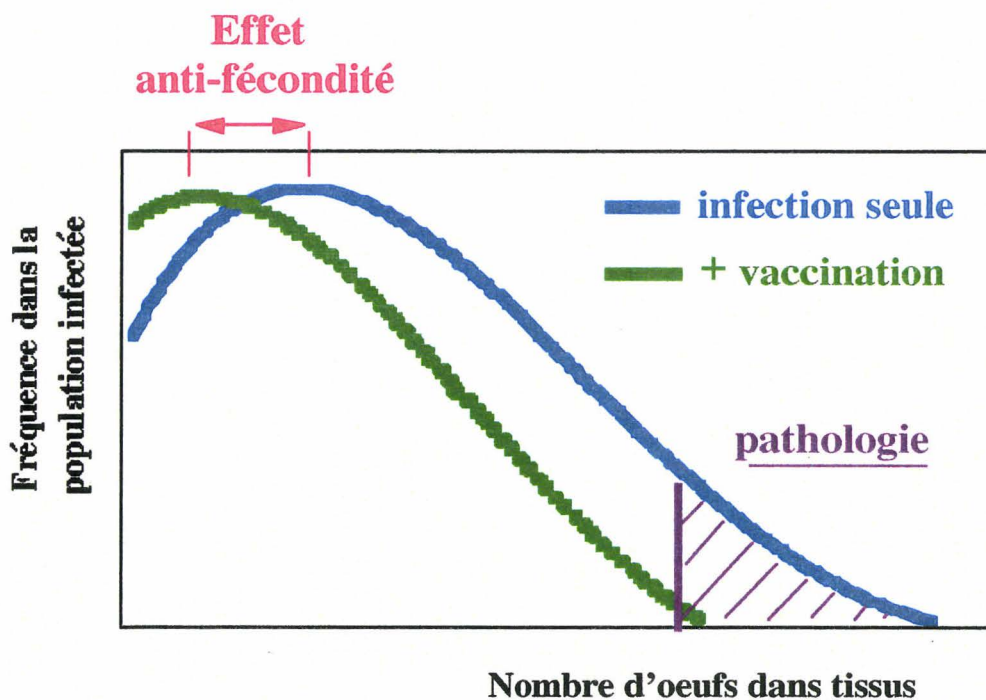
Un vaccin détruisant tous les parasites dès les premiers stades de l'infection paraît utopique car son efficacité serait dépendante d'un facteur essentiel: l'infection elle-même. L'infection permettrait d'augmenter la réponse immune spécifiquement induite après vaccination, celle-ci deviendrait alors efficace pour prévenir le développement de la pathologie.

Des simulations mathématiques font en effet apparaître qu'une réduction de moitié de la charge parasitaire serait suffisante pour à la fois limiter le développement des formes graves de la maladie et réduire la transmission d'une manière importante, à la seule condition que l'immunité protectrice soit prolongée au cours des années (Chan *et al.*, 1997).

En plus d'induire une immunité anti-infectieuse précoce, l'objectif essentiel d'un vaccin anti-bilharzien réside dans le contrôle du développement de la pathologie. Tout d'abord, les cibles vaccinales idéales pourraient se situer à différents niveaux: empêcher la reproduction des vers, inhiber la capacité de ponte, neutraliser l'influence de l'oeuf dans le déclenchement du granulome bilharzien. Un second axe de recherche pour un effet anti-pathologique serait de développer des stratégies d'immunorégulation au niveau du site de la pathologie.

Un vaccin capable d'inhiber la fécondité du parasite représente une des stratégies les plus adéquates pour obtenir un effet anti-pathologique efficace. L'effet d'une telle vaccination peut être représenté schématiquement ainsi:

Efficacité d'un vaccin anti-fécondité:



Dans les populations infectées, retrouver un faible nombre d'oeufs dans les tissus associé à une absence de pathologie est l'observation la plus fréquente. Cependant, l'accumulation des oeufs dans les tissus au cours des nombreuses années d'infection chronique aboutit au développement de la pathologie. L'objectif d'un vaccin anti-pathologique serait alors d'induire une réponse immunitaire protectrice capable d'inhiber la fécondité des parasites. Ce phénomène réduirait le nombre d'oeufs déposés dans les tissus prévenant ainsi le développement de la pathologie.

Le principal objectif du Schistosome Vaccine Network (SVN) s'intègre dans la démarche de définir les buts d'un vaccin contre les schistosomiasés. Initié en 1998 par le Dr. G. RIVEAU, ce réseau européen permet de coordonner les actions "du laboratoire au terrain" pour le développement de stratégies vaccinales. Les objectifs particuliers du SVN sont ainsi les suivants: résoudre des problèmes concernant l'évaluation clinique de l'efficacité de candidats vaccinaux; développer les collaborations entre les différentes équipes de recherche travaillant sur le développement d'un vaccin anti-bilharzien; publier des recommandations sur l'évaluation des candidats vaccins dans les populations infectées.

Dans un souci de communication entre les équipes, une page Web sur le SVN a été réalisée par le Dr. O. POULAIN-GODEFROY (adresse: <http://www.pasteur-lille.fr/svn/>).

IV.2) Approches classiques:

Le rat et la souris sont les modèles expérimentaux les plus utilisés dans le développement des stratégies vaccinales contre la schistosomiase. Cependant, l'infection parasitaire est différente entre ces deux modèles. Le rat est un animal semi-permissif ce qui permet d'étudier particulièrement l'immunité dirigée contre le ver. Par contre, le cycle parasitaire est complet chez la souris et l'évaluation d'un vaccin anti-pathologique est donc particulièrement adaptée dans ce modèle. L'utilisation de ces animaux représentent une première étape indispensable dans la mise en place de stratégies vaccinales contre la bilharziose.

Cependant, l'expérimentation animale ne peut pas reproduire parfaitement l'infection humaine qui évolue lentement et chroniquement suite aux infections continues tout au long de la vie. Ainsi, de nombreuses expériences de vaccination ont été réalisées chez le singe qui semble présenter un développement de la pathologie plus comparable à celui constaté chez l'homme. De plus, ces animaux semble présenter un système immunitaire comparable à celui de l'homme ce qui fait du singe un modèle de choix pour des études pré-cliniques.

Enfin, l'infection naturelle dans le modèle bovin représente probablement l'expérimentation la plus adéquate pour évaluer l'efficacité vaccinale (infection par *S. japonicum* et *S. matheei* des bovins dans les zones d'endémies).

IV.2.1) BCG:

Le Bacille de Calmette Guérin (BCG) est connu pour son rôle immunostimulant puissant. Son administration chez la souris a conduit à une forte protection vis-à-vis de l'infection à *S. mansoni* (Bout *et al.*, 1977). Certaines spécificités antigéniques semblent réagir de manière croisée mais il semble que le mécanisme de protection par le BCG est majoritairement indépendant de toute spécificité antigénique. Ce rôle d'immunostimulation non spécifique pourrait s'appliquer à de nombreuses bactéries ou d'extraits bactériens.

IV.2.2) Cercaires irradiées:

L'injection de cercaires atténuées par irradiation permet d'induire des taux de résistance élevés vis-à-vis d'une infection à *S. mansoni* (Bickle *et al.*, 1979). Cette résistance semble associée à la présence d'IFN γ qui active la cytotoxicité des macrophages sur les schistosomules (James *et al.*, 1986). L'administration de cercaires irradiées induit des mécanismes de réactions inflammatoires pulmonaires qui bloquent la migration des schistosomules (Smythies *et al.*,

1992). Ce mode de vaccination est non seulement protecteur dans le modèle rongeur mais également chez le primate (Coulson, 1997).

De plus, il a été montré chez la souris que les mécanismes cellulaires effecteurs contre le stade pulmonaire du parasite seraient plus efficaces quand les cercaires irradiées sont administrées en présence d'IL-12 utilisée comme immunomodulateur (Wynn *et al.*, 1996).

Néanmoins, un vaccin basé sur des schistosomes vivants atténués par une irradiation est bien sûr inapplicable chez l'homme. Ce modèle a apporté cependant de nombreuses informations concernant la régulation de l'immunité anti-parasitaire développé au cours des premières phases de l'infection.

IV.2.3) Extraits parasitaires:

Il existe des préparations d'extraits antigéniques solubles représentant les différents stades de maturation du parasite. Malgré l'existence de fraction d'antigènes solubles de furcocercaires ou de schistosomules, les extraits d'antigènes de vers adultes (SWAP) et d'oeufs (SEA) sont les plus utilisés. Des résultats de vaccination décevants ont été obtenus avec ces différentes préparations même si une injection intradermique de SWAP permettait une réduction de 50% de la charge parasitaire (James *et al.*, 1990). Mais l'efficacité relative de cette vaccination était observée uniquement en présence de BCG.

Les extraits antigéniques présentent les désavantages d'être difficilement reproductibles en terme de production et sont constitués d'une véritable soupe d'antigènes dont les effets conjugués pourraient se contrecarrer mutuellement. L'administration de cette soupe antigénique pourrait également provoquer de graves réactions croisées avec des protéines du soi. De part ces nombreux désavantages, l'utilisation de ces antigènes parasitaires totaux apparaît irréalisable chez l'homme. De plus, il pourrait être difficile de produire ces extraits en respectant les normes GMP (Good Manufactory Practices) qui sont indispensables à tout essai clinique chez l'homme.

IV.3) Antigènes recombinants:

Les approches classiques présentées ci-dessus montre leur limite d'utilisation chez l'homme. Une approche plus fine consiste à isoler séparément les antigènes présents dans les extraits d'antigènes totaux. Comme la purification d'un antigène à partir des stades parasitaires demande une grande quantité de matériel et une hétérogénéité difficilement contrôlable, une stratégie efficace est venue du clonage de ces antigènes dans des vecteurs principalement bactériens afin de produire en grande quantité et sous contrôle les protéines antigéniques recombinantes. Cette stratégie repose essentiellement sur deux approches:

(1) Après purification d'antigènes à partir d'extraits solubles de parasites, les protéines suffisamment pures sont administrées à des animaux pour tester leur immunogénicité et leur pouvoir protecteur. Par microséquençage ou à l'aide des anticorps générés, il est alors possible de cloner l'antigène d'intérêt à partir d'une banque d'ADN ou d'expression.

(2) Le clonage de protéines à potentiel vaccinal peut être réalisé à partir de données immuno-épidémiologiques ou d'observations chez l'animal. Par exemple, les antigènes qui génèrent d'une manière naturelle une réponse humorale importante chez des individus résistants à une réinfection peuvent être sélectionnés.

Par cette seconde approche, l'équipe du Dr Dunne a cloné une protéine de 22,6 kDa à partir de parasites adultes. Cette molécule avait été préalablement identifiée comme un antigène majoritairement reconnu par des IgE chez des individus résistants à une réinfection à *S. mansoni* (Webster *et al.*, 1996).

Mais la vaccination par un antigène fortement immunogène au cours de l'infection humaine pourrait potentiellement induire une anergie spécifique de la réponse immune et engendrer ainsi une efficacité modérée de la préparation vaccinale. Une stratégie alternative consiste à rechercher des cibles antigéniques dissimulées par le parasite mais qui sont essentielles pour ses fonctions vitales. A ce titre, les nombreuses enzymes parasitaires identifiées représentent aujourd'hui les candidats vaccinaux les plus prometteurs.

La liste des principaux antigènes clonés des schistosomes est présentée ci-dessous.

Principaux antigènes clonés des schistosomes:

Famille protéique	Antigènes	Stade parasitaire	Protection (%)		Références
			Vers	Oeufs	
Enzymes antioxydantes	Glutathion S-Transferases: Sm28GST, Sh28GST, Sb28GST, Sj26GST	Adulte/ Somule/ Oeufs	30-60	30-90	Capron 1998 Liu <i>et al.</i> , 1995a Liu <i>et al.</i> , 1995b
	Glutathion peroxidases	Adulte	ND	ND	Roche <i>et al.</i> , 1994
	Superoxyde dismutases	Adulte	ND	ND	Mei <i>et al.</i> , 1995
	Cytochrome c oxydase				
Enzymes glycolytiques	Triose Phosphate Isomérase	Adulte/ Somule/ Oeufs	30-60	ND	Reynolds <i>et al.</i> , 1994
	Phosphoglycérate kinase	Adulte	ND	ND	Lee <i>et al.</i> , 1995
	GADPH (Sm37)	Adulte	ND	ND	Waine <i>et al.</i> , 1993a
	Enolase	Adulte	ND	ND	Waine <i>et al.</i> , 1993b
Protéines musculaires	Paramyosines (Sm97, Sj97)	Adulte/ Somule	39	ND	Pearce <i>et al.</i> , 1988
	IrV-5	Adulte/ Somule/ Oeufs	30-90	ND	Soisson <i>et al.</i> , 1992
Protéines de surface	Sm23	Adulte/ Somule/ Oeufs	40-50	ND	Reynolds <i>et al.</i> , 1992
	Sm14	Adulte/ Somule	65	ND	Tendler <i>et al.</i> , 1996
	Sm22.6, Sj22.6	Adulte	ND	ND	Webster <i>et al.</i> , 1996 Waine <i>et al.</i> , 1994
	SmW68	Adulte	ND	ND	King <i>et al.</i> , 1989
	PIII, P24	Adulte	37-44	ND	Hirsh <i>et al.</i> , 1997
	gp38	Adulte/ Somule/ Oeufs	48-75	ND	Grzych <i>et al.</i> , 1987
Protéine d'oeufs	p14	Oeufs	ND	ND	Chen <i>et al.</i> , 1992
	p48	Oeufs	ND	ND	Chen <i>et al.</i> , 1992

Parmi ces nombreuses protéines, six antigènes recombinants ont été sélectionnés par l'OMS comme des candidats vaccinaux prometteurs contre la schistosomiase (Bergquist *et al.*, 1998). Une propriété obligatoire dans la sélection était qu'il devait être capables de générer une immunité anti-parasitaire conduisant à une réduction de plus de 40 % de la charge parasitaire, après une infection expérimentale chez la souris par *S. mansoni*. Bien que seule l'administration des GST induisent un effet direct sur une réduction du nombre d'oeufs, une charge parasitaire réduite à 40 % semblait représenter une limite pour détecter une réduction du nombre d'oeufs déposés dans les tissus et ainsi prévenir le développement de la pathologie (Bergquist *et al.*, 1998).

De plus, les réponses immunes spécifiquement dirigées contre ces six antigènes ont été évaluées dans des populations infectées par *S. mansoni* en Egypte, sous le contrôle de l'OMS (UNDP/World Bank/TDR). L'objectif était d'analyser le profil de la réponse humorale et cellulaire spécifique de chaque antigène avant et après traitement au PZQ dans une même population. A l'heure actuelle, aucun résultat n'a été communiqué.

- Triose Phosphate Isomérase (TPI): Harvard School of Public Health, Boston, USA

Cette enzyme de 28kDa est impliquée dans le métabolisme du glucose et est présente à tous les stades parasitaires (Harn, 1985). Cette protéine clonée présente une activité enzymatique et chez la souris, les taux de protection varient de 30 à 60 % (Shoemaker *et al.*, 1992). Cette protéine est testée sous sa forme d'un peptide synthétique: le MAP-4 (Multiple Antigenic Peptides) ce qui peut présenter un problème de synthèse selon les normes GMP.

- Paramyosin Sm97: NIH, Cornell University, USA

Cette protéine musculaire de 97 kDa a été isolée à partir d'antigènes de vers adultes de *S. mansoni*. L'administration chez la souris de la Sm97 purifiée de la Sm97 recombinante adjuvantée de BCG induit une réduction de 39 % de la charge parasitaire (Pearce *et al.*, 1988). Mais cette protéine présente de véritables problèmes d'expression sous forme recombinante et semble donc peu appropriée à une production en normes GMP.

- IrV-5: Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA

Cette protéine musculaire de 62 kDa (irradiation-associated vaccine antigen) a été isolée à partir d'antigènes de surface de schistosomules à l'aide de sérums provenant de souris vaccinées par des cercaires irradiées. Un taux de protection hétérogène mais pouvant atteindre 90 % de la charge parasitaire est obtenu chez la souris après trois injections sous-cutanées de la protéine recombinante (Soisson *et al.*, 1992). Bien que de tels résultats peuvent être obtenus chez le rat, la protection chez le babouin a montré des résultats décevants.

- **Sm23** : Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA

Cette protéine de 23 kDa est probablement un homologue d'une super-famille de protéines membranaires composées de quatre domaines transmembranaires et de deux domaines extracellulaires hydrophiles (Reynolds *et al.*, 1994). La forme peptidique de cette protéine nommée MAP-3 contient des épitopes B et T et son administration chez la souris induit 40 à 50 % de réduction du nombre de vers.

- **Sm14**: Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Cet antigène membranaire est également appelé FABP-14 (Fatty Acid Binding Protein) et est présent aux stades schistosomule et ver adulte (Moser *et al.*, 1991). Son administration chez la souris induit un degré de protection de 65 % (Tendler *et al.*, 1996). La particularité de la Sm14 est sa forte homologie avec la protéine Fh12 de *Fasciola hepatica*, parasite responsable d'atteintes hépatiques chez le bétail. Ainsi, l'immunisation de souris avec la molécule Fh12 est capable de protéger contre l'infection par *S. mansoni* (Tendler *et al.*, 1995). Une telle réaction croisée permet d'envisager une vaccination contre plusieurs parasites co-endémiques. Les premiers essais cliniques vétérinaires contre la fasciolose devraient être mis en route cette année, sous la responsabilité du Prof. M. TENDLER.

Les Glutathion S-Transférases de 28 kDa de *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. Bovis*, qui sont la propriété de l'Institut Pasteur de Lille, représentent actuellement les candidats vaccinaux les mieux caractérisés (Capron, 1998). Leur caractéristique et leur potentiel vaccinal fera l'objet du chapitre suivant.

IV.4) Les antigènes 28GST: de la découverte aux essais cliniques

IV.4.1) Historique:

La Glutathion S-Transférase de 28kDa du parasite *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) fut la première GST caractérisée des différentes espèces de schistosomes en 1987. La découverte de cet antigène à potentiel vaccinal est issue d'une stratégie de recherche de protéines susceptibles d'engendrer une réponse immune dirigée contre le stade schistosomule. Sachant qu'il apparaît une immunité concomitante lors d'une infection expérimentale avec *S. mansoni*, l'équipe du Professeur André Capron a choisi le ver adulte comme sources d'antigènes à potentiel vaccinal (Balloul *et al.*, 1987). Dix fractions de vers adultes ont alors été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide et seules trois induisaient une réponse immune spécifique après leur administration chez des rats. Les anticorps dirigés contre deux d'entre elles reconnaissaient des produits de traduction *in vitro* d'ARNm de ver adulte mais une seule fraction, celle de poids moléculaire apparent de 28 000 Da, a pu être isolée des molécules à la surface des schistosomules et pouvait donc représenter une cible vaccinale possible. En effet, l'immunisation de cette fraction purifiée a permis d'obtenir une réduction de la charge parasitaire de 50 à 70 % chez le rat Fischer et de 40 à 43 % chez la souris Balb/c (Balloul *et al.*, 1987a).

Le criblage d'une banque d'expression de *S. mansoni* a permis de cloner et de séquencer une molécule de 211 acides aminés qui a pu être exprimée chez *E. Coli* (Balloul *et al.*, 1987b) puis chez *S. cerevisiae* (Loisson *et al.*, 1989). Cette protéine a été clairement identifiée comme appartenant à la classe des Glutathion S-Transférases (GST) de part son rapprochement avec des séquences de GST connues (rat et homme notamment) et de part son activité enzymatique GST.

IV.4.2) Les 28GST : caractéristiques et fonctions

IV.2.a) Différences avec les GST d'autres espèces

La Sm28GST présentent des homologies de séquences importantes avec des GST d'autres parasites. Il s'agit particulièrement des GST de *Ascaris suum* (nématode), *Onchocerca volvulus* (nématode) et *Fasciola hepatica* (trématode). De plus, il a été montré que l'administration de la GST de 26 kDa de *F. hepatica* permet d'induire une immunité protectrice vis-à-vis de cette infection du bétail (Sexton *et al.*, 1990). La GST de 24 kDa de *O. volvulus* (Ov24) pourrait elle aussi représenter un candidat vaccin prometteur contre cette filariose. En effet, une forte réponse immune contre cet antigène semble être associée à une protection naturelle chez des individus infectés en Sierra Leone (Salinas *et al.*, 1996).

Les enzymes GST de ces différentes espèces pourraient se révéler être de bons candidats vaccinaux à la fois contre les plathelminthes, mais également contre les vers intestinaux et les filaires.

Malgré ce fort degré de conservation de cette famille de molécules entre différents parasites, les 28GST des schistosomes ne présentent pas de réactions immunologiques croisées avec des GST hépatiques et placentaires de mammifères, dont celles de l'homme (Taylor *et al.*, 1988). En effet, la comparaison de la séquences de la Sm28GST avec l'ensemble des GST de mammifères indiquait une relative conservation des régions N-terminales (impliquées dans le site de fixation du Glutathion) alors que les autres séquences peptidiques ne présentaient aucune similarité avec les GST humaines.

Il apparaît en fait que la séquences de la Sm28GST soit composée d'un ensemble de courtes séquences présentant des homologies avec les GST des familles α et μ . Mais l'activité enzymatique de la GST de schistosomes semble se rapprocher davantage des GST de la famille π ou μ , selon leurs spécificités de substrats et d'inhibiteurs (Taylor *et al.*, 1988, Walker *et al.*, 1993).

IV.2.b) Les 28GST des différentes espèces de schistosome

Suite au clonage de la Sm28GST, les 28GST d'autres espèces de schistosomes ont également été séquencées et clonées (Trottein *et al.*, 1992). Les séquences d'acides aminés des molécules des espèces *S. bovis*, *S. haematobium*, *S. mansoni* et *S. japonicum* et leur différences sont indiquées sur la figure ci-dessous (les épitopes majeurs sont soulignés).

Comparaison des séquences en acides aminés des 28GST des différentes espèces de schistosome (d'après Trottein *et al.*, 1992)

	* *			30			*	70
Sb28GST	MTGDHIKVIY	FNGRGRAESI	RMTLVAAGVN	YEDERISFQD	WPKIKPTIPG	GRLPAVKITD	NHGHVKWMLE	
Sh28GSTV	
Sm28GST	-A-E-.....	-D-.....-D-V-	D-.....	
Sj28GST	V-L-..-P-	--I-.....	E F-...E--I-...	KR-D--T-S-	
		*		100	*	*		140
Sb28GST	SLAIARYMAK	KHHMGETDE	EYYNVEKLIG	QVEDLEHEYH	KTLMKPEEEK	QKITKEILNG	KVPVLLDIIC	
Sh28GSTG-E-	-A-.....Y-I-...	
Sm28GST-S-	-A-V-...-Q...	E-.....-NM-	
Sj28GST-FI-R	--N--D--D	---II-M-	---V-S-	---I-P-	E--S-.....	---I-QA-	
			170					211
Sb28GST	ESLKASTGKL	AVGDKVTLAD	LVLIAVIDHV	TLDLKEFLTG	KYPEIHKHRE	NLLASSPRLA	KYLSDRRAATP	F
Sh28GST	
Sm28GST-G-.....-G-.....-N-P-.....	
Sj28GST	-T-E--N-	T-.....	V-...S--I-K	H--T-K--	---E-H--A-	

De fortes homologues entre les quatre 28GST ont été mises en évidence, particulièrement au niveau des régions que l'on a identifiées par la suite comme des épitopes majeurs. Les protéines Sb28GST et Sh28GST partagent la plus forte homologie avec 97 % d'acides aminés identiques. La Sm28GST partage 90 % d'homologie avec la Sb28GST. Ces trois GST présentent donc une similarité pratiquement totale entre elles. Cependant, seul l'épitope 115-131 de la Sh28GST n'est pas reconnu par des sérums provenant de rats immunisés par la Sm28GST tandis que cette séquence peptidique des autres 28GST est parfaitement reconnue (Trottein *et al.*, 1992). Ce résultat indique donc une particularité intéressante entre la Sh28GST et la Sm28GST au niveau de cet épitope dominant.

Par contre, la protéine de l'espèce *S. japonicum* est nettement moins homologue car elle ne présente que 77 % d'identité avec les autres 28GST. Les différences sont particulièrement frappantes au niveau de la région N-terminale de la molécule mais également dans la région C-terminale. En effet, aucune réaction croisée pour ces deux régions n'a été mise en évidence entre la Sm28GST et la Sj28GST (Trottein *et al.*, 1992).

De plus, il existe des isoformes des 28GST. En effet la Sm28GST peut exister sous trois isoformes qui sont liés à une combinaison particulière entre deux monomères (Pierce *et al.*, 1994). Ces molécules présentent en effet une activité enzymatique sous forme dimérisée par formation d'un pont disulfure.

IV.2.c) Expression et fonctions au cours des stades parasitaires

Chez les schistosomes, les 28GST sont exprimées à chacun des stades du développement. La localisation de la Sm28GST en microscopie optique et électronique a montré sa forte expression chez le ver adulte au niveau du tégument (tubercules), du parenchyme et des organes génitaux (Liu *et al.*, 1996).

Les GST de schistosomes sont des enzymes multifonctionnelles en présentant non seulement des activités catalytiques mais également des propriétés de transports en fonction de leur localisation et de leur expression aux différents stades parasitaires. Le rôle majeur qui leur est généralement attribué est celui de protection contre la peroxydation des lipides induite par les réactions immunes non spécifiques de l'hôte. Les GST représentent donc des protéines majeures dans la survie du schistosome dans son hôte.

En ce qui concerne son activité de détoxification, les radicaux oxydants sont naturellement produits par le métabolisme des cellules au cours des mécanismes de détoxification. Dans le cas d'organismes comme le schistosome, l'activité détoxifiante est double car ils doivent non seulement se protéger des composés toxiques de leur propre métabolisme mais également contrecarrer les nombreuses agressions cellulaires de l'hôte qui

libèrent de nombreuses toxines dans le sang. Les principales cellules libératrices de produits toxiques pour le schistosome sont les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes (Joseph *et al.*, 1980).

Les schistosomes comme tous les helminthes sont dépourvus de cytochrome P-450, protéine essentielle au système d'oxydoréduction chez les mammifères (Precious *et al.*, 1989). Ainsi les GST de schistosomes occupent une fonction essentielle dans l'ensemble des processus de détoxification des radicaux oxydants. Ces enzymes ont une action complémentaire de détoxification avec la catalase, la cytochrome c peroxydase, la superoxyde dismutase (Cordeiro da Silva *et al.*, 1992) et les glutathion peroxydases (Roche *et al.*, 1994). Les GST n'agissent probablement pas en première ligne mais elles sont particulièrement impliquées dans la détoxification des lipides sur lesquels des groupements oxydés ont été précédemment transférés.

L'activité enzymatique des GST parasites est caractérisée par la catalyse et la conjugaison du glutathion (GSH: γ -Glu-Cys-Gly) par attaque nucléophile de divers substrats oxydés, notamment des hydroperoxydes de lipides. Ce processus conduit à une diminution de la réactivité des molécules toxiques et augmente le caractère hydrophile de celles-ci, permettant leur solubilisation et leur élimination. Cette fonction joue donc un rôle capital dans le maintien de la structure tégumentaire, exposée aux attaques de l'hôte.

D'autres fonctions ont été décrites pour les GST de mammifères et pourraient être cruciales chez les schistosomes. Ainsi, ces enzymes peuvent participer à la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes C4 et peuvent être impliquées dans des mécanismes de transport et de stockage de composés lipophiles ou d'hormones stéroïdiennes (Ketterer *et al.*, 1988; Listowsky, 1988). Enfin, nous pouvons faire un rapprochement avec la fonction d'une GST testiculaire de rat dans la fertilité, puisque l'inhibition enzymatique de cette protéine par des anticorps spécifiques étaient capables d'inhiber la fécondation *in vitro* (Aravinda *et al.*, 1995).

IV.4.3) Immunogénicité:

IV.4.3.a) Mise en évidence des épitopes majeures dans les modèles animaux:

A l'heure actuelle, la majorité des études d'immunogénicité des 28GST des schistosomes ont été réalisées avec la Sm28GST. Seules deux études concernant la Sh28GST ont été publiées à ce jour et ont montré que l'administration de cette protéine chez le singe (Boulanger *et al.*, 1999) et chez la souris (Lane *et al.*, 1998) induisait une réponse humorale spécifique IgG et IgA en présence d'adjuvant comme le BCG et le FCA.

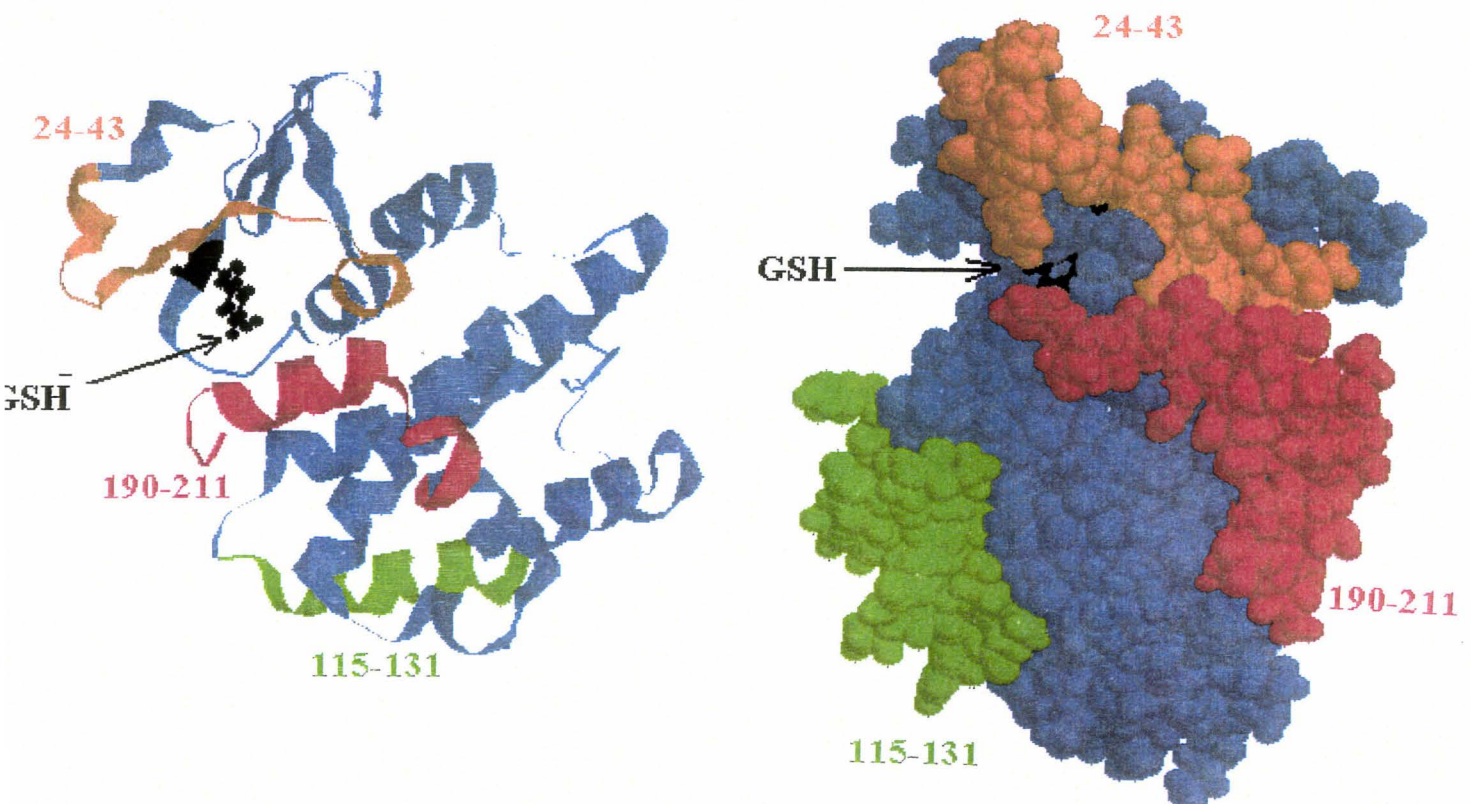
La Sm28GST a donc été sélectionnée comme potentiellement vaccinale car elle était capable d'induire des anticorps chez le rat. Trois peptides semblent être les épitopes immunogènes majeurs de cette protéine dans les modèles animaux. En effet, de nombreux peptides synthétiques issus de la séquence primaire de la Sm28GST ont été testés pour leur capacité à restimuler *in vitro* des cellules T de souris immunisées par l'antigène ou infestées, ainsi que pour leur propriété à être reconnus par des anticorps de ces mêmes animaux. On pouvait alors parler d'épitopes T et B (Auriault *et al.*, 1988; Auriault *et al.*, 1991). Dans ces expériences chez l'animal, il s'est avéré que l'antigène est composé de trois épitopes majeurs:

- le fragment N-terminal 24-43 (ou 10-43): épitope T
- le fragment 115-131 : épitope T et B
- le fragment C-terminale 190-211 : épitope T

La localisation tridimensionnelle de ces fragments peptidiques sur la protéine indique que le fragment 115-131 forme une boucle au niveau de la partie la plus proéminente de la protéine. Les deux autres fragments épitopiques, malgré leur éloignement sur la séquence primaire, se retrouvent à proximité l'un de l'autre pour former deux hélices parallèles et inversées. Suite à de nombreuses études, il a été montré que les peptides 24-43 et 190-211 forment la niche enzymatique (Capron *et al.*, 1998).

Au cours de cette thèse, la protéine d'intérêt fut la Sh28GST. La modélisation de cette protéine a été établie à partir d'un alignement informatique de séquences des structures les plus homologues (René Wintjens, Institut Biologie de Lille).

Représentation de la structure tridimensionnelle de la Sh28GST (monomère):



IV.4.3.b) Réponse immune anti-28GST dans les populations infectées:

La réponse immune spécifique à la Sh28GST chez les individus infectés par *S. haematobium* n'a jamais été évalué au cours de l'infection humaine. En revanche, trois études de notre laboratoire ont été réalisées concernant l'acquisition de la réponse immune anti-Sm28GST au cours de l'infection par *S. mansoni* au Kenya.

La première étude avait pour objectif de déterminer si les individus infectés présentaient une réponse cellulaire spécifique après stimulation *in vitro* des PBMC par la Sm28GST (Auriault *et al.*, 1991). La réactivité cellulaire T a été évaluée chez 60 individus âgés de 8 à 18 ans, en mesurant la capacité des cellules à proliférer en présence de l'antigène. Une prolifération faible mais détectable était retrouvée chez 80 % des individus après stimulation par la Sm28GST entière. Cependant, de fortes différences étaient observées après la stimulation par différents peptides dérivés de la structure primaire de la Sm28GST (7 peptides testés au total). Les peptides 24-43, 115-131, 140-153 et 190-211 semblaient être ainsi des épitopes T majoritaires chez l'homme. Cette étude montrait pour la première fois l'existence de cellules T spécifiques à la Sm28GST dans les populations infectées.

Les réponses anticorps spécifiques ont été évaluées dans ce même foyer chez des individus résistants ou susceptibles à une réinfection. L'étude menée par Auriault *et al.* (1990) montrait clairement que la réponse IgG4 anti-Sm28GST était associée à la susceptibilité à la réinfection chez les enfants âgés de 9 à 16 ans après le traitement au PZQ. Bien que la réponse IgE spécifique n'était pas corrélée à la résistance à la réinfection, ces résultats étaient en accord avec ceux décrits précédemment sur le rôle de la balance IgE/IgG4 vis-à-vis des antigènes totaux parasitaires au cours de l'infection par *S. mansoni* (SWAP et SEA).

Cette étude indiquait également que la reconnaissance des différents peptides de la Sm28GST semblaient dépendre de la réponse isotypique. En effet, la réponse IgG3 était majoritairement dirigée contre l'épitope 140-153 tandis que la réponse IgG1 était préférentiellement associée au peptide 24-43. Comme les réponses IgE et IgG4, la réponse IgA était spécifique des peptides 24-43, 115-131 et 140-153. Pour ces réponses épitopiques, aucune différence n'était observée entre les individus résistants et susceptibles à la réinfection. Les réponses anticorps spécifiques du peptide 190-211 n'ont pas été évaluées dans cette étude.

Ces résultats complémentaires à ceux obtenus chez l'animal indiquaient donc que les épitopes 24-43, 115-131 et 190-211 semblaient être également des épitopes B dominants. Ainsi, une réponse humorale spécifique de la Sm28GST et de certains de ces épitopes pouvaient être détectée dans les populations humaines.

La troisième étude réalisée au Kenya a montré le rôle de la réponse IgA spécifique à la Sm28GST dans l'acquisition d'une résistance à la réinfection (Grzych *et al.*, 1993). En effet, une augmentation des IgA anti-Sm28GST était particulièrement observée chez les adultes après le traitement au PZQ. Ces deux types de réponses corrélaient négativement avec l'intensité de réinfection. Ce phénomène semblait être associé à la fonctionnalité de la réponse IgA spécifique qui était capable d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST. De plus, cette association semblait être impliquée dans la réduction du nombre et de la viabilité des oeufs pondus par les vers adultes observée *in vitro* en présence des sérums des individus infectés. En effet, ces phénomènes d'anti-fécondité n'étaient plus observés après déplétion de l'isotype IgA dans les sérums. La réponse IgA anti-Sm28GST pourrait donc tenir une place importante dans des mécanismes immunitaires capables d'inhiber la fécondité du parasite.

Ce dernier mécanisme essentiel dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase et le fait qu'une réponse immune spécifique à la Sm28GST puisse être développé chez l'homme au cours de l'infection montrent que cette GST parasitaire est un candidat vaccinal des plus prometteurs.

IV.4.4) Efficacité vaccinale des antigènes 28GST:

IV.4.4.a) Efficacité sur différents stades parasitaires

Les antigènes 28GST représentent des candidats vaccinaux particuliers par rapport aux autres protéines clonées des schistosomes. En effet, leur administration induit une réponse immunitaire spécifique capable d'intervenir à trois niveaux: sur le ver adulte, sur la fécondité parasitaire et sur la pathologie.

- Réduction de la charge parasitaire:

L'effet protecteur des 28GST des schistosomes a fait l'objet d'un nombre important de publications. L'efficacité de la réponse immune induite par ces protéines en présence d'adjuvant tel que le CFA, l'alun ou le BCG a été démontré dans de nombreux modèles animaux (rongeurs, bovins et singes) et vis-à-vis des principales espèces de schistosomes. Ainsi, les premières expériences dans notre laboratoire, menées avec l'antigène Sm28GST purifié ont montré une réduction de près de 50 % de la charge en vers chez des rats et des souris (Balloul *et al.*, 1987a). Des résultats encore plus encourageants sont venus de la vaccination de babouins, dont certains présentaient une réduction de 80 % de la charge vermineuse (Boulangier *et al.*, 1991). Même si les résultats étaient hétérogènes entre les singes, cette étude indiquait que la

Sm28GST était capable de conférer une forte protection dans un modèle animal non-syngénique se rapprochant de l'homme.

Les homologues entre les 28GST des différentes espèces de schistosomes se caractérisent dans leur capacité à induire une immunité protectrice croisée. C'est ainsi que l'administration de la Sm28GST protège vis-à-vis d'une infection expérimentale par *S. haematobium* chez le singe (Boulanger *et al.*, 1995). Mais l'expérience la plus encourageante est venue de la vaccination des bovins par la Sb28GST (De Bont *et al.*, 1997). En effet, l'administration de la Sb28GST induisait une réduction de 50 % de la charge parasitaire mais surtout une diminution de 89 % des oeufs excrétés dans les selles et de 42 % des oeufs dans les tissus après une infection naturelle de 9 mois des bovins par *S. mattheei*. En revanche, aucun effet protecteur n'était observé après une infestation massive unique. En plus d'une protection hétérologue, cette étude montrait que l'efficacité vaccinale avec la 28GST pouvait être largement observée au cours d'une infection naturelle. Ces résultats sont probablement les plus prometteurs pour la mise en place d'une stratégie vaccinale chez l'homme.

- Inhibition de l'activité enzymatique et réduction de la fécondité parasitaire:

Au cours de cette expérience chez le bovin, il a été montré que la protection était associée à une forte réponse IgG spécifique induite par la vaccination et capable de neutraliser l'activité enzymatique de la Sb28GST mais également celle de la 28GST native de *S. mattheei* (Grzych *et al.*, 1998). Une corrélation entre la neutralisation de l'activité enzymatique des 28GST et une réduction du nombre d'oeufs pondus était donc observée.

Or, au cours des nombreuses expériences de vaccination avec la Sm28GST, les auteurs avaient rapportés de manière surprenante une diminution du volume des granulomes hépatiques, du nombre d'oeufs pondus par femelle et de la capacité des oeufs à éclore. De plus, il avait été décrit au cours de l'infection humaine une corrélation entre l'immunité acquise capable de neutraliser l'activité enzymatique de la Sm28GST et un effet anti-fécondité des parasites *in vitro* (Grzych *et al.*, 1993). Ces observations illustraient en fait une propriété majeure des antigènes 28GST, à savoir leur capacité à induire une immunité anti-fécondité.

Cette activité protectrice a pu être reproduite par transfert passifs d'anticorps présentant la propriété de neutraliser l'activité enzymatique de la Sm28GST (Xu *et al.*, 1991). Il s'est ensuite avéré que ces anticorps neutralisants étaient spécifiquement dirigés soit vis-à-vis du peptide 10-43, soit vis-à-vis du 190-211, situés tous les deux à proximité du site actif de l'enzyme (Xu *et al.*, 1993). Cette immunité anti-fécondité vis-à-vis de *S. mansoni* a ensuite pu être reproduite par la simple immunisation par le peptide 190-211 chez la souris (Pancre *et al.* 1994b).

Récemment, il a été montré au cours de l'infection par *S. haematobium* chez le singe que l'administration de la Sh28GST induisait une réduction de 77 % du nombre d'oeufs déposés dans les tissus associée à une forte diminution de la pathologie du tractus urinaire évaluée par échographie (Boulanger *et al.*, 1999). Dans de nombreuses expériences, la prévention de la pathologie provoquée par une réduction massive du nombre d'oeufs pondus par les vers semble donc être lié à la capacité des anticorps spécifiques à inhiber l'activité enzymatique des 28GST.

L'ensemble des expériences de protection utilisant la Sm28GST et ses peptides, la Sh28GST et la Sb28GST est indiqué sur la tableau ci-dessous. Les antigènes ont généralement été testés avec des adjuvants couramment utilisés dans les protocoles expérimentaux : hydroxide d'alumine (Alun), Adjuvant Complet de Freund (CFA), *Bordetella pertussis* (*B.p.*) et BCG. La voie d'administration la plus souvent utilisée était sous-cutanée (s.c.) mais quelques expériences ont également été réalisées par la voie intra-musculaire (i.m.).

Récapitulatif des résultats de protection obtenus avec les différentes 28GST:

Antigènes	Adjuvant	voie	modèle	protection (%)	Références
Sm28GST	CFA Alum	s.c.	rats	51-68 63-72	Balloul <i>et al.</i> , 1987
	Alum BCG	s.c.	rats	55 60	Grezel <i>et al.</i> , 1993
	CFA	s.c.	souris	40-43	Balloul <i>et al.</i> , 1987
	Alum + <i>B.p.</i>	s.c.	singes	vers: 38 oeufs: 66	Boulanger <i>et al.</i> , 1991
	MDP	s.c.	singes	oeufs: 54-74 (<i>S. haematobium</i>)	Boulanger <i>et al.</i> , 1995
	CFA-IFA CFA	i.m. i.m.	bovins	oeufs: 43-86 oeufs: 57-81	Bushara <i>et al.</i> , 1993
peptides					
10-43	CFA	s.c.	souris	vers: 39 oeufs: 70	Xu <i>et al.</i> , 1993
190-211	CFA	s.c.	souris	vers: 40 oeufs: 58	
115-131	CFA	s.c.	rats	vers: 40-49	Wolowczuk <i>et al.</i> , 1991
Sh28GST	CFA BCG	s.c.	singes	oeufs: 77 oeufs: 60	Boulanger <i>et al.</i> , 1999
Sb28GST	CFA	s.c.	souris	oeufs: 10-25	Viana Da Costa <i>et al.</i> , 1999
	CFA	i.m.	bovins	vers: 50 oeufs: 89	De Bont <i>et al.</i> , 1997

- Prévention de la pathologie:

En plus des résultats montrant l'effet des anticorps anti-28GST sur la réduction de la ponte des oeufs, l'immunité cellulaire spécifique aux 28GST induite par la vaccination semble conduire à une diminution du développement du granulome bilharzien. En effet, l'immunisation par la Sm28GST chez la souris provoque l'inhibition de la synthèse de collagène hépatique et limite ainsi les atteintes pathologiques du foie après une infection par *S. mansoni* (Pancré *et al.* 1994a). Ce phénomène apparaît être médié par l'activation de cellules T productrices d'IFN γ car l'administration d'anticorps neutralisant cette cytokine a pour effet d'abolir cette forme de protection.

La seule administration du peptide 190-211 dérivé de la Sm28GST induisait cette protection en inhibant la synthèse de collagène hépatique et permettait également de réduire le nombre d'oeufs déposés dans les tissus (Pancré *et al.*, 1994b). L'immunité spécifique induite par l'injection de ce peptide semble donc agir à deux niveaux: une réduction du nombre d'oeufs pondus grâce à la réponse anticorps capable de neutraliser l'activité enzymatique de la Sm28GST et une réduction du développement de la fibrose grâce à une forte réponse cellulaire spécifique.

Le couplage d'antigènes à la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) est également une stratégie efficace contre le développement de la pathologie. Un tel couplage joue d'une manière générale un rôle important dans les réponses immunes anti-infectieuses (Holmgren *et al.*, 1994), induit une tolérance orale (Sun *et al.*, 1994) et protège des réactions d'hypersensibilité retardée et des pathologies autoimmunes (Bergerot *et al.*, 1997).

Récemment, l'administration à des souris de faibles doses de Sm28GST couplée à la CTB a permis de réduire fortement la pathologie hépatique bilharzienne (Sun *et al.*, 1999). Cette réduction était provoquée par une suppression des réactions inflammatoires et des réponses lympho-prolifératives spécifiques à la Sm28GST associée à une diminution de la production des cytokines de type Th1.

IV.4.4.b) Vectorisation de l'antigène vaccinal:

Depuis 1992, les efforts de notre laboratoire (groupe ImmunoPharmacologie Vaccinale animé par le Docteur Gilles Riveau) se sont portés sur le développement de nouvelles formes vaccinales basées sur l'administration non invasive. La première raison de ce choix venait du rôle important des anticorps IgA, isotype majoritaire au niveau des muqueuses, qui a été observé dans l'effet anti-fécondité induit par la vaccination avec la Sm28GST (Riveau *et al.*, 1996). La seconde raison résultait de la facilité d'utilisation dans les pays en voie de développement ce qui permettrait de constituer des vaccins administrables par voies orale ou

nasale. De plus, cette stratégie vaccinale ne nécessite pas l'emploi de seringues et d'aiguilles utilisées généralement pour les formes vaccinales courantes.

- Vecteurs vivants:

Une possibilité de ciblage des voies muqueuses est l'utilisation de bactéries recombinantes atténuées qui colonisent naturellement les poumons ou le tractus gastro-intestinal.

L'antigène Sm28GST a ainsi été cloné dans les bactéries à tropisme intestinal, telles que *Salmonella typhimurium* atténuée ou des bactéries lactiques, et dans des bactéries pulmonaires, telles que *Bordetella pertussis* atténuée et le BCG (Riveau *et al.*, 1996). De part la bonne stabilité du transgène Sm28GST, fusionné avec des protéines immunodominantes des différentes bactéries, et grâce au mode de colonisation des vecteurs vivants recombinants, assurant un relarguage progressif et prolongé dans le temps de l'antigène vaccinal, ce type de formes vaccinales permet d'induire une protection importante.

En effet, l'administration par voie orale de *S. typhimurium* atténuée (Aro A), recombinante pour le gène de la Sm28GST fusionnée avec le fragment C de la toxine tétanique, permet d'induire une forte réponse immune spécifique et sérique de type IgA (Khan *et al.*, 1994a). L'immunité anti-Sm28GST induite engendre une protection significative vis-à-vis de l'infection à *S. mansoni*. (Khan *et al.*, 1994b).

La possibilité d'utiliser des BCG recombinants est également importante car ces bactéries naturellement atténuées sont déjà utilisées sans risque dans le vaccin anti-tuberculeux chez l'homme. L'administration du BCG recombinant exprimant la Sm28GST a induit une réponse immune spécifique de l'antigène parasite caractéristique d'un profil protecteur. En effet, une forte réponse anti-Sm28GST sérique était observée et présentait la propriété d'inhiber l'activité enzymatique de la GST (Kremer *et al.*, 1996). Plus récemment, l'administration par voie nasale du BCG exprimant la Sh28GST était capable d'induire une réponse spécifique pulmonaire et sérique plus élevée, comparativement à l'utilisation du BCG recombinant pour la Sm28GST (Kremer *et al.*, 1998). Cette réponse anti-Sh28GST était caractérisée par une production prolongée (19 semaines) des isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b mais également IgA capables de neutraliser l'activité enzymatique de la Sh28GST.

Dans le cas de *B. pertussis*, agent étiologique de la coqueluche, le gène de la Sm28GST a été inséré dans celui codant pour l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), protéine de surface majeur pour l'adhésion de ces bactéries aux cellules pulmonaires. Une seule administration par voie nasale de cette bactérie recombinante engendrait une forte réponse anticorps anti-Sm28GST de type IgA et une protection significative vis-à-vis de l'infection à *S. mansoni* (Renauld-



Mongenie *et al.*, 1996; Mielcarek *et al.*, 1997). L'induction de cette réponse IgA protectrice est déclenchée par la production locale au niveau pulmonaire de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6 et TGF β) au cours de la colonisation des bactéries recombinantes (première semaine après l'administration) (Remoué *et al.*, 1997). La production précoce de ces cytokines est alors régulée par la sécrétion d'IL-10 deux semaines après l'administration qui permet la production des IgA spécifiques.

Plus récemment, il a été montré que l'administration par voie nasale d'une souche atténuée de *B. pertussis* recombinante induisait une immunogénicité accrue vis-à-vis de l'antigène Sm28GST (Mielcarek *et al.*, 1998). Cette mutation portait sur le gène codant pour la toxine pertussique (PT) qui est une protéine majeure dans l'induction de la pathologie de la coqueluche. Cette souche atténuée semble donc plus appropriée à un usage clinique chez l'homme. Cette mutation ne changeait en rien la colonisation bactérienne et l'administration de la souche recombinante atténuée induisait une réduction de 60 % du nombre d'oeufs tissulaires après l'infection par *S. mansoni*.

L'utilisation de ces vecteurs vivants exprimant le gène de la 28GST représente des vaccins de secondes générations et leur utilisation chez l'homme n'est pas encore aujourd'hui d'actualité. Néanmoins, l'utilisation du BCG recombinant et de *S. typhimurium* ou *B. pertussis* atténuée représente une stratégie intéressante dans l'élaboration de multi-vaccins. En effet, ces mêmes vecteurs recombinants seraient capables non seulement d'induire une protection anti-bilharzienne mais également une protection homologe. Ainsi, leur utilisation pourrait être un moyen efficace et pratique pour protéger contre des maladies souvent épidémiques (particulièrement la tuberculose et la salmonellose) dans les régions touchées par la bilharziose.

- Vecteurs synthétiques:

La vectorisation de l'antigène par des vecteurs synthétiques est probablement l'outil le plus rapidement adéquate pour une vaccination par voie orale et nasale chez l'homme car le vecteur permet la protection de l'antigène et son transport jusqu'aux organes immuno-compétents. De plus, ces vecteurs présentent une tolérance parfaite pour l'usage clinique.

Les liposomes encapsulant la Sm28GST ont été les premiers expérimentés dans notre laboratoire. Leur administration par voie orale entraîne une réduction de 50 % de la charge parasitaire et du nombre d'oeufs tissulaires suite à une infection murine par *S. mansoni* (Ivanoff *et al.*, 1996). La réponse immune induite était caractérisée par une forte production locale d'IgA spécifiques et un profil de sécrétion de cytokines de type Th2 au niveau splénique.

L'optimisation de cette forme vaccinale a porté sur le greffage à la surface des liposomes de l'adhésine FHA de *B. pertussis* ce qui permettait un ciblage cellulaire de l'adhésion des

liposomes aux cellules pulmonaires après leur administration par voie nasale (Poulain-Godefroy *et al.*, 1998). L'incorporation de la FHA dans les liposomes contenant la Sm28GST a montré son pouvoir immunogénique dans l'induction d'une forte réponse IgA anti-Sm28GST. Cette incorporation permettait de diminuer la dose d'antigène Sm28GST nécessaire pour obtenir une réponse humorale spécifique. En effet, l'incorporation de la FHA permettait d'induire une immunogénicité importante en utilisant des doses très faibles de Sm28GST alors que ces mêmes doses de GST n'induisent aucune réponse spécifique quand elles sont utilisées seules dans les liposomes.

Les microsphères ou microparticules constituées de polymères biocompatibles sont des composés facilement synthétisables à une échelle industrielle et ne présentent aucune toxicité ce qui les rendent parfaitement utilisables chez l'homme. Selon la nature des polymères, les microsphères permettent une libération plus ou moins rapide de l'antigène et leur administration par voie muqueuse induit de fortes réponses immunes spécifiques qui sont prolongées dans le temps.

Une seule administration par voie orale ou nasale de microparticules contenant la Sm28GST induit des réponses IgG et IgA spécifiques au niveau sérique qui restent élevées pendant plus de 7 mois (Baras *et al.*, 1999). De plus, les réponses humorales induites présentent la fonctionnalité d'inhiber l'activité enzymatique GST. Récemment, la technique du "spay-drying" a été utilisée dans la fabrication des microsphères contenant la Sm28GST (Baras *et al.*, 2000). Cette technique permet de produire ces microsphères à une échelle industrielle et selon les normes GMP ce qui en fait un vecteur de choix pour un usage clinique chez l'homme. Ce type de fabrication n'altère en rien la conformation de l'antigène Sm28GST et l'administration de ces microsphères induit une réponse immune anti-Sm28GST prolongée. De plus, cette réponse neutralise l'activité enzymatique de la Sm28GST associée à la reconnaissance des épitopes 24-43 et 190-211.

- Vaccination par ADN nu:

L'utilisation de plasmides codant pour l'antigène d'intérêt représente les vaccins de troisième génération et suscite un grand intérêt ces dernières années.

Dans notre laboratoire, la construction d'un plasmide codant pour la Sm28GST a été réalisée et a montré son efficacité immunogène et vaccinale après administration au niveau de la peau, tissu représentant la première interface entre le parasite et son hôte définitif. En effet, l'immunisation intradermique chez le rat induit, de manière prolongée dans le temps, une réponse immune anti-Sm28GST sérique de type IgG capable de tuer les schistosomules par des mécanismes d'ADCC (Dupré *et al.*, 1997). Non seulement cette forme vaccinale présente des propriétés protectrices contre le ver mais il a été montré également que l'administration

intradermique de ce plasmide engendrait une réduction du nombre d'oeufs tissulaires après une infection par *S. mansoni* (Dupré *et al.*, 1999). Dans cette dernière expérience, la vaccination par ADN nu était combinée à la chimiothérapie par le PZQ de souris infectées. La synergie d'action de ces deux traitements aboutissait à la survie des animaux due à la prévention de la pathologie bilharzienne. Un fort effet anti-pathologique avait donc été mis en évidence et, pour la première fois, il avait été montré l'action synergique et bénéfique de la vaccination par la 28GST et du traitement par le PZQ. Cette combinaison thérapeutique représente une avancée majeure dans le développement d'une stratégie vaccinale efficace contre les schistosomiasés.

IV.4.5) Bilhvax : les premiers essais cliniques contre la schistosomiase:

Les succès remportés par la vaccination dans les divers modèles animaux avec les antigènes 28GST ont abouti à la mise en place des premiers essais cliniques chez l'homme. Non seulement ces essais sont les premiers contre la schistosomiase mais également les premiers contre un organisme pluricellulaire.

Le choix de l'antigène s'est porté sur la Sh28GST pour deux raisons principales:

- L'espèce *S. haematobium* apparaît plus sensible aux réactions immunitaires de l'hôte que les autres schistosomes. En particulier, il a été montré au cours de l'infection humaine que l'acquisition de l'immunité anti-parasitaire avec l'âge engendrait naturellement un effet anti-fécondité du parasite *S. haematobium*, phénomène absent pour l'infection à *S. mansoni* (Agnew *et al.*, 1996). Une stratégie de vaccination basée sur l'évaluation d'un effet anti-pathologique pourrait donc se révéler plus sensible contre cette bilharziose.

- L'évaluation de la pathologie urinaire est réalisée par des examens cliniques non-invasifs, tels que l'échographie. L'efficacité vaccinale pourrait donc être analysée d'une manière plus fiable et plus facile comparativement aux autres espèces de bilharzioses.

- Préparation vaccinale Bilhvax:

La préparation vaccinale correspond à la protéine Sh28GST recombinante produite à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, selon les normes GMP (Good Manufacturing Practices), par la société Eurogentec (Belgique). Elle se présente sous forme lyophilisée et est reconstituée avec l'adjuvant qui est de l'hydroxyde d'aluminium (Alun Al₂O₃, Alhydrogel 2 %; Superfos Boscator, Suède). Cet alun fait partie des adjuvants pouvant être utilisés chez l'homme pour les préparations vaccinales (Pharmacopée Européenne). La solution d'alun sert à la fois d'excipient à la Sh28GST et de placebo.

Préalablement à toute décision d'entrée en phase clinique chez l'homme, un travail important de sécurité préclinique avec la préparation vaccinale doit être menée par la mise en place d'une étude de toxicologie.

IV.4.5.a) Etude préclinique de toxicologie de la préparation vaccinale Bilhvax:

L'évaluation préclinique a été réalisée par la société CERB (Baugy, France) et repose sur trois types d'études:

- Evaluation du risque toxique chez deux espèces de mammifères (rat et chien)
- Evaluation de la tolérance locale chez le lapin
- Evaluation du potentiel mutagène par le test d'Ames

Le rat et le chien ont été retenus car il s'agit d'animaux couramment utilisés en toxicologie, en particulier sur le plan de leur réponse immunologique à l'administration de protéines exogènes. Par ailleurs, l'utilisation d'une espèce rongeur et non rongeur permet d'éviter des résultats faussement négatifs liés à une spécificité d'espèce. Le lapin est le modèle animal le plus approprié pour les expériences de choc septique et d'inflammation locale.

Les doses administrées par voie sous-cutanée chez le rat et le chien ont été de deux et dix fois (40 µg/kg et 200 µg/kg) celle prévue pour la dose administrable à l'homme.

De plus, aucune toxicité systématique n'a été mise en évidence quelque soit la dose administrée chez le rat et le chien. Par ailleurs, nous avons réalisé au laboratoire le dosage des anticorps spécifiques à la Sh28GST et aux GST de rats et humaines (placentaire et hépatique) chez ces deux espèces animales. Bien qu'une très forte réponse anti-Sh28GST ait été observée, aucune réaction croisée avec les GST de mammifères n'a été mise en évidence.

Une tolérance parfaite a été observée chez le lapin après l'administration d'une dose de Sh28GST allant jusqu'à 50 fois la dose thérapeutique prévue chez l'homme.

Enfin, aucun effet mutagène n'a été mis en évidence avec la préparation vaccinale (réalisée sur 5 souches de *Salmonella typhimurium*).

En conclusion, la préparation vaccinale Bilhvax présente une excellente tolérance locale et systémique et n'engendre aucune réaction croisée vis-à-vis des GST de mammifères. Les essais cliniques de Phase 1 chez l'homme pouvaient par conséquent débiter.

IV.4.5.b) Les essais cliniques chez l'homme:

Ils ont été initiés en 1998 et sont placés sous la responsabilité du Prof. A. CAPRON. L'élaboration et la coordination de chaque essai clinique sont effectuées par le Dr. G. RIVEAU assisté par le Dr. J. DE BONT.

Le tableau ci-dessous présente le descriptif des essais cliniques de phase 1 effectuée et les futurs phases 2.

Descriptifs des essais cliniques Bilhvax:

Phases	Lieu	Sujets	Objectifs	Dates
1a	CIC CHRU de Lille	volontaires sains Hommes; 18-30 ans	principal: innocuité secondaire: immunogénicité	09/98-10/99
1b	Prog. ESPOIR St-Louis, Sénégal	enfants non-infectés par la bilharziose Garçons/Filles 6-10 ans	principal: innocuité secondaire: immunogénicité	07/99-03/00
2a, 2b	Prog. ESPOIR St-Louis, Sénégal	infection Sh/Sm Hommes; 18-30 ans	tolérance immédiate immunogénicité association avec PZQ	début: 04/00
2c, 2d	CERMES Niamey, Niger	infection Sh Garçons/Filles 6-10 ans	principal: tolérance à la réinfection secondaire: immunogénicité association avec PZQ	prévu: 09/00

Les résultats d'immunogénicité (réponses humorale et cellulaire spécifiques à la Sh28GST) de l'essai clinique de phase 1a réalisé au Centre d'Investigation Clinique de Lille (CHRU), sous la responsabilité du Professeur Ch. Libersa seront présentés dans cette thèse (Chap. VI).

Vu la parfaite tolérance de la préparation vaccinale Bilhvax et l'absence de réaction croisée avec des GST humaines constatées chez les volontaires sains adultes au cours de cette première phase, il a été décidé de réaliser une autre phase 1 chez des enfants des deux sexes non infectés par les schistosomiases mais vivant en région endémique. Cette phase nommée 1b a été effectuée dans le cadre du programme ESPOIR à l'Hôpital Régional de St-Louis du Sénégal,

sous la responsabilité du Dr J-P. Dompnier (investigateur). Aucun effet indésirable n'a été mis en évidence après deux administrations de la préparation vaccinale ou du placebo (Alun) et les codes ont été levés récemment. L'analyse des résultats cliniques, biochimiques, hématologiques et d'immunogénicité est actuellement en cours.

Les phases 2a et 2b débiteront en avril dans le village de N'Dioungue M'Beresse situé à 30 km de St-Louis du Sénégal. La responsabilité de ces phases a été confiée au Dr. J-P. Dompnier et elles seront réalisées en s'appuyant sur les infrastructures du programme ESPOIR. L'objectif principal est l'évaluation de la tolérance immédiate suite à deux administrations de la préparation vaccinale Bilhvax (à 28 jours d'intervalle) chez des hommes adultes co-infectés par *S. mansoni* et *S. haematobium*. Une étude d'immunogénicité sera également réalisée par l'évaluation de la réponse humorale spécifique à la Sh28GST. Les administrations de la Sh28GST ou du placebo seront réalisées en association avec un traitement par le PZQ. Le traitement sera donné 28 jours avant la première administration de Sh28GST (ou placebo) en phase 2b tandis que les individus seront traités par chimiothérapie 21 jours après la seconde administration de la préparation vaccinale pour la phase 2a (ou placebo).

Si une tolérance parfaite est observée après administration chez l'adulte au cours de ces deux dernières phases, les phases 2c et 2d pourront commencer au Niger au second semestre de l'année 2000. Elles seront réalisées sous la responsabilité du CERMES à Niamey et auront comme objectif principal la tolérance immédiate après vaccination et la tolérance à la réinfection après traitement au PZQ. La population cible sera les enfants des deux sexes, âgés de 6 à 10 ans et infectés par *S. haematobium*. La vaccination précédera ou succédera le traitement par le PZQ.

Après vaccination et traitement, les paramètres parasitologiques (évaluation de la charge parasitaire par CAA et du nombre d'oeufs excrétés) et des critères de morbidité (échographie, dosage d'ECP) seront évalués au cours des phases 2 et seront comparés à ceux observés dans le groupe placebo. Ils donneront de précieux renseignements mais ne permettront pas de déterminer si la préparation vaccinale Bilhvax induit une protection contre la schistosomiase (peu d'individus par groupe). L'efficacité vaccinale en terme de protection clinique est l'objectif d'une phase 3 dans laquelle la Sh28GST sera administrée à un grand nombre (200 à 300) d'enfants infectés par *S. haematobium* et/ou *S. mansoni* en association avec le traitement au PZQ.

Objectifs généraux

L'objectif général de ce travail concerne l'évolution de l'immunité spécifique dans les populations humaines infectées par la schistosomiase. Dans le cadre d'une stratégie vaccinale, notre but concerne plus particulièrement l'évaluation de la réponse immune spécifique à l'antigène vaccinal 28GST chez l'homme. Il se décline en deux points majeurs:

I) Caractéristiques et propriétés de la réponse immune spécifique:

(a) Au cours de l'infection par la schistosomiase:

- en fonction de l'âge (Chapitre I)
- en fonction du sexe: influence des hormones sexuelles (Chapitres I et II)
- rôle dans l'acquisition d'une immunité protectrice (Chapitre III)

(b) Après administration de la Sh28GST : essai clinique de phase 1a (Chapitre VI)

II) Maturation de la réponse immune spécifique au cours de l'infection:

(a) Effet d'un traitement par le praziquantel (Chapitres IV et V)

(b) Influence de co-infections parasitaires (Chapitre V)

Résultats

I) Réponse immunitaire spécifique à la Sh28GST acquise au cours de l'infection par *S. haematobium* : variations en fonction de l'âge et du sexe.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont abouti à l'écriture du manuscrit intitulé: « Gender-dependent specific immune response during chronic human schistosomiasis ».

I.1) Population étudiée et paramètres d'infection:

Cette étude a été réalisée dans le village d'Orou-Madiou situé dans le district de Podor, à 150 km à l'est de St-Louis. Wourou-Madiou est localisé près du Fleuve Sénégal dans un foyer où seule l'infection par *S. haematobium* est présente (Picquet *et al.*, 1996). Dans ce foyer de Podor, la schistosomiase urinaire est présente depuis environ 10 ans mais aucune étude n'a été réalisée avant 1984 (Vercruyse *et al.*, 1985). Néanmoins, il a été décrit que ce foyer d'infection présenterait la particularité d'être un foyer relativement récent (Picquet *et al.*, 1996).

La population (environ 650 personnes), ethnique des Toucouleurs, est sédentaire dans ce village. L'activité principale des hommes est la culture du riz alors que les femmes, apportant une aide dans les rizières, s'occupent principalement des tâches ménagères.

Dans ce foyer, la prévalence d'infection (55 %) est similaire pour les deux sexes (Shaw *et al.*, 1999). L'intensité d'infection moyenne (correspondant au nombre d'oeufs dans 10 ml d'urine) a été évaluée pour l'ensemble de cette population et apparaît relativement faible (<12 oeufs/ 10 ml d'urine après filtration urinaire). Ce foyer peut donc être considéré comme un foyer de faible intensité.

Pour l'étude immuno-épidémiologique, la population comprenait 108 personnes âgées de 8 à 57 ans infectées par *S. haematobium*, et était répartie en 5 classes d'âge équivalente en nombre d'individus (8-11; 12-16; 17-23; 24-34 et > 35 ans). Chaque classe d'âge incluait le même nombre d'hommes et de femmes (10 ± 2). Un premier prélèvement sanguin a été réalisé d'avril à juin 1996, période durant laquelle une forte transmission à *S. haematobium* a été enregistrée dans des villages voisins (Shaw *et al.*, 1999).

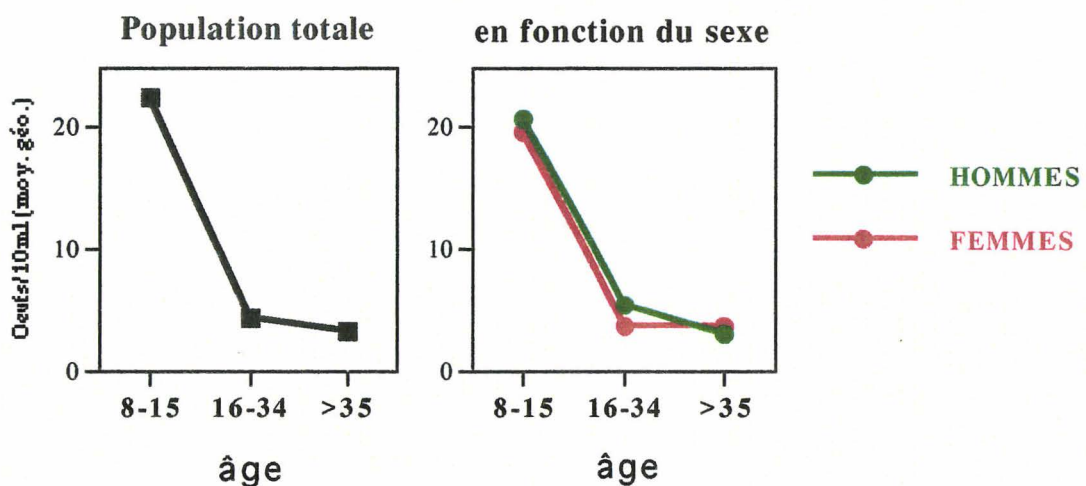
Tous les individus de la cohorte, ainsi que toutes les personnes infectées dans le village, ont été traités par du Praziquantel (40 mg/kg), et de nouveaux prélèvements d'urines et de sang ont été réalisés 5 semaines et 6 mois après traitement. Les résultats immunologiques de ces deux derniers temps seront décrits dans le chapitre IV.

Afin de présenter plus clairement nos résultats immunologiques en fonction de l'âge, une nouvelle répartition en 3 classes a été réalisée:

- 8-15 ans (n=41): enfants, connus pour être les individus les plus infectés
- 16-34 ans (n=44): jeunes adultes
- > 35 ans (n=23): adultes les plus âgés

Dans cette population, l'intensité d'infection (nombre d'oeufs/10 ml d'urine), évaluée par l'équipe du Prof. Vercryusse, est présentée en moyenne géométrique, en fonction de l'âge mais également en fonction du sexe des patients infectés (Fig. I.1).

Fig. I.1 : Evolution de l'intensité d'infection en fonction de l'âge et du sexe



Comme décrit dans de nombreux foyers d'infection à *S. haematobium*, l'intensité d'infection est maximale chez les enfants puis décroît fortement après l'âge de 16 ans. Chez les adultes, elle est similaire pour les classes d'âge 16-34 et ≥ 35 ans et aucune différence statistique (test U de Mann-Withney) n'a été observée en fonction du sexe. En plus de la même prévalence d'infection observée selon le sexe dans ce foyer (Shaw *et al.*, 1999), les hommes et les femmes présentent également une intensité d'infection similaire, et ceci quelque soit leur âge.

Comme nous montrons que l'intensité d'infection est identique selon le sexe, en terme du nombre d'oeufs excrétés, nous avons voulu confirmer ce résultat en évaluant la charge parasitaire. Au cours des infections humaines, il est admis que le dosage sérique d'antigènes solubles et circulants des schistosomes représente un des moyens d'évaluation le plus accessible et le plus sensible pour évaluer spécifiquement la charge parasitaire. En particulier, la détection du CAA dans le sérum (Circulating Anodic Antigen) représenterait à ce jour une des techniques les plus efficaces (Deelder *et al.*, 1994). Ainsi, en collaboration avec l'équipe du Prof. Deelder (University of Leiden, Pays-Bas), le dosage du CAA a été réalisé dans le sérum des individus

de notre étude mais uniquement chez les patients âgés de plus de 35 ans. Nous n'avons pas détecté de différence entre les sexes (hommes: $12,7 \pm 14,34$; femmes: $19,46 \pm 21,09$; NS par test ANOVA).

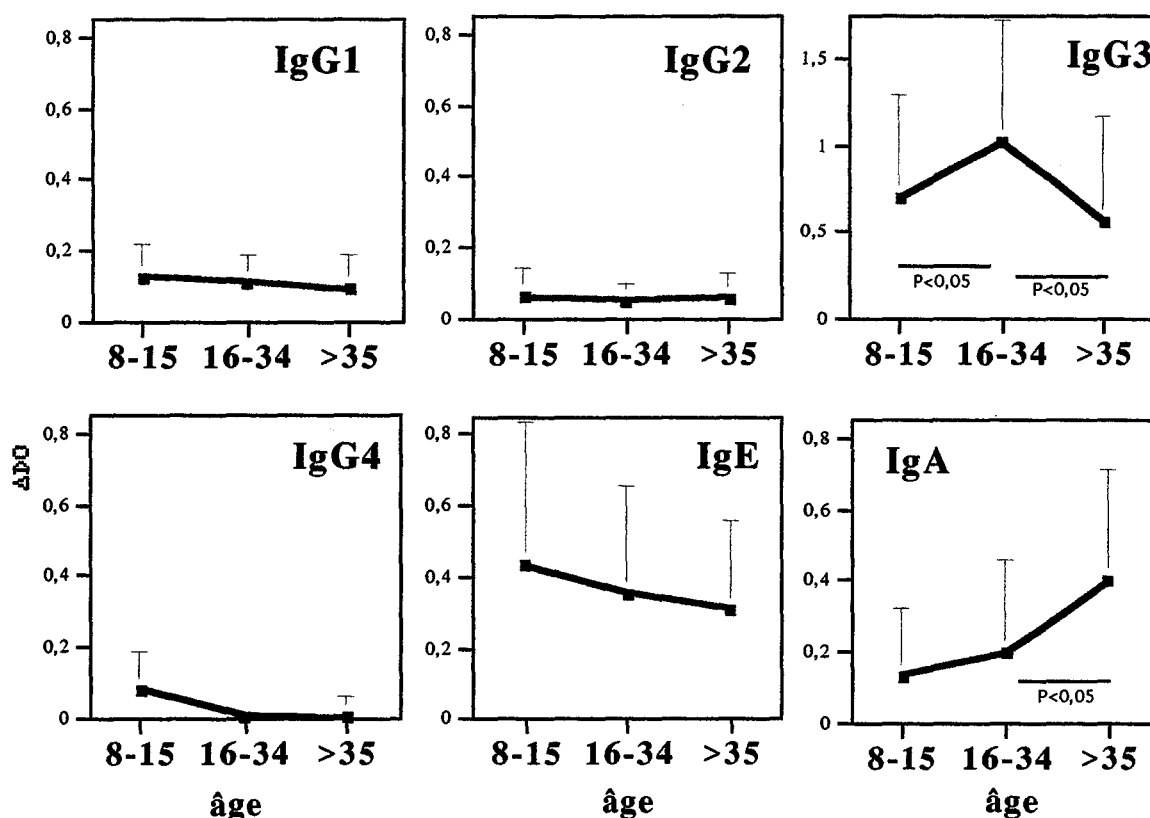
Contrairement à ce que nous avons décrit dans l'introduction où les hommes apparaissaient plus exposés à l'infection que les femmes dans de nombreux foyers, la particularité de notre étude est que les hommes et les femmes présentent des critères d'infection identiques. Ce résultat nous offre une opportunité unique : étudier l'évolution de la réponse immune spécifique à la Sh28GST uniquement en fonction du sexe des individus infectés. En effet, une quelconque différence dans l'intensité d'infection ne nous aurait pas permis d'évaluer la réponse immune uniquement en fonction du sexe. La moindre variation immunitaire aurait pu alors être attribuée à une différence dans l'intensité d'infection et non pas à un effet propre du sexe. Nous reverrons cette notion dans la partie "Résumé et discussion" de ce chapitre (I.6).

Préalablement à l'étude concernant l'effet du sexe, une première étape a été d'évaluer le profil de la réponse humorale spécifique acquise naturellement en fonction de l'âge et ceci sans tenir compte du sexe des individus infectés.

I.2) Profil de la réponse isotypique spécifique en fonction de l'âge:

Dans la population totale, la réponse humorale (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE et IgA) spécifique à la Sh28GST est présentée en moyenne (\pm sem) pour les 3 classes d'âge sélectionnées (Annexe I) (Fig. I.2). Les valeurs (moyenne d'une duplicate) sont présentées en Δ DO calculée selon la formule: Δ DO= DOx-DO_n où DO_x représente la DO d'un sérum de patients infectés et DO_n, la moyenne des DO de 30 sérums contrôles d'individus non-infectés.

Fig. I.2 : Réponse humorale anti-Sh28GST en fonction de l'âge



Alors qu'un très faible niveau d'anticorps spécifique pour les isotypes IgG1, IgG2 et IgG4 est observé, les 3 isotypes majoritaires dirigés vis-à-vis de la Sh28GST sont les IgG3, IgE et IgA. Malgré la forte valeur des écart-types démontrant une certaine hétérogénéité dans chaque population, le profil de ces trois réponses isotypiques prédominantes semble varier différemment en fonction de l'âge. En effet, alors que la réponse IgE reste identique quelque soit la classe d'âge, la réponse IgG3 spécifique est maximale pour les individus âgés de 16-34 ans. Comme indiqué sur la Fig. I.2, la moyenne est significativement supérieure dans la classe d'âge 16-34 ans comparativement aux moyennes des classes 8-15 et \geq 35 ans (test U de Mann-Whitney). D'autre part seule l'échelle en DO pour les IgG3 est plus élevée que pour les autres isotypes soulignant l'importance quantitative de cet isotype. Cette réponse IgG3 est suivi par un

pic d'IgA anti-Sh28GST après l'âge de 35 ans (moyenne significativement plus élevée par rapport à la classe 16-34).

Un des premiers résultats surprenant concerne la faible intensité des réponses IgG1 et IgG4 anti-Sh28GST observée alors qu'un fort niveau de ces isotypes avaient été précédemment observé contre la Sm28GST chez des enfants infectés par *S. mansoni* au Kenya (Auriault *et al.*, 1990) et est fréquemment détectée contre le SEA dans de nombreux foyers d'infection à *S. haematobium* (Hagan *et al.*, 1996; Mutapi *et al.*, 1997).

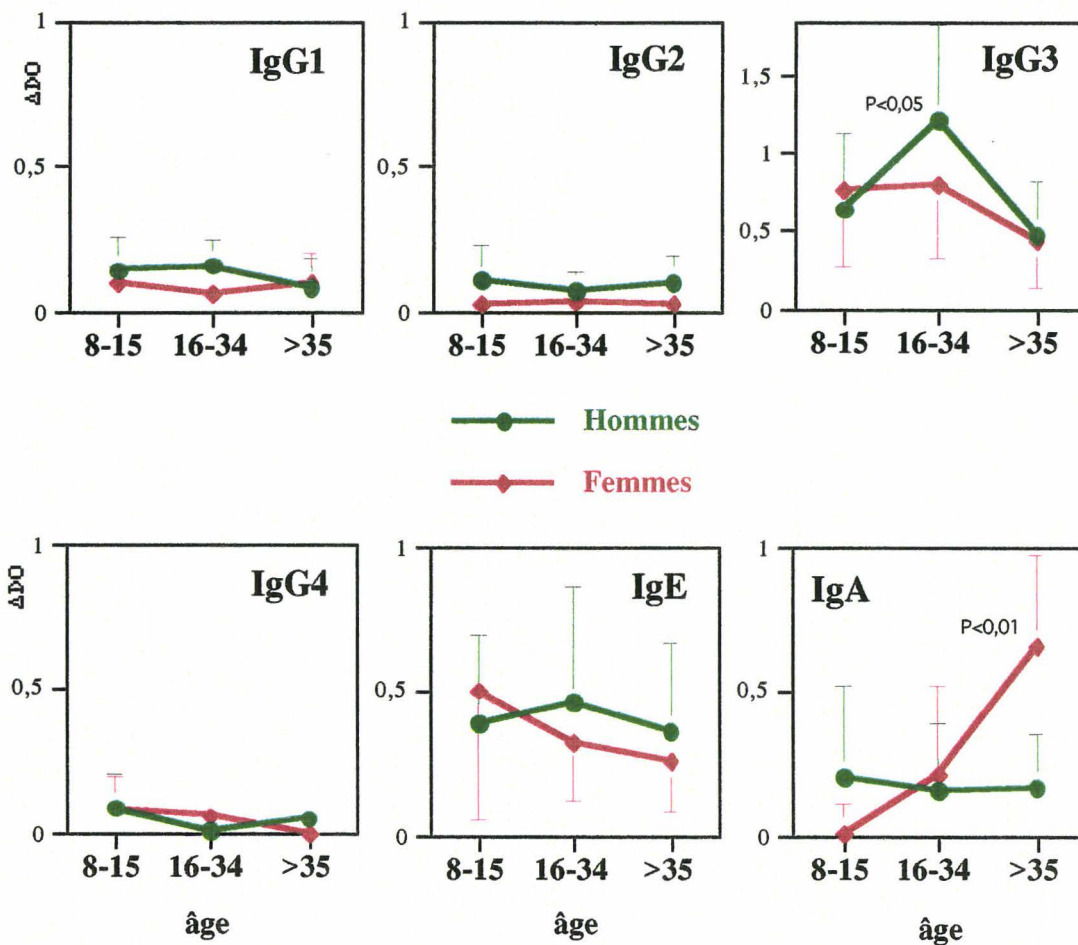
Notre étude représente la première évaluation de la réponse immune anti-Sh28GST chez l'homme. Ainsi, nous n'avons pas le recul nécessaire pour apporter des explications à cette observation. La nature de l'antigène Sh28GST et sa spécificité, la particularité de ce foyer d'infection relativement récent, ou la faible intensité d'infection observée dans cette population pourraient ensemble expliquer ces faibles réponses IgG1 et IgG4. Le dosage des IgG1 et des IgG4 dirigés contre les antigènes totaux parasitaires (SWAP et SEA) mais également la comparaison des réponses obtenues chez d'autres individus de différents villages pourraient apporter de nombreux renseignements. Pour les IgG2, nous ne détectons aucune réponse spécifique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la Sh28GST présenterait peu d'épitopes carbohydrates alors que cet isotype est connu pour être dirigé contre des protéines carbohydratées présentes de manière importante dans le SEA et le SWAP (Khalife *et al.*, 1989).

En revanche dans cette population, les réponses IgG3 et IgA dirigées contre la Sh28GST semblent varier en fonction de l'âge des individus et sont maximales pour les classes d'âges adultes présentant la plus faible intensité d'infection, comparativement aux enfants (8-15 ans; voir Fig. I.1). Cette notion sera soulignée de manière plus précise et apparaîtra plus clairement après avoir analysé la réponse humorale spécifique en fonction du sexe des individus infectés.

I.3) Réponse isotypique anti-Sh28GST en fonction du sexe :

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les adultes présentaient une certaine acquisition de l'immunité spécifique à la Sh28GST au cours de l'infection par *S. haematobium*. Avant d'élaborer une stratégie vaccinale avec le candidat Sh28GST, il apparaissait important d'évaluer si les hommes et les femmes pouvaient acquérir, avec l'âge, et naturellement au cours de l'infection, un profil similaire d'immunité spécifique. Comme nous l'avons indiqué au début de ce chapitre, la cohorte sélectionnée était composée du même nombre d'hommes et de femmes dans chaque classe d'âge. De plus, l'intensité d'infection était similaire selon le sexe et ceci pour les trois classes d'âge. Ainsi, nous pouvons comparer la réponse humorale spécifique à la Sh28GST en fonction du sexe des individus infectés et ceci pour chaque classe d'âge. La Figure I.3 représente la moyenne arithmétique (\pm sem) du niveau des anticorps pour chaque isotype, en fonction des trois classes d'âge et du sexe des individus.

Fig I.3 : Réponse isotypique anti-Sh28GST en fonction du sexe

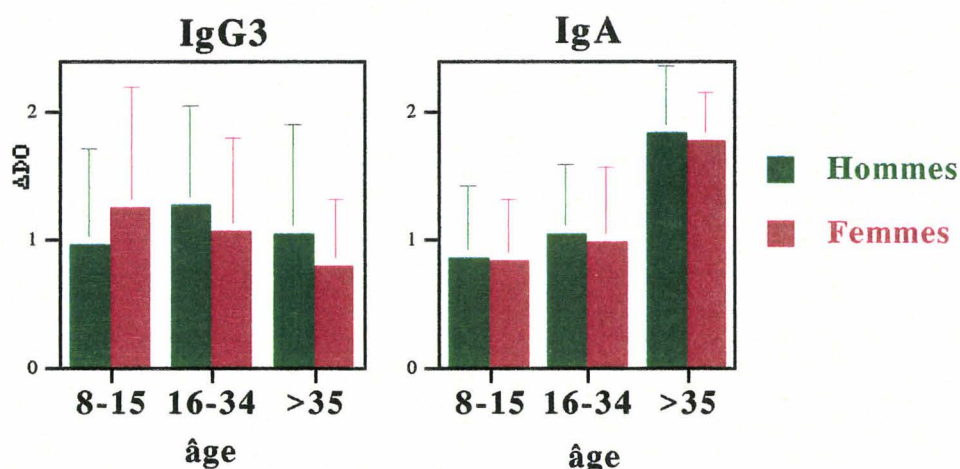


Aucune différence n'a été observée en fonction du sexe pour les réponses IgG1, IgG2, IgG4 et IgE. Chez les enfants, aucune variation en fonction du sexe n'a été détectée pour tous les isotypes. En revanche, les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST varient significativement en

fonction du sexe chez les adultes, et ceci pour des classes d'âge différentes. En effet, la réponse IgG3 est significativement plus élevée chez les hommes que chez les femmes, uniquement pour les individus âgés de 16-34 ans ($P < 0,05$). A l'inverse, la moyenne des IgA est significativement plus élevée chez les femmes, seulement pour la classe d'âge ≥ 35 ans ($P < 0,01$). Ainsi, le pic des IgG3, que nous avons remarqué pour les 16-34 ans dans la population totale (Fig. I.2), apparaît uniquement présent chez les hommes, alors que le pic de la réponse IgA ne se retrouve que chez les femmes de plus de 35 ans. Ce résultat semble indiquer que ces 2 réponses majoritaires varient non seulement en fonction de l'âge mais également en fonction du sexe des individus infectés. Ainsi, cette variation est observée uniquement chez les adultes (≥ 16 ans), dans les 2 classes d'âges présentant la plus faible intensité d'infection. Nous pouvons de plus remarquer que la variation des isotypes IgG3 et IgA spécifiques n'a induit aucune différence d'intensité d'infection entre les hommes et les femmes.

Après avoir détectée une telle différence pour ces isotypes dirigées spécifiquement contre la Sh28GST, une question se posait: retrouvons-nous cette variation de la réponse immune dirigée contre l'ensemble des antigènes parasitaires? Pour cela, nous avons réalisé, dans les serums des mêmes individus, le dosage des IgG3 et IgA dirigés contre le SEA (Fig. I.4).

Fig. I.4 : Réponses IgG3 et IgA anti-SEA en fonction de l'âge et du sexe



Les réponses IgG3 et IgA anti-SEA apparaissent relativement différente de celles observées contre la Sh28GST. En effet, la réponse IgG3 anti-SEA semble être similaire quelque soit l'âge des individus mais surtout, aucune différence n'est observée entre les hommes et les femmes. Par ailleurs, si la réponse IgA anti-parasitaire est, comme celle contre la Sh28GST, maximale pour la classe d'âge ≥ 35 ans, elle est identique entre les deux sexes.

Il apparaît ainsi que la variation sexe-dépendante des réponses IgG3 et IgA est spécifiquement observée vis-à-vis de l'antigène spécifique Sh28GST et non pas vis-à-vis d'antigènes totaux du parasite. Pour confirmer cette spécificité, l'évaluation des réponses isotypiques contre un autre antigène spécifique du schistosome, serait extrêmement intéressante. Ceci n'a pas été réalisé dans cette étude mais la réponse dirigée contre la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), antigène d'un mollusque marin partageant un épitope carbohydre commun avec la GP38 de *S. mansoni* (Grzych *et al.*, 1987), sera présentée dans le chapitre III, chez une population infectée par *S. mansoni* (village de Guidakhar).

Ainsi, seules les réponses IgG3 et IgA spécifiques à l'antigène Sh28GST apparaissent clairement différentes selon le sexe des individus infectés. Il est maintenant bien décrit chez l'homme que certaines cytokines influence sur l'orientation de la réponse isotypique, soit en agissant au niveau de la commutation isotypique à un niveau génétique, soit en augmentant la production sélective de tel ou tel isotype par les lymphocytes B (Snapper *et al.*, 1993; Romagnani *et al.*, 1992; Garraud *et al.*, 1996). Ainsi, nous avons évalué la production de cytokines spécifiques de la Sh28GST pour déterminer si un profil cellulaire différent ne pourrait pas expliquer la présence sexe-dépendante des IgG3 et IgA spécifiques

I.4) Réponse cellulaire spécifique à la Sh28GST : analyse du profil de production des cytokines après stimulation *in vitro*

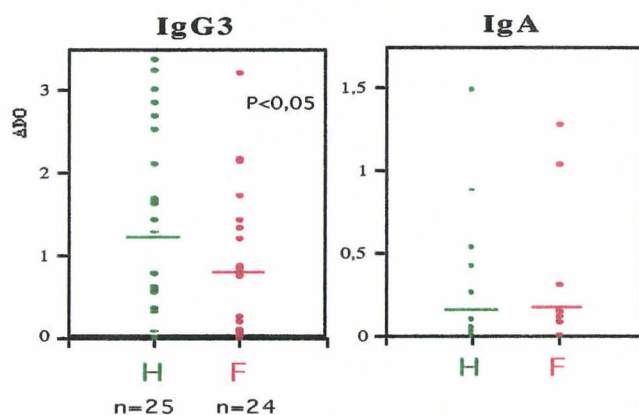
La production spécifique des cytokines (IFN γ , TNF α , TGF β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-12) a été évaluée après stimulation *in vitro* par la Sh28GST des cellules mononucléées du sang (PBMC) des individus (Annexe II). Le dosage des cytokines a été réalisé par ELISA dans les surnageants après 3 jours de culture. Ces expériences ont été réalisées à partir des mêmes prélèvements sanguins utilisés pour le dosage des anticorps.

Pour faciliter la compréhension, les résultats seront présentés individuellement chez les hommes et les femmes, et séparément pour les 2 classes d'âges adultes: 16-34 et ≥ 35 ans. Les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST seront également présentées individuellement.

I.4.1) Réponse IgG3 et production de cytokines spécifique: 16-34 ans

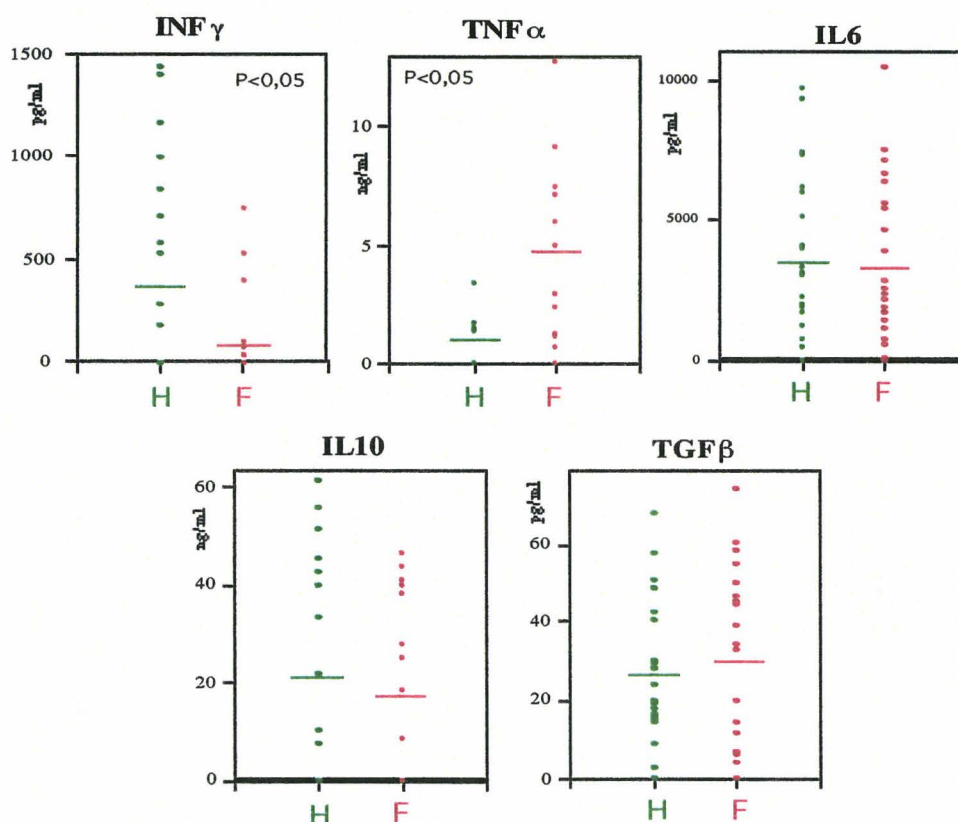
Nous avons précédemment montré que la réponse IgG3 anti-Sh28GST était prépondérante chez les hommes âgés de 16 à 34 ans. Ces résultats, ainsi que ceux de la réponse IgA, sont présentés d'une manière individuelle en fonction du sexe des individus infectés (Hommes:H; Femmes:F) (Fig. I.5). La barre représente la moyenne arithmétique de chaque groupe.

Fig. I.5 : Réponse IgG3 et IgA anti-Sh28GST - classe d'âge 16-34 ans



Individuellement, la réponse IgG3 apparaît relativement homogène chez les hommes infectés, contrairement à la population féminine. En revanche, très peu d'hommes et de femmes présentent une valeur positive pour les IgA spécifiques confirmant la très faible réponse IgA anti-Sh28GST que nous avons observée pour les 16-34 ans. Dans cette même classe d'âge, la production de cytokines spécifiques à la Sh28GST a été évaluée et est présentée en fonction du sexe. Les valeurs présentées (en ng/ml ou pg/ml) représentent la différence individuelle entre les quantités détectées après stimulation par la Sh28GST (10 µg/ml) et celles mesurées dans la culture non-stimulée (milieu seul). La barre représente la moyenne de chaque groupe.

Fig. I.6 : Production de cytokines spécifique à la Sh28GST - 16-34 ans



Aucune production spécifique d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-12 n'a été observée dans nos conditions de culture. En revanche, nous avons détecté une sécrétion spécifique de:

- IFN γ : cytokine associée à une réponse de type-1
- TNF α et IL-6 : cytokines pro-inflammatoires
- IL-10 et TGF β : cytokines anti-inflammatoires

En fonction du sexe, aucune différence n'a été observée pour l'IL-6, l'IL-10 et le TGF β . En revanche, la production d'IFN γ est plus importante chez les hommes alors que la production de TNF α est significativement plus élevée chez les femmes ($P < 0,05$; Test de Mann-Whitney).

Comme pour l'analyse de la réponse anticorps, nous avons évalué la production de ces mêmes cytokines après stimulation *in vitro* avec un extrait total d'antigènes parasitaires (SEA). Aucune différence significative dans la production d'IFN γ spécifique au SEA n'a été observée (Hommes: $0,52 \pm 0,6$ ng/ml; Femmes: $0,54 \pm 0,6$ ng/ml). Pour le TNF α , une valeur moyenne plus élevée a été observée chez les femmes ($80,72 \pm 87,87$) mais elle n'est pas significativement différente de celle des hommes ($45,82 \pm 40,77$). Aucune différence a été également obtenue après le dosage sérique de ces deux cytokines (non montrés).

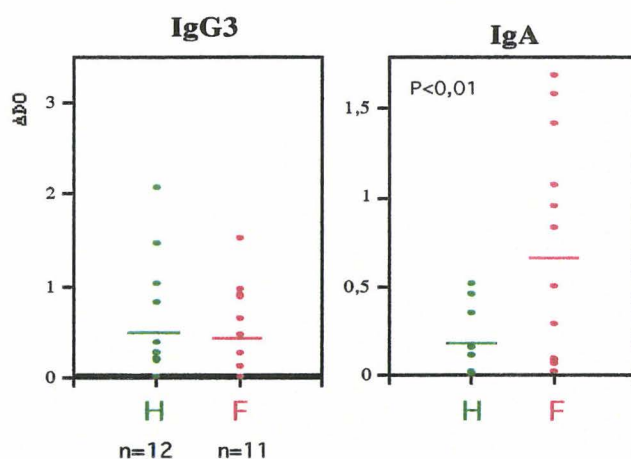
L'ensemble de ces résultats indiquent que seules la production d'IFN γ et de TNF α spécifiques à la Sh28GST varient selon le sexe des individus alors que l'intensité d'infection est similaire entre les hommes et les femmes. En particulier, la production d'IFN γ apparaît relativement forte et de manière assez homogène chez les hommes âgés de 16 à 34 ans, population présentant la plus forte réponse IgG3 anti-Sh28GST. Nous avons réalisé des tests de corrélation statistique individuelle (tests de Kendall et de Spearman) entre ces 2 paramètres mais aucune significativité n'a pu être observée. Un nombre d'individus plus important aurait permis de probables corrélations significatives. Ce résultat sera discuté avec l'ensemble des autres données dans le paragraphe "Résumé et discussion" (I.6).

Après avoir analysé l'association entre la réponse anticorps IgG3 et la production de cytokines spécifiques dans cette première classe d'âge d'adultes, la variabilité isotypique et le profil des cytokines sont présentées en fonction du sexe des adultes âgés de plus de 35 ans.

I.4.2) Réponse IgA et production de cytokines spécifique : ≥ 35 ans

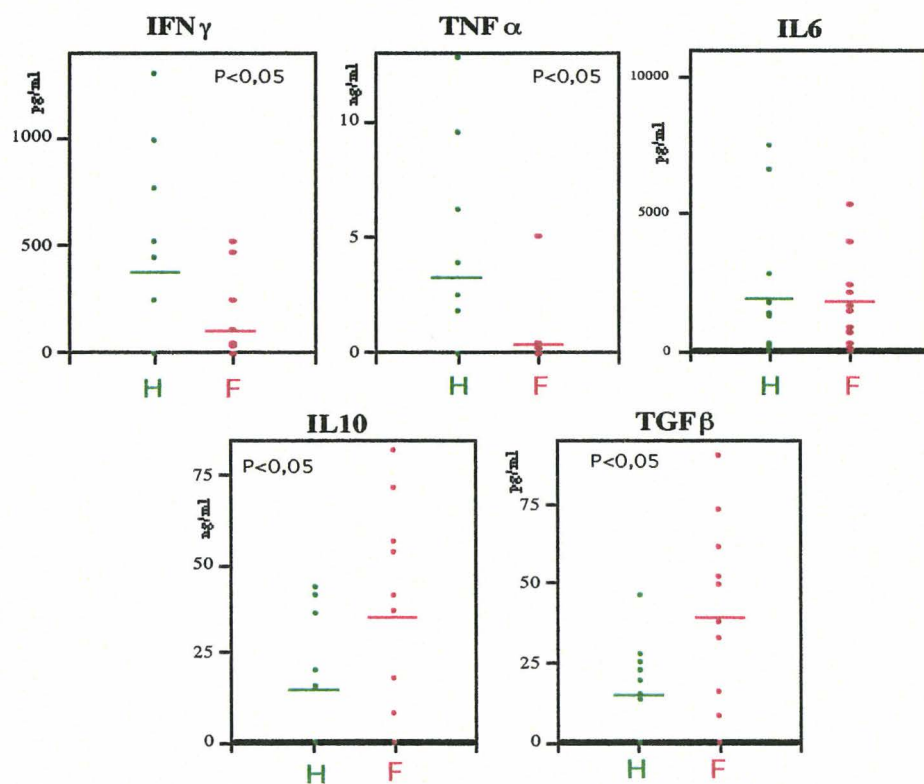
Les valeurs individuelles des réponses IgG3 et IgA spécifiques sont présentées en fonction de sexe, pour les individus âgés de plus de 35 ans (Fig. I.7).

Fig. I.7 : Réponse IgG3 et IgA anti-Sh28GST - classe d'âge ≥35 ans



Alors que la réponse IgG3 spécifique apparaît individuellement faible et est identique entre les hommes et les femmes, une forte réponse IgA anti-Sh28GST a été détectée uniquement chez les femmes de plus de 35 ans. Malgré le nombre réduit d'individus dans cette classe d'âge, la réponse IgA anti-Sh28GST est significativement plus élevée chez les femmes que chez les hommes. Pour évaluer si cette différence en fonction du sexe pourrait être associée à une variation du profil des cytokines, le dosage des cytokines dans les surnageants de culture est présenté pour tous les individus âgés de plus de 35 ans (Fig. I.8).

Fig. I.8 : Production de cytokines spécifique à la Sh28GST - ≥35 ans



Comme pour les 16-34 ans, aucune production d'IL-4 et d'IL-5 spécifique à la Sh28GST n'a été détectée dans cette classe d'âge.

La production d'IL-6 apparaît similaire entre les hommes et les femmes. En revanche, malgré une relative hétérogénéité individuelle, les productions spécifiques d'IFN γ et de TNF α sont significativement plus faible chez les femmes comparativement aux hommes. A l'inverse, la sécrétion d'IL-10 et de TGF β , sont significativement plus importante chez les femmes. Bien qu'aucune corrélation statistique n'a été trouvée significative entre chaque cytokine (test de Spearman et Kendall), la production de TGF β et d'IL-10, deux cytokines anti-inflammatoires, semble être concomitante avec une faible sécrétion de deux cytokines de type-1 et/ou inflammatoire, chez les femmes âgées de plus de 35 ans. Pour confirmer la faible production des cytokines de type Th1 que nous observons chez les femmes, nous avons également dosé dans les mêmes surnageants l'IL-12 et l'IL-2 mais aucune production spécifique n'a été mise en évidence.

La production des cytokines a été évaluée après stimulation *in vitro* des PBMC par des extraits totaux d'antigènes parasitaires (SWAP et SEA). Alors qu'aucune production d'IL-5 et d'IL-12 n'a été mise en évidence vis-à-vis du SEA, nous avons détecté une forte sécrétion de ces deux cytokines contre le SWAP. Aucune différence significative n'a été observée en fonction du sexe (IL-5: 267 \pm 364 et 313 \pm 311 pg/ml - IL-12: 716 \pm 203 et 904 \pm 421 pg/ml; hommes et femmes, respectivement). Ces résultats montrent bien que l'absence de production d'IL-5 et d'IL-12 vis-à-vis de la Sh28GST ne peut être attribuée à un problème de détection de nos tests car la sécrétion de ces deux cytokines peut être détectée fortement après stimulation par les antigènes totaux. Malheureusement, nous n'avons pas réalisé le dosage d'IL-2, d'IL-4 et de TGF β spécifique aux antigènes parasitaires totaux.

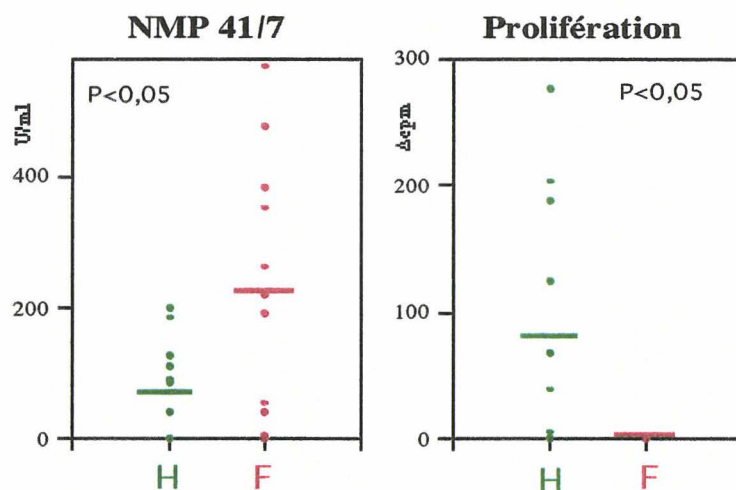
En revanche, il a été détecté une forte production d'IL-10 contre le SEA, mais sans aucune différence en fonction du sexe (hommes: 66,7 \pm 45,6; femmes: 75,6 \pm 56,3 ng/ml). De même pour le dosage des cytokines sériques, la quantité d'IL-10 mais également de TGF β était identique dans les 2 sexes. Ces résultats démontrent, de nouveau, que la différence dans le profil des cytokines n'a été observé que vis-à-vis de l'antigène spécifique Sh28GST et non pas vis-à-vis de l'ensemble des antigènes parasitaires. En effet, une faible production des cytokines de type-1 semble être associée à une sécrétion plus élevée de TGF β et d'IL-10 uniquement chez les femmes \geq 35 ans, groupe dans lequel la réponse IgA anti-Sh28GST est majoritaire. Cependant, aucune corrélation statistique entre la présence de ces cytokines et les IgA était significative, fait probablement lié au faible nombre de femmes dans cette classe d'âge.

Concernant cette balance entre la production de cytokines anti-inflammatoires et celle de type-1, il a été récemment démontré qu'une mort cellulaire par apoptose pouvait inhiber la sécrétion du TNF α et induire la production d'IL-10 (Voll *et al.*, 1997) et de TGF β (Fadok *et al.*, 1998) par les monocytes humains. Ainsi, il est maintenant clairement démontré qu'un processus

apoptotique pourrait intervenir directement par contact cellulaire ou indirectement par ingestion de corps apoptotiques, à la fois dans la régulation des cytokines inflammatoires mais également dans l'induction de la sécrétion de cytokines immunorégulatrices comme l'IL-10 et le TGF β . Ce processus de mort cellulaire permettrait ainsi à l'organisme de réguler toute réaction inflammatoire (Voll *et al.*, 1997). Comme nous observons une faible production de TNF α associée à une forte présence de TGF β et d'IL-10 chez les femmes de plus de 35 ans, nous avons évalué le rôle potentiel d'une mort cellulaire spécifique après stimulation *in vitro* des PBMC par la Sh28GST.

Comme cette idée nous ait venu *a posteriori*, au vu des résultats des cytokines, nous n'avions pas conservé les cellules des patients. Ainsi, n'ayant plus les cultures cellulaires disponibles, la seule possibilité pour évaluer ce processus spécifique à la Sh28GST était de doser la présence d'un marqueur de mort cellulaire dans les mêmes surnageants utilisés pour la détection des cytokines. Alors que le dosage de la protéine FAS-Ligand n'avait donné aucun résultat probant (non montré), notre choix s'est porté pour plusieurs raisons sur le facteur NMP41/7, une protéine de la matrice nucléaire. En effet, de nombreuses études ont démontré que cette protéine était clivée puis solubilisée, et ainsi détectable dans les surnageants, au cours d'un processus de mort cellulaire, en particulier une mort par apoptose (revue de Miller *et al.*, 1994). Des travaux récents montrent que la présence du NMP41/7 dans les surnageants de culture est corrélée à la fragmentation du DNA et à la production de FAS-Ligand, deux paramètres reconnus pour être des marqueurs apoptotiques (Baize *et al.*, 1999). La présence du NMP41/7 dans les surnageants semble donc être un marqueur tardif mais fiable d'un processus de mort cellulaire par apoptose.

Pour compléter cette étude, la capacité des cellules (PBMC) à proliférer après stimulation spécifique par la Sh28GST a également été évaluée (Annexe IIbis). Ces deux paramètres (NMP41/7 et prolifération) sont présentés individuellement pour les hommes et pour les femmes âgés de plus de 35 ans (Fig. I.9). La quantité de NMP41/7 est exprimée en Unité/ml, après soustraction du bruit de fond non spécifique pour chaque surnageant. La prolifération spécifique est mesurée en Δ cpm (triplicate), qui correspond à la différence, pour un même patient, entre les valeurs de radioactivité (en cpm) obtenues après stimulation par la Sh28GST et celles détectées dans les cultures non-stimulées.

Fig. I.9 : Mort cellulaire et prolifération spécifique à la Sh28GST - ≥ 35 ans

Chez les femmes de plus de 35 ans, la présence de NMP41/7 spécifique à la Sh28GST a été détectée dans presque tous les surnageants (9/11). La présence de ce marqueur est significativement supérieure dans les cultures des femmes comparativement à celles des hommes ($P < 0,05$). Ceci suggère qu'un processus *in vitro* de mort cellulaire spécifique à la Sh28GST serait sexe-dépendant en étant prépondérant chez les femmes infectées. Le manque total de prolifération spécifique observée chez les femmes semble renforcer cette hypothèse.

Ainsi chez les femmes (≥ 35 ans), la forte production de TGF β et d'IL-10 concomitante à une faible production d'IFN γ et de TNF α pourrait être associée à la présence d'un processus de mort cellulaire spécifique à la Sh28GST. L'absence de prolifération spécifique pourrait être également expliquée par un effet inhibiteur du TGF β et de l'IL-10 sécrétés, comme il l'a été démontré pour des cellules T humaines (Ruegger *et al.*, 1990; de Waal Malefyt *et al.*, 1991).

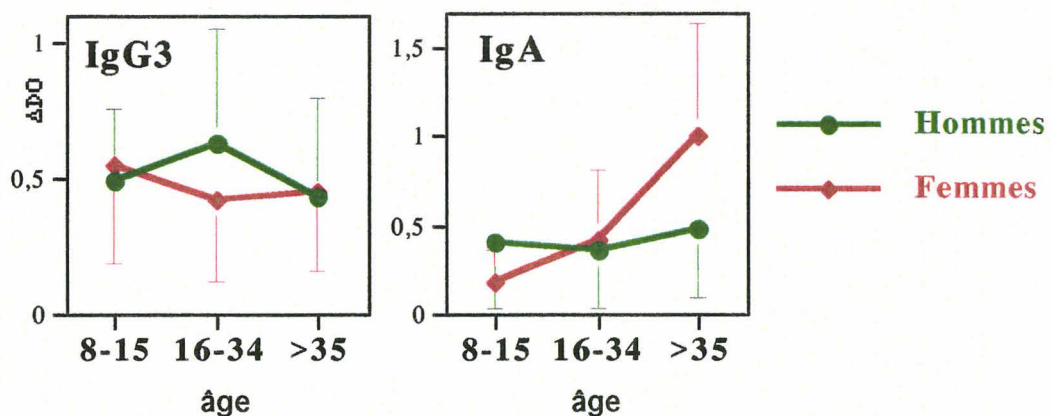
Nous avons donc mis en évidence chez les adultes que le profil de production de cytokines apparaît différent selon le sexe des individus infectés par *S. haematobium*. Ce phénomène semble être extrêmement spécifique de la Sh28GST car aucune variation de la réponse cellulaire entre les deux groupes n'a été observée vis-à-vis d'extrait d'antigènes parasitaires totaux (SWAP, SEA). De plus, cette différence sexe-dépendante apparaît liée à l'âge des individus comme nous avons pu l'observer pour les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST. La probable association entre ces différentes productions de cytokines *in vitro* et l'évaluation de la réponse humorale spécifique observée *in vivo* dans le serum des patients pourra être discutée dans le chapitre "Résumé et discussion" (I.6).

Au préalable, nous avons voulu savoir si cette réponse immunitaire, présente chez des patients infectés par *S. haematobium*, était uniquement spécifique de la Sh28GST ou pourrait également reconnaître une GST hétérologue de Schistosome. Cette reconnaissance hétérologue a été réalisée pour la réponse anticorps uniquement.

I.5) Reconnaissance hétérologue de la 28GST de *S. mansoni* :

Dans le cadre d'une stratégie vaccinale utilisant l'antigène Sh28GST, l'évaluation de la reconnaissance de la Sm28GST par les serums de patients infectés par *S. haematobium* apparaît particulièrement intéressante. En d'autres termes, nous nous demandions si des anticorps spécifiques à la Sh28GST induits au cours de l'infection, étaient capables de reconnaître la 28GST du parasite *S. mansoni*. Comme nous avons montré que les IgG3 et les IgA étaient les deux isotypes majoritaires contre la Sh28GST, seules ces deux types de réponses sont présentés en fonction de l'âge et du sexe des 108 patients infectés dans le village de Ourou-Madiou.

Fig. I.10 : Reconnaissance de la Sm28GST - réponse IgG3 et IgA



Ces résultats montrent tout d'abord que les anticorps de type IgG3 et IgA anti-Sh28GST, présents dans le serum des patients infectés par *S. haematobium*, sont capables de reconnaître la Sm28GST. En revanche, les écart-types apparaissent plus importants que ceux observés vis-à-vis de la Sh28GST et sont probablement l'image d'une plus grande hétérogénéité individuelle. En effet, aucune significativité statistique n'a été observée entre les groupes d'âge ou de sexe. Néanmoins, le profil de ces deux réponses anticorps semble similaire à celui observé contre la Sh28GST comprenant les pics des réponses IgG3 chez les hommes de 16-34 ans et IgA chez les femmes âgées de plus de 35 ans. Ce résultat indique non seulement, que ces deux isotypes majoritaires reconnaissent une 28GST hétérologue mais que le profil de ces réponses semble similaire à celui obtenu avec la protéine homologue.

Au cours de ce chapitre traitant de la réponse immune spécifique différente suivant le sexe des individus infectés, nous avons constaté que ces variations peuvent être observées vis-à-vis d'autres 28GST alors qu'aucune différence n'a été détectée vis-à-vis d'un extrait parasitaire (SEA). Cette variation de l'immunité anti-parasitaire dépendante du sexe semble donc être particulier à notre antigène d'intérêt.

I.6) Résumé et discussion : effet de l'âge et du sexe sur le profil de la réponse immune spécifique à la Sh28GST

Nous avons montré dans ce chapitre l'existence d'une réponse immunitaire spécifique de la Sh28GST qui, acquise naturellement au cours de l'infection par *S. haematobium*, était dépendante de l'âge et du sexe des individus.

I.6.1) Variation en fonction de l'âge:

Dans cette population, les IgE, IgG3 et IgA anti-Sh28GST représentent les trois isotypes majoritaires contre la Sh28GST, cela avant traitement par le praziquantel. Alors que la réponse IgE spécifique reste stable, les anticorps IgG3 et IgA varient fortement en fonction de l'âge et sont prépondérants chez les adultes. D'autre part, le pic de production de ces 2 isotypes est variable en fonction des 2 classes d'âges adultes : IgG3 pour les 16-34 ans suivi des IgA pour les ≥ 35 ans. Contrairement aux IgE, la régulation des IgG3 et des IgA semble dépendre fortement de l'âge des adultes infectés alors que l'intensité d'infection est identique entre les deux classes d'âge d'adultes.

Depuis de nombreuses années, un point essentiel dans les études immuno-épidémiologiques, concernant l'acquisition de l'immunité anti-bilharzienne, est de comparer le rôle joué par l'âge à celui de "l'expérience d'infection". En effet dans des foyers où l'infection est présente depuis de très nombreuses décennies, l'histoire d'exposition pourrait avoir un effet plus important que l'âge des individus infectés dans l'acquisition d'une immunité anti-parasitaire (Gryseels, 1994). Mais, le foyer d'infection dans cette région du Sénégal présenterait la particularité d'être relativement récent (environ 8 ans à 10 ans) (Picquet *et al.*, 1996). Ce paramètre suggère fortement que tous les individus de ce village ont probablement été en contact avec le parasite le même nombre d'années et ceci quelque soit leur âge. En particulier, les patients âgés de 16 à 34 ans ont sans doute la même histoire d'exposition que les individus de plus de 35 ans. La forte

réponse IgA spécifique à la Sh28GST (également observée contre le SEA) n'a donc probablement pas été induite par un plus grand nombre de contact à l'infection pour les ≥ 35 ans comparativement aux 16-34 ans. Cette forte réponse IgA présente chez les plus âgés, pourrait être ainsi le signe d'une maturation de la réponse immune spécifique qui pourrait s'acquérir différemment en fonction de l'âge de l'individu. Cette association entre IgA et maturité immunitaire est renforcée par l'observation montrant une absence de variation de la réponse IgG3 anti-SEA en fonction de l'âge. Ainsi, seule les réponses IgA anti-Sh28GST et anti-SEA sont majoritaires chez les individus les plus âgés. Des résultats similaires ont été montrés vis-à-vis du SEA (Ndhlovu *et al.*, 1996) mais également contre la Sm28GST (Grzych *et al.*, 1993). En revanche, la régulation des anticorps IgG3 apparaît particulièrement lié à la reconnaissance de l'antigène Sh28GST car aucune différence n'a pu être observée vis-à-vis du SEA. Alors qu'il a été démontré la présence de cet isotype vis-à-vis de la Sm28GST chez des enfants infectés par *S. mansoni* (Auriault *et al.*, 1990), aucune observation n'avait été réalisée chez les adultes. Notre étude montre donc, pour la première fois, l'importance de cet isotype vis-à-vis des 28GST et sa variation en fonction de l'âge des individus infectés.

De notre étude nous pouvons faire deux constatations : les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST sont prépondérantes chez les adultes. Or, ces adultes présentent une intensité d'infection plus faible que les enfants. Ainsi, ces deux réponses isotypiques pourraient intervenir dans l'acquisition d'une immunité protectrice suggérée pour se développer naturellement avec l'âge. Cependant, si cette étude ne prouve pas que ces deux isotypes interviennent directement dans une réduction du nombre d'oeufs, le maximum de ces deux réponses isotypiques est concomitant avec une faible intensité d'infection mesurée en nombre d'oeufs présents dans les urines. Le dosage du CAA sérique, évaluant la charge parasitaire, chez tous les individus de la cohorte aurait pu nous apporter beaucoup d'informations. Contrairement aux enfants, il est fort probable que, pour les adultes, le nombre d'oeufs excrétés dans les urines ne soit pas corrélée avec la charge parasitaire. Il est ainsi bien démontré, par cette double évaluation, que les adultes présentent naturellement une immunité anti-fécondité, contrairement aux enfants (Agnew *et al.*, 1993). Les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST pourraient ainsi jouer un rôle prépondérant dans cet effet anti-fécondité et ainsi prendre part activement dans l'acquisition d'une immunité protectrice. Ce rôle sera largement exposé dans le chapitre III traitant de l'immunité lors de l'infection par *S. mansoni*.

1.6.2) Variation en fonction du sexe : association entre les réponses anticorps et la production *in vitro* des cytokines :

Malgré de nombreuses études immuno-épidémiologiques sur la schistosomiase, une seule décrit une influence du sexe sur la réponse humorale spécifique aux antigènes de vers adultes, au

cours de l'infection par *S. mansoni* ou par *S. japonicum* (Webster *et al.*, 1997). Ainsi, les hommes infectés présentent des réponses IgG1, IgG4 et IgE plus importantes que les femmes. Bien que cette différence apparaisse plus importante chez les adultes, cette variation a également été observée chez les enfants. Même si cette différence reste significative après avoir effectué des régressions statistiques écartant le paramètre parasitologique, l'intensité d'infection observée chez les adultes est néanmoins supérieure chez les hommes. Comme les auteurs le soulignent, cette différence d'immunité anti-parasitaire semble plus relié à une différence dans l'intensité d'infection qu'à un effet du sexe.

Dans notre étude, l'intensité d'infection et probablement l'histoire d'exposition apparaissent être similaires entre les sexes, et ceci quelque soit l'âge. En effet, nous supposons dans ce village cette similarité d'exposition car, d'une part, l'endémie est récente et, d'autre part, la prévalence est identique entre les hommes et les femmes. Bien que difficiles et peu reproductibles, des études de contact à l'eau dans ce village aurait pû apporter des informations complémentaires à nos données épidémiologiques. Mais, au vu de nos résultats parasitologiques, il semble possible d'analyser la réponse immune spécifique en fonction du sexe des patients infectés en écartant l'influence du paramètre infectieux.

Ainsi nous montrons l'existence d'une immunité spécifique sexe-dépendante, où la réponse IgG3 est significativement plus élevée chez les hommes âgés de 16 à 34 ans alors que la réponse IgA est majoritaire chez les femmes de plus de 35 ans. Connaissant le rôle important des cytokines dans la commutation isotypique et/ou la production de tel ou tel isotype (Garraud *et al.*, 1996), nous avons évalué si cette différence ne pouvait pas être liée à un profil de production de cytokines particulier pour chaque sexe.

Réponse IgG3 et production de cytokines chez les hommes:

Dans la classe d'âge 16-34 ans, la réponse IgG3 majoritaire chez les hommes semble être concomitante avec une forte production d'IFN γ , détectée après stimulation *in vitro* des PBMC par la Sh28GST. Mais le rôle de cette cytokine dans la production d'IgG3 apparait controversé chez l'homme. En effet, alors que l'IL-4 induit la commutation isotypique du gène γ 3 (Fujieda *et al.*, 1995), l'effet de l'IFN γ sur la sécrétion des IgG3 *in vitro* n'a jamais été montré chez l'homme. Cependant, l'IFN γ est capable d'induire la commutation isotypique vers la sécrétion d'IgG3 chez la souris, mais d'une manière T-indépendante contre des antigènes polysaccharidiques, alors que l'IL-4 induit un effet inhibiteur (Snapper *et al.*, 1992). D'autre part chez des patients chroniquement infecté par *Borrelia burgdorferi*, agent étiologique de la maladie inflammatoire de Lyme, l'apparition des IgG3 est clairement associée à la réponse immune de type Th1, dépendante de l'IFN γ (Widhe *et al.* 1998). Dans cette pathologie, l'IgG3 est un isotype majoritaire et sa présence chez l'homme dépend d'une forte production d'IFN γ .

Au cours de l'infection humaine par le VIH-1, une faible présence des IgG3 est associée à une forte réponse IgE et IgG4 et il est suggéré que ce phénomène est corrélé à une faible réponse de type Th1 (de Martino *et al.*, 1999). De plus, l'IL-10 est décrite pour induire une commutation isotypique vers la production d'IgG3 mais également d'IgG1 par les lymphocytes B humains (Brière *et al.*, 1994). Le rôle de l'IL-10 dans la régulation d'autres isotypes comme les IgE ou les IgG4 est également bien documenté (Akdis *et al.*, 1998).

Dans notre étude, une forte production d'IL-10 spécifique à la Sh28GST a été détecté à la fois pour les deux sexes (16-34 ans). Mais, une faible présence d'IgG1, IgE et IgG4 est observée dans les deux populations. Dans ce cas, la détection de cytokines comme l'IL-10 *in vitro* ne corrèle pas avec l'observation *in vivo* de la réponse isotypique spécifique. En revanche, dans la population masculine, la production d'IFN γ majoritaire et la présence spécifique d'IL-10 pourrait être associée à une forte réponse IgG3. Une telle association de ces deux cytokines, connues pour appartenir à des profils Th opposés, a cependant été démontré chez des patients au cours de la maladie de Lyme (Pohl-Koppe *et al.*, 1998). Dans cette étude, une même population de lymphocytes T est capable de sécréter à la fois de l'IL-10 et de l'IFN γ . Ce profil particulier pourrait ainsi induire la forte production des IgG3 observées au cours de cette maladie inflammatoire (Widhe *et al.* 1998). Une autre étude sur des PBMC de patients infectés par le VIH mais également de donneurs sains, montre que l'IL-12 induit l'apparition de clones lymphocytaires T CD4 $^{+}$ possédant ce phénotype particulier de production simultanée d'IFN γ et d'IL-10 (Gerosa *et al.*, 1996). Comme dans ces deux études, il a été montré également que l'IL-12 induisait, cette fois-ci en présence de divers antigènes, la différenciation de lymphocytes T humains en cellules sécrétrices de ces deux cytokines (Windhagen *et al.*, 1996). De manière intéressante, cette population lymphocytaire particulière possède un phénotype de cellules matures.

La présence de ce profil immunitaire particulier est donc observée lors d'une infection chronique (maladie de Lyme), ou lors de la mise en place de cellules mémoires possédant probablement des propriétés immunorégulatrices. Ce profil immunitaire apparait ainsi proche de celui que nous observons chez les adultes chroniquement infectés mais, dans notre étude, une production spécifique d'IL-12 n'a jamais été détectée. Néanmoins, l'observation dans ces différents modèles d'un tel profil immunitaire de type "mature", caractérisé à la fois par la présence d'IFN γ et d'IL-10 apparait crucial. Ce profil spécifique à la Sh28GST pourrait être associé à la forte réponse IgG3 spécifique que nous avons observée chez les hommes adultes chroniquement infectés. Ainsi, les sécrétions importantes de ces deux cytokines pourraient s'associer ou agir en synergie pour induire cette réponse isotypique particulière.

Dans notre étude, ces cytokines peuvent probablement être sécrétées par les monocytes, cellules connues pour produire fortement l'IL-10 et l'IFN γ . Cependant, au vu de nos résultats et des données de la littérature, la production de ces cytokines par des cellules T spécifiques de la Sh28GST doit être aussi prise en compte. La purification des cellules T à partir des PBMC et le

dosage des cytokines après stimulation par la Sh28GST pourrait nous apporter de nombreuses informations sur la source cellulaire de la sécrétion de ces deux cytokines.

Une telle synergie entre cytokines pourrait également avoir lieu chez les femmes infectées, comme nous allons le discuter dans le paragraphe suivant.

Réponse IgA et production de cytokines chez les femmes :

Chez les individus de plus de 35 ans, nous avons observé que la réponse IgA anti-Sh28GST était significativement plus élevée chez les femmes. Nous avons voulu savoir si cette différence pouvait être liée à une variabilité dans le profil de production des cytokines. Nous observons que la production spécifique de TGF β et d'IL-10 est elle aussi plus importante chez les femmes. Il a été démontré que ces deux cytokines anti-inflammatoires peuvent coopérer pour induire la sécrétion de l'isotype IgA (Defrance *et al.*, 1992). En effet, le TGF β est capable d'intervenir précocément dans la commutation vers cet isotype (van Vlasselaer *et al.*, 1991) alors que l'IL-10 jouerait un rôle central dans la sécrétion des IgA par les lymphocytes B humains (Brière *et al.*, 1994).

Bien qu'aucune corrélation statistique n'a été observée entre ces deux cytokines et la présence des IgA spécifiques dans notre étude, probablement à cause du faible nombre d'individus, la production concomitante du TGF β et de l'IL-10 *in vitro* semble être associée à la présence *in vivo* des IgA anti-Sh28GST chez les femmes.

Il est bien établi que la production de ces deux cytokines est responsable de la régulation négative de cytokines inflammatoire et/ou de type-1. En effet, la production de TNF α , connu pour favoriser le développement d'une réponse de type-1 (Becher *et al.*, 1999) peut être inhibée en présence d'IL-10 ou de TGF β (de Waal Malefyt *et al.*, 1991; Chantry *et al.*, 1989). De plus, le développement d'une réponse de type Th1 est inhibé en présence de TGF β ou d'IL-10 (Fargeas *et al.*, 1992; Sher *et al.*, 1991) neutralisant directement la production d'IFN γ et d'IL-12 (Schmitt *et al.*, 1994; Bright *et al.*, 1998). En accord avec ces données, nous observons que la forte production de TGF β et d'IL-10 est concomitante avec une faible sécrétion de TNF α et d'IFN γ , observée uniquement chez les femmes.

Comme nous l'avons souligné dans les résultats, la chute de la réponse inflammatoire ou de la réponse de type Th1 serait liée à une mort de populations cellulaires impliquées, et à une sécrétion concomitante d'IL-10 (Voll *et al.*, 1997) et de TGF β (Fadok *et al.*, 1998). Ainsi, il est décrit qu'une réponse inflammatoire, devenue trop néfaste pour l'organisme après infection, pourrait être régulée non seulement par la mise en place d'une mort cellulaire par apoptose mais également par la sécrétion parallèle de cytokines anti-inflammatoires. Le TNF α est un des inducteurs les plus puissants de l'apoptose (Nagata; 1997) et les lymphocytes Th1 sont connus

pour exprimer un fort niveau de molécules Fas-Ligand à leur surface, les rendant plus sensibles à l'apoptose que les cellules Th2 (Ramsdell *et al.*, 1994). Le déclenchement d'une mort cellulaire, après un processus inflammatoire, pourrait être associée à la production d'IL-10 et de TGF β . En effet, il est montré que l'IL-10 est capable d'entretenir ce processus apoptotique (Estaquier *et al.*, 1997) et que la phagocytose par des macrophages de cellules apoptotiques induit la production active du TGF β (Fadok *et al.*, 1998).

Chez les femmes, une forte production de TGF β et d'IL-10 associée à une faible sécrétion des cytokines de type-1 semble être concomitante à la détection spécifique dans les surnageants de culture du marqueur apoptotique NMP41/7. La présence des IgA pourrait être associée à l'existence d'un profil immunitaire particulier caractérisé par la sécrétion des deux cytokines anti-inflammatoires capables de réguler négativement une réponse de type-1. Ce phénomène pourrait être lié à un processus de mort cellulaire par apoptose. La cascade chronologique de tous ces événements apparait difficilement analysable mais il serait intéressant d'évaluer si l'apoptose est le premier processus qui, une fois déclenché, serait capable d'induire la régulation entre les cytokines. Le NMP41/7 que nous avons dosé semble être un marqueur tardif de mort cellulaire (Miller, 1994). La détection d'un marqueur précoce d'apoptose, telle que la protéine Fas-Ligand, nous aurait apporter de précieuses informations mais aucune présence de cette molécule n'a été détectée à des taux significatifs dans les surnageants de cultures.

Femmes ≥ 35 ans: Profil de type Th3 spécifique à la Sh28GST ?

Même s'ils ne représentent environ que 10 à 15 % des cellules composant les PBMC, les monocytes peuvent prendre une part active dans la sécrétion du TGF β et d'IL-10 détectée après stimulation par la Sh28GST. Néanmoins, les lymphocytes T représentent à peu près 60% des cellules des PBMC, et ainsi sont probablement la source principale de la production de ces deux cytokines. La production des cytokines par différentes populations de lymphocytes T peut ainsi être un élément essentiel dans nos observations comme nous allons maintenant le discuter.

La présence de ces deux cytokines anti-inflammatoires associée à une faible production des cytokines de type-1 et à la présence d'une apoptose spécifique forment un profil immunitaire particulier qui pourrait intervenir dans la production des IgA.

Dans un modèle de tolérance orale chez la souris, il a été observé l'apparition d'une population cellulaire particulière de lymphocytes T CD4 $^+$ produisant majoritairement du TGF β et des taux variables d'IL-4 et d'IL-10 (Chen *et al.*, 1994). Dans ce modèle, l'administration orale de MBP (Myelin Basic Protein) protège contre l'encephalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), modèle d'une sclérose en plaques autoimmune, en inhibant fortement la réponse Th1 pathologique. Ce phénomène est lié à la présence de clones CD4 $^+$ spécifiques de la MBP, qui

produisent ces trois cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, cette population lymphocytaire particulière, identifiée dans les ganglions mésentériques, a été nommée Th3 et apparaît être constituée de cellules T dérivées de clones Th2.

Dans ce même modèle, il a été montré que l'apparition de cette population cellulaire Th3 était associée à une délétion des clones Th1, mais également Th2, par un phénomène d'apoptose (Chen *et al.*, 1995). Ce résultat suggère que les clones de type Th3 semble être bel et bien différent des Th2. Dans l'EAE, l'IL-4 apparaît nécessaire pour la différenciation des cellules Th3 sécrétrices de TGF β (Inobe *et al.*, 1998). Par contre, dans un modèle murin de colites médiées par une réponse Th1, la présence de ces cellules CD4⁺ sécrétrices de TGF β est protectrice et existe chez des animaux déficient en IL-4 (Powrie, *et al.* 1996). Ce résultat, démontrant la présence de cette population cellulaire Th particulière dans un autre modèle, indique que l'IL-4 n'est pas indispensable à l'apparition de ces clones de type Th3.

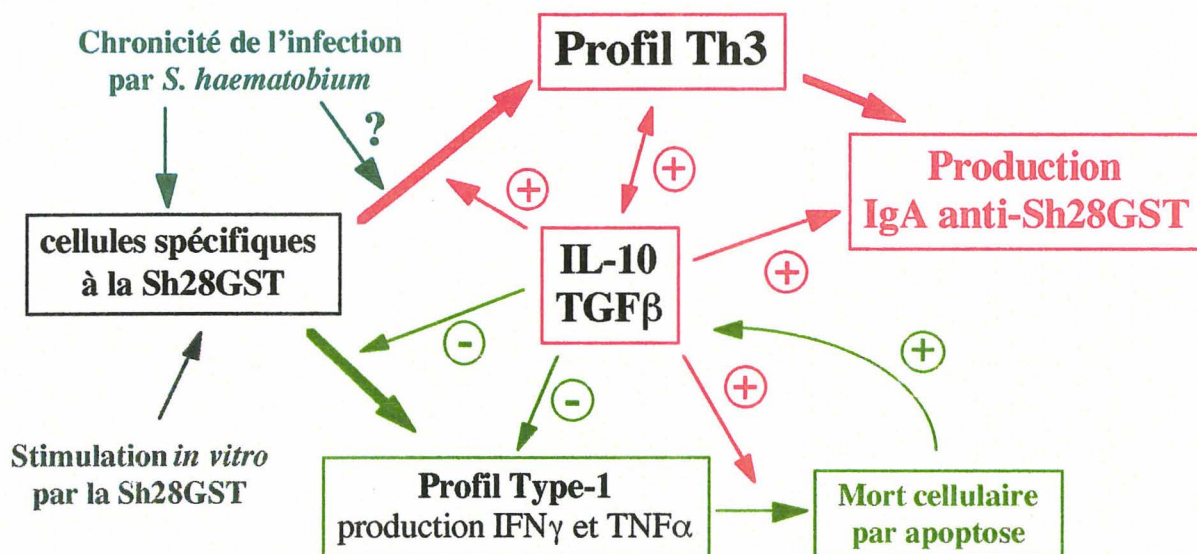
Ce profil Th3 semble être caractérisé par la sécrétion majoritaire de TGF β mais également d'IL-10, probablement nécessaire à la croissance de ces clones (Teitelbaum *et al.*, 1999; Weiner, 1997). La réponse de type Th3 a été identifié comme une réponse muqueuse dans des modèles de tolérance orale et, de part la présence de TGF β et d'IL-10, serait associé à la production de l'isotype IgA (Weiner, 1997). Dans toutes ces études, l'apparition de cette réponse de type Th3 est associée à la régulation négative de la réponse Th1 après mort cellulaire par apoptose.

Il est vrai que l'existence immunologique de cette population lymphocytaire Th3 peut être controversée car elle n'a été que majoritairement mise en évidence dans des modèles de tolérance orale. Ainsi, la présence de ces clones Th3 ne pourrait se retrouver qu'au niveau des ganglions mésentériques. Or, ces clones ont été, d'une part, observés à un niveau splénique chez des souris immunisées oralement avec la MBP indiquant que ce type de profil Th3 peut être observé à un niveau systémique (Teitelbaum *et al.*, 1999). D'autre part, après l'administration orale de la MBP, la présence de ces cellules sécrétant du TGF β et de l'IL-10, associée à une inhibition de la réponse Th1, a été démontré après culture de PBMC de patients atteints de scléroses en plaques (Fukaura *et al.*, 1996).

Ce résultat démontre que cette population Th3, dont l'origine serait mucoale, pourrait être retrouvée dans les organes lymphoïdes principaux et au sein des diverses populations du sang périphérique.

Dans notre étude, nous ne montrons évidemment pas directement la présence d'une telle population de lymphocytes T de type Th3 chez les femmes âgés de plus de 35 ans. Néanmoins au vu des données bibliographiques, le profil observé pourrait être associé à ce type de réponse immune. Cette réponse immunitaire spécifiquement observée vis-à-vis de la Sh28GST pourrait être à la base de la forte production des IgA chez les femmes.

Cette hypothèse pourrait être schématiquement résumée ainsi:



Réponse de type Th3 et tolérance : influence de la chronicité de l'infection?

La présence de réponses IgA spécifiques est souvent observée lors d'infections chroniques : schistosomiase, autres infections helminthiques comme la strongyloïdiase (Atkins *et al.*, 1997) ou l'onchocercose (Salinas *et al.*, 1996). Dans l'infection humaine par *Yersinia enterocolitica*, il a même été décrit que le dosage des IgA spécifiques a une valeur diagnostic dans l'évaluation de la chronicité (Lareen *et al.*, 1985). Dans ces différents exemples d'infection chronique, la réponse IgA est associée à la maturité de la réponse immune contrôlant le niveau d'intensité d'infection.

Le profil Th3, associé à une réponse IgA, a été mis en évidence dans un phénomène de tolérance orale (Weiner *et al.*, 1997). Or, le $TGF\beta$ et l'IL-10 sont des cytokines souvent produites au cours d'infections chroniques ou dans la mise en place d'une tolérance immunitaire. En effet, leur production au cours de la Leishmaniose semble jouer un rôle important dans la survie et la virulence du parasite mais également dans la susceptibilité à l'infection, en inhibant fortement la réponse de type Th1 protectrice (Barral *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1998). Dans divers modèles non-infectieux, le $TGF\beta$ et l'IL-10 sont connus pour jouer un rôle clef dans l'induction d'une tolérance immunitaire. Par exemple, l'administration sous-cutanée de $TGF\beta$ est capable de contrôler le rejet de tumeurs, ce qui suggère que cette cytokine immunorégulatrice pourrait générer un micro-environnement particulier induisant une tolérance immune (Chen *et al.*, 1998). Ce phénomène est également observé au niveau de la cavité oculaire et nommé ACAID (anterior chamber-associated immune deviation), caractérisé par la forte présence du $TGF\beta$ et de l'IL-10 inhibant une réponse Th1 (D'Orazio *et al.*, 1998).

Dans ces études, la présence de TGF β est associée avec l'apparition du mécanisme de mort cellulaire par apoptose. Une association entre la sécrétion de TGF β et d'IL-10 et la présence d'apoptose semble donc être étroitement liée aux mécanismes de tolérance immunitaire (Chen *et al.*, 1998). Cependant, l'induction et le maintien de ces mécanismes de tolérance pourraient également impliquer un phénomène d'anergie de la réponse cellulaire T, lié à la présence d'IL-10 (Groux *et al.*, 1996).

L'ensemble de ces résultats montrent le rôle prépondérant de ces deux cytokines anti-inflammatoires dans l'induction d'une tolérance immunitaire. De plus, ce profil immunitaire de type Th3 ayant été observé au cours d'une tolérance orale, nous pouvons nous demander si l'existence d'un tel profil ne prendrait pas une part active dans la tolérance immunitaire, en générale. Ces résultats obtenus dans des modèles non-infectieux peuvent être comparés à nos résultats suggérant l'apparition d'une réponse de type Th3 chez des adultes chroniquement infectés. La chronicité de l'infection au cours de la schistosomiase induirait ainsi des mécanismes immunitaires similaires à ceux de la tolérance. De plus, le TGF β apparaît être une cytokine tout à fait prépondérante et probablement clef pour induire une certaine maturité de la réponse immune. En effet, il a été montré récemment que cette cytokine induit l'apparition de cellules T possédant un phénotype "mature" (Genestier *et al.*, 1999). Maturité immunitaire, tolérance et chronicité pourraient être des phénomènes étroitement liés au cours de maladies parasitaires telle que la schistosomiase.

Cependant, ce profil immunitaire caractérisé par la production de TGF β et d'IL-10 et la présence des IgA spécifiques n'est prépondérant que chez les femmes âgées de plus de 35 ans. Chez les hommes âgés de 16 à 34 ans, nous montrons que les IgG3 anti-Sh28GST sont majoritaires et nous suggérons que leur production pourrait être associée à la forte sécrétion d'IFN γ et la présence d'IL-10. L'ensemble de ces résultats montrent d'une part que la présence de ces deux isotypes spécifiques et d'autre part que la production *in vitro* de cytokines varie en fonction du sexe des individus infectés. Nous ne pouvons pas écarter le fait que l'histoire d'exposition ou certaines habitudes individuelles sont différents en fonction du sexe des individus et pourraient expliquer ces variations. Néanmoins, l'intensité d'infection et la réponse anticorps dirigée contre l'ensemble des antigènes parasitaires (SEA) sont identiques entre les hommes et les femmes alors que la réponse immune spécifique à la Sh28GST est différente. Cette spécificité dépendante du sexe permet de penser que le système endocrinien, en particulier par l'effet des hormones sexuelles, pourrait avoir un rôle probable dans l'orientation de la réponse immune anti-Sh28GST.

I.6.3) Effet des hormones sexuelles dans l'orientation de la réponse immune spécifique ?

Au cours de la schistosomiase, une forte baisse de l'intensité d'infection après la puberté suggère que certaines hormones pourraient jouer un rôle, soit directement dans le métabolisme du parasite (voir chapitre II), soit dans l'induction et l'orientation de la réponse immune protectrice acquise naturellement (Fulford *et al.*, 1998). Au cours d'autres infections parasitaires, l'existence d'une variation, non seulement dans l'intensité d'infection mais également dans le développement de pathologie est décrite en fonction du sexe (Bundy, 1988).

Ainsi, une multitude de données dans la littérature démontre le rôle important des hormones sur la régulation du système immunitaire. Dans notre étude nous ne pouvons pas écarter l'effet probable de certaines hormones, autres que sexuelles, sur la régulation de la réponse immune anti-Sh28GST. Néanmoins au vu de nos observations, nous avons voulu nous focaliser sur l'influence des hormones sexuelles stéroïdes (estrogènes, progestérone et androgènes) qui pourrait intervenir dans la régulation de la réponse spécifique.

Il est admis généralement que les femmes développent une réponse immunitaire plus "élevée" que les hommes. En effet, les femmes présentent des taux d'anticorps totaux ou spécifiques plus importants, ce qui favoriserait par exemple le développement de maladies autoimmunitaires (Schuurs *et al.*, 1990). Il est d'ailleurs suggéré que les femmes ont le potentiel, par l'influence de leurs hormones sexuelles, d'induire préférentiellement une réponse anticorps forte avec une faible réponse cellulaire. Ce serait l'inverse pour les hommes.

En effet, la testostérone peut inhiber directement la production des anticorps par les cellules B (Kanda *et al.*, 1996) et certains androgènes ont la capacité de réguler négativement la maturation des cellules B (Schuurs *et al.*, 1990). L'effet de la testostérone pourrait être direct sur l'activité et la stimulation de la cellule B, ou indirect en inhibant la production de certaines cytokines impliquées dans la production des anticorps, comme l'IL-6 (Kanda *et al.*, 1996). A l'inverse, les estrogènes induisent la forte production d'anticorps par les cellules B humaines (Kanda *et al.*, 1999), en agissant directement et précocément dans la différenciation et la prolifération de celles-ci (Clerici *et al.*, 1991) ou indirectement en facilitant la maturation des lymphocytes Th (Kanda *et al.*, 1999).

L'action des différents stéroïdes sexuelles pourrait ainsi jouer un rôle direct dans l'activité des cellules productrices d'anticorps mais le rôle de ces hormones a majoritairement été décrit sur l'orientation de la production de certaines cytokines impliquées directement dans la régulation isotypique. Cependant, de nombreux travaux montrent des effets opposés par la même hormone soulignant ainsi que leur influence dépend fortement de la nature et de la spécificité antigénique des lymphocytes, de la balance *in vivo* entre les différentes hormones, de l'organe étudié et principalement de la dose d'hormones utilisée dans les expériences. Dans certains cas, une

hormone sexuelle utilisée à une très forte dose peut avoir l'effet inverse sur la production de cytokine que la même hormone utilisée à de plus faibles doses.

Néanmoins, certaines données apparaissent relativement reproductibles d'un modèle à l'autre et semblent apporter des éléments importants dans notre étude.

Effet de la testostérone et des androgènes

Il a été montré que la testostérone et ses dérivés tel que la dihydrotestostérone étaient capables d'augmenter la production d'IL-2 par les cellules T, et de diminuer principalement celle des cytokines de type Th2, l'IL-4 et l'IL-5 (Roberts *et al.*, 1996; Araneo *et al.*, 1991). Cet effet sur l'IL-2 pourrait ainsi expliquer la forte tendance des hommes à développer une immunité à médiation cellulaire.

Au cours de l'infection par le Coxsackievirus, la pathologie (forte inflammation du myocarde) est associée à une réponse de type Th1 et est largement dominante chez l'homme comparativement à la femme. Dans cette étude, la testostérone induit sélectivement la présence de lymphocytes CD4+ "IFN γ -positifs" (Huber *et al.*, 1999). La testostérone est donc capable d'induire directement une réponse de type Th1 en augmentant la capacité des cellules T à produire de l'IFN γ . Au cours de cette infection, l'effet de la testostérone sur l'induction de la réponse Th1 pourrait être lié à la disparition des cellules CD4+ Th2 par apoptose (Huber *et al.*, 1999).

La dehydroepiandrosterone (DHEA), androgène sécrété par les glandes surrénales et précurseur de la testostérone et de l'estradiol, semble avoir un effet très important dans l'orientation de la réponse immune vers un profil de type Th1. En effet, la DHEA induit la synthèse d'IL-2 et d'IFN γ par des cellules Th sans aucun effet sur la production d'IL-4 chez la souris (Daynes *et al.*, 1990).

Ce précurseur ne peut à priori pas être classé comme une hormone sexuelle. Néanmoins, il a été montré que la concentration sérique de DHEA est plus importante chez les hommes que chez les femmes et est maximale chez ceux âgés de 20 à 30 ans (Young *et al.*, 1999). De même, dans des populations infectées par *S. mansoni*, la présence sérique de DHEA apparaît plus importante chez les hommes adultes (Fulford *et al.*, 1998). Non seulement la quantité de DHEA est ainsi plus élevée chez les hommes, mais cet androgène semble produire son effet uniquement sur les lymphocytes T de souris males (Shela *et al.*, 1997).

De manière intéressante, l'IFN γ est la seule cytokine que nous avons majoritairement détectée chez les hommes âgés de 16 à 34 ans. Mais aucune production d'IL-2 n'a été observée après stimulation par la Sh28GST.

Il faut noter cependant que la sécrétion de cette cytokine n'a été observée qu'*in vitro* après stimulation antigénique et qu'il est impossible de prouver que ce phénomène existe réellement *in vivo*. Néanmoins, la testostérone et/ou la DHEA pourrait avoir ainsi un effet dans l'orientation de la réponse immune spécifique à la Sh28GST, se caractérisant par une production spécifique d'IFN γ plus importante chez les hommes adultes.

Effet de la progestérone et de l'estradiol

De nombreuses études soulignent le rôle de la progestérone et des estrogènes sur l'orientation de l'immunité en particulier vers un profil de type Th2. Un taux élevé de progestérone au cours de la grossesse favorise la mise en place d'un profil Th2 en inhibant les réponses Th1 (Wegmann *et al.*, 1993). Il est suggéré que l'existence d'une telle régulation permettrait le non-rejet du fœtus. La production d'IL-4 et d'IL-13 par des PBMC prélevés chez les femmes est fortement augmentée en présence de progestérone, mais également d'estradiol (Hamano *et al.*, 1998). Dans une autre étude, il semble que seule la progestérone est capable de favoriser l'induction et le développement de cellules Th2, associée à une forte production d'IL-4, à partir de clones initialement de type Th1 (Piccini *et al.*, 1995).

D'une manière plus générale, la progestérone intervient dans la régulation de processus inflammatoire en inhibant particulièrement la production de TNF α par les macrophages (Miller *et al.*, 1998). Cet effet anti-inflammatoire a également été décrit pour l'estradiol qui inhibe la production de TNF α , en induisant la production d'IL-10 d'une manière dose-dépendante (Gilmore *et al.*, 1997).

Mais il semble que l'estradiol et la progestérone influenceraient différemment la production de cytokines anti-inflammatoires. En effet, l'estradiol est capable d'augmenter la production d'IL-10, sans affecter la présence d'IL-4 tandis que la progestérone induit la sécrétion d'IL-4 par les mêmes clones humains T CD4⁺ mais n'a aucune action sur l'IL-10 (Correale *et al.*, 1998). Dans les deux cas, la conséquence est similaire: une diminution de la production de TNF α . Cet effet différent semble dépendre du modèle d'étude, de la dose hormonale utilisée et ne peut pas être généralisé à l'ensemble de la régulation immunitaire. Néanmoins, ce dernier exemple est frappant et suggère que ces deux hormones "féminines" diffèrent dans leur mode d'action.

Chez la femme, les estrogènes semblent être des hormones importantes dans l'augmentation de la production de TGF β (Ashcroft *et al.*, 1997). D'un point de vue isotypique, l'estradiol a la capacité de favoriser *in vitro* la production spécifique des IgA (Tokuyama *et al.*, 1994) et *in vivo*, au cours du cycle menstruel, le profil de sécrétion des IgA muqueux semble être lié à celui de l'estradiol sérique et non pas à celui de la progestérone (Gomez *et al.*, 1993). L'administration d'estradiol chez le rat induit une très forte production d'IgA dans les sécrétions utérines tandis que la progestérone n'a aucun effet (Wira *et al.*, 1997).

L'ensemble de ces données soulignent donc le rôle prépondérant des hormones sexuelles chez la femme, non seulement dans l'inhibition de réactions de type inflammatoire et/ou de type Th1, mais également dans l'induction de cytokines immuno-régulatrices comme l'IL-10, l'IL-4 ou le TGF β . Ces hormones pourraient jouer ainsi un rôle non négligeable dans l'orientation de la réponse immune spécifique à la Sh28GST et notamment dans la faible production d'IFN γ et de TNF α que nous observons chez les femmes infectées. De plus, l'estradiol pourrait agir particulièrement en induisant une production d'IL-10 et de TGF β associée à une réponse IgA anti-Sh28GST.

En accord avec nos résultats suggérant un phénomène de mort cellulaire spécifique par apoptose chez les femmes, il a été montré que les estrogènes semblent être fortement impliquées dans ces mécanismes au cours de maladies autoimmunitaires, en agissant directement sur l'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire (Cutolo *et al.*, 1995). Récemment, il a été décrit qu'un métabolite endogène de l'estradiol, le 2-méthoxyestradiol, était capable d'induire *in vitro* l'apoptose de cellules endothéliales (Tsukamoto *et al.*, 1998). Ainsi, l'estradiol pourrait être une hormone clef dans la régulation et l'orientation de la réponse immune spécifique que nous détectons chez les femmes adultes. L'ensemble de cette régulation pourrait aboutir à la forte production d'un isotype spécifique, l'IgA.

Nous pouvons ainsi nous demander si l'estradiol ne pourrait pas influencer, dans notre modèle, l'apparition de cette réponse de type Th3 alors qu'il est connu que la progestérone favorise une réponse Th2. Ce type d'orientation, différent selon l'hormone, soulève beaucoup de questions mais permet d'envisager de nombreuses études, chez l'homme et dans des modèles animaux, que nous présentons dans le chapitre "Discussion générale et perspectives".

L'effet du système endocrinien et en particulier l'action des hormones sexuelles stéroïdes pourrait influencer l'acquisition de l'immunité anti-Sh28GST chez les hommes et les femmes adultes qui présentent la même intensité d'infection. Ces hormones pourraient intervenir comme des facteurs "accélérateurs" pour induire la différence dans l'immunité spécifique que nous observons en fonction du sexe. Dans l'objectif d'une corrélation avec les résultats immunologiques, le dosage des taux sériques de ces hormones sexuelles, a été effectuée en fonction de l'âge des patients infectés et sera présenté dans le chapitre II.

De manière intéressante, aucune différence de la réponse immune contre l'ensemble des antigènes parasitaires (SEA) n'a été observé en fonction du sexe. Bien que le SEA représente une "soupe antigénique" composée de très nombreux antigènes, ce résultat indique une certaine spécificité de la réponse immune contre la Sh28GST (et contre la Sm28GST?) en fonction du sexe. Le rapport entre les hormones sexuelles et cette spécificité sera étudiée dans le chapitre II.

II) Influence des hormones sexuelles : Liaison à la Sh28GST et effet sur l'orientation de la réponse immune spécifique

La réponse immune spécifique à la Sh28GST étant dépendante du sexe des individus infectés (chapitre I), nous nous sommes intéressés à l'influence des hormones stéroïdes sexuelles dans notre modèle. Plusieurs démarches ont été élaborées pour évaluer leur rôle:

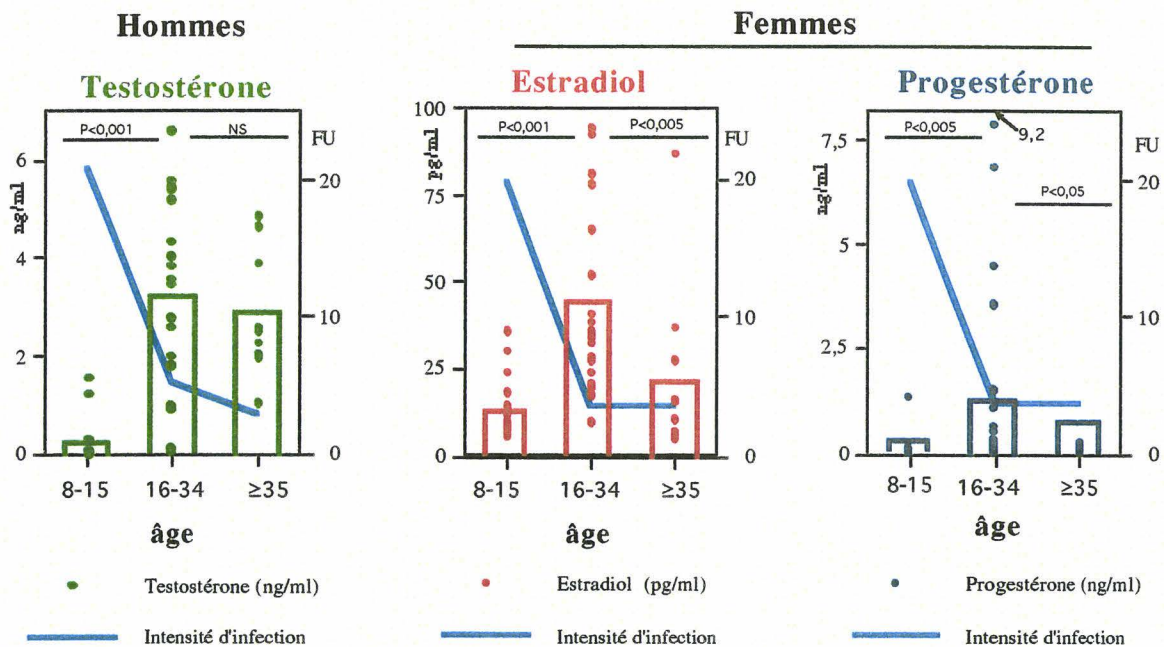
- Dosage hormonal dans le sérum des individus infectés
- Recherche de liaison spécifique entre ces hormones et la Sh28GST
- Influence de l'estradiol sur la réponse immune spécifique à la Sh28GST, dans un modèle murin

II.1) Dosage des hormones sexuelles dans le sérum des patients infectés par *S. haematobium* :

Le dosage sérique de la testostérone, de l'estradiol et de la progestérone a été réalisé chez tous les individus infectés par *S. haematobium* dans la cohorte présentée dans le paragraphe I.1 (village d'Ourou-Madiou). Un des premiers objectifs de cette étude était d'évaluer si la présence de telle ou telle hormone pouvait être corrélée à l'apparition d'un paramètre immunologique spécifique (isotypes ou cytokines) chez les hommes ou chez les femmes, comme nous l'avions suggéré précédemment. Pour ces raisons, le dosage des hormones est présenté en fonction des 3 classes d'âges précédemment décrites (8-15, 16-34 et ≥ 35 ans). La présence de testostérone a été évaluée chez les hommes alors que la progestérone et l'estradiol ont été recherchés dans la population féminine.

Ces dosages ont été réalisés par radioimmuno-marquage (Iode 125) selon la procédure indiquée dans les kits Immunotech. L'intensité d'infection, exprimée par la moyenne géométrique d'oeufs/10 ml d'urine, est également indiquée pour chaque groupe d'âge.

Fig. II.1 : Dosage des hormones stéroïdes sexuelles en fonction de l'âge



Nous constatons tout d'abord une très grande hétérogénéité des valeurs, en particulier pour la progestérone, connue pour varier de 0,06 à 25 ng/ml en fonction des phases du cycle menstruelle chez la femme caucasienne (ref. Kits Immunotech). Néanmoins, certaines différences significatives sont observées en fonction des 3 classes d'âges et selon le type d'hormone. La présence de testostérone est majoritaire chez les adultes mais aucune différence entre 16-34 ans et ≥ 35 ans n'a été détectée et les valeurs observées semblent correspondre aux valeurs retrouvées chez les hommes caucasiens (de 3 à 12 ng/ml pour les 18-81 ans).

En revanche, la présence d'estradiol et de progestérone est significativement inférieure chez les femmes âgées de plus de 35 ans comparativement à la classe d'âge 16-34 ans. De manière surprenante, les femmes dans notre étude étaient âgées de 35 à 51 ans, âge correspondant à l'avant ménopause chez les femmes caucasiennes. Or dans cette classe d'âge, il a été détecté des taux hormonaux très faible et très proche de ceux retrouvés après la ménopause (Estradiol: < 55 pg/ml, Progesterone: $< 1,6$ ng/ml chez des femmes caucasiennes). Ainsi, ce résultat suggère que: (1) soit la présence d'une infection bilharzienne peut influencer négativement le statut hormonal des individus infectés, (2) soit les femmes africaines rentrent en ménopause à un âge relativement jeune. Pour répondre à cette question, le dosage de ces 2 hormones a été envisagé dans le serum de sénégalaises âgées de 35 à 51 ans, mais non infectées par la schistosomiase. Des prélèvements (hommes et femmes de tout âge) ont déjà été récoltés à la banque de sang de St-Louis mais nous n'avons pas encore réalisé les dosages des hormones sexuelles. Néanmoins, il est reconnu qu'une infection bilharzienne est capable de déréguler la fonction hormonale de l'hôte; ceci sera discuté ultérieurement.

Un des objectifs de cette étude était d'identifier de possibles corrélations entre la présence sérique de ces hormones sexuelles et l'apparition d'une réponse immune anti-Sh28GST différente selon l'âge et le sexe des individus infectés. Nous voulions ainsi répondre à de nombreuses interrogations soulevées dans la discussion du chapitre précédent:

- une forte présence de testostérone peut-elle être associée à la production d'IFN γ spécifique observée chez les hommes (16-34 ans)?
- la progestérone et surtout l'estradiol sont-elles prépondérantes dans la mise en place de la sécrétion associée de TGF β et d'IL-10 pouvant aboutir à la production des IgA (femmes de plus de 35 ans)?

Dans ces populations, le seul moyen que nous disposions *a posteriori* était d'effectuer des corrélations statistiques entre les valeurs hormonales et les différents paramètres immunologiques (calcul individuel des coefficients de corrélation par les tests de Kendall ou Spearman). Aucune significativité statistique n'a été observée. Ceci nous est apparu peu surprenant car la présence de ces hormones apparaît extrêmement liée à l'âge de l'individu. En particulier chez les femmes de plus de 35 ans, la présence de l'estradiol et de la progestérone apparaissent très faible et ne corrèle donc pas aux fortes productions de TGF β , d'IL-10 et d'IgA observées. Ce manque de corrélation statistique ne remet pas en cause le possible rôle de ces hormones dans l'orientation de la réponse immune spécifique. En effet, la testostérone est toujours plus importante chez les hommes tandis que le taux d'estradiol et de progestérone est quoiqu'il en soit plus élevé chez les femmes. Néanmoins il nous semble intéressant et logique d'effectuer ces corrélations même si toute positivité statistique aurait été tout à fait "aléatoire" car extrêmement âge-dépendant. Ceci n'aurait en rien démontré clairement l'influence de ces hormones sur la réponse immune spécifique mais aurait probablement apporter de précieux compléments d'information. Pour répondre plus précisément à cette question, certaines expériences seront décrites dans un modèle animal (II.3.2).

Le résultat du dosage de ces 3 hormones sexuelles chez des individus infectés montrent que leur présence est majoritaire chez les adultes, classe d'âge présentant les plus faible intensité d'infection (voir Fig. II.1). Nous avons effectué des corrélations statistiques individuelles entre le taux de ces différentes hormones et l'intensité d'infection chez les hommes ou les femmes (test de Kendall et Spearman). Une corrélation négative a été établie entre la présence de testostérone ($P < 0,05$) ou celle de l'estradiol ($P < 0,05$) et l'intensité d'infection. En revanche, aucune significativité n'a été observée pour la progestérone.

Ces corrélations sont uniquement statistiques et semblent extrêmement âge-dépendant. Néanmoins, elles sont complémentaires de nombreuses données de la littérature suggérant une influence directe des hormones sexuelles dans le développement des schistosomes.

Hormones sexuelles au cours de l'infection bilharzienne:

Les relations entre hormones et schistosomiase peuvent être décrites dans les deux sens:

- Influence de l'infection sur le statut hormonal de l'individu infecté
- Effet des hormones de l'hôte sur le développement du schistosome.

Influence de l'infection sur le statut hormonal de l'hôte

Le taux des hormones sexuelles chez l'hôte infecté peut subir des variations importantes au cours de la schistosomiase. En particulier la pathologie engendrée, telle que les atteintes du tractus uro-génital dues à *S. haematobium* ou hépatique pour *S. mansoni*, induit une dérégulation hormonale importante (Wright *et al.*, 1982; El-Ridi *et al.*, 1987). Ainsi, une relation certaine existe entre cette infection et un hypogonadisme entraînant un retard dans la puberté et l'apparition d'une ménopause précoce. Notamment, il a été montré que des hommes infectés montraient des signes cliniques de déficience en testostérone (Zaki *et al.*, 1971). En effet, en plus d'anomalies anatomiques, certaines études suggèrent un dysfonctionnement du système endocrinien chez des patients atteints par différentes espèces de schistosomes (Ibrahim *et al.*, 1983).

Dans des modèles animaux, l'infection par *S. mansoni* est capable d'inhiber la capacité reproductive de l'hôte en diminuant la présence des hormones sexuelles, aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Skelly *et al.*, 1994). Des souris mâles infectées présentent des taux de testostérone plus faible que des souris saines (de Mendonça *et al.*, 2000)). Chez le rat et le hamster, une infection par *S. mansoni* induit également une diminution significative de la production de FSH et LH, indiquant que ce rôle inhibiteur sur la fonction génitale pourrait s'exercer par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Lansoud-Soukate *et al.*, 1991). L'inhibition de la sécrétion des androgènes et estrogènes au cours d'une infection murine serait également induite par la forte production de β -endorphine (Isseroff *et al.*, 1989).

Cependant il faut noter que certaines études dans des populations infectées par *S. mansoni* ne démontrent aucune influence "castatrice" de l'infection. Par exemple, des hommes infectés peuvent également présenter des taux de testostérone similaires à ceux des non-infectés (Skelly *et al.*, 1994) et aucune différence du taux d'hormones sexuelles n'a été observée entre des femmes infectées ou non (Zaki *et al.*, 1982). Malgré ces données contradictoires, probablement dues à une chronicité variable entre les différents foyers d'infection étudiés, une influence importante de l'infection sur une dérégulation du système hormonal de l'hôte est plus que probable.

Certains auteurs suggèrent que, en plus de l'effet pathologique, cette influence pourrait s'exercer via la sécrétion d'hormones par le parasite même. Les composés majoritairement sécrétés par les schistosomes sont des stérols, les ecdystéroïdes qui sont des hormones essentielles dans la métamorphose du parasite et ainsi particulièrement abondantes au stade

pulmonaire (Nirde *et al.*, 1984). Ces molécules sont retrouvées dans le sang et l'urine des hôtes parasités et il a été suggéré que ces ecdysones pourraient intervenir directement dans la dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Lansoud-Soukate *et al.*, 1991).

Les schistosomes sont également capables de produire des "hormones-like" utilisées pour leur propre développement et en particulier, des produits sécrétés par les vers mâles ont la capacité de stimuler la vitellogénèse des vers femelles (Shaw *et al.*, 1977). Ceci suggère que ces hormones parasitaires pourraient avoir également une influence paracrine sur le développement du schistosome.

Influence des hormones de l'hôte sur le développement du parasite

De nombreuses études montrent également l'influence importante des hormones de l'hôte infecté sur la survie, la croissance et la maturation sexuelle du parasite. Au cours de l'infection humaine, une résistance à l'infection semble s'acquérir après la puberté (Fulford *et al.*, 1998). Le rôle de l'immunité anti-schistosome, prépondérante chez les adultes, est bien évidemment essentiel dans cette résistance (voir Chapitre I); mais l'intervention directe des hormones de l'hôte dans le développement du parasite pourrait jouer un rôle complémentaire. En effet, le DHEA ou les hormones thyroïdiennes semblent influencer la maturité même du parasite comme il l'a été suggéré dans des modèles animaux ou chez l'homme (de Mendonça *et al.*, 2000; Knopf, 1982).

Le traitement par l'estradiol ou la testostérone est capable de réduire la charge parasitaire chez des rongeurs infectés par *S. mansoni* tandis qu'aucun effet de la progestérone n'a été observé (Barrabes *et al.*, 1980). De plus, il a été montré que des souris mâles présentaient une charge en vers adultes plus faible, donc une plus forte résistance que des femelles infectées de la même manière (Eloi-Santos *et al.*, 1992). L'administration de testostérone chez des souris femelles avant infection induit une réduction importante du nombre de vers alors qu'aucune différence dans la réponse immune spécifique n'a été observée (Nakazawa *et al.*, 1997). Ces auteurs montrent de plus que la castration des souris mâles induit une plus grande susceptibilité à l'infection. Ainsi, la testostérone pourrait jouer directement un rôle inhibiteur dans le développement du parasite sans agir sur l'orientation d'une réponse immune protectrice. Ces mêmes auteurs suggèrent ainsi l'existence chez le schistosome d'un récepteur aux hormones qui posséderait de forte homologie avec un récepteur aux androgènes.

Au cours d'une étude dans une population infectée par *S. mansoni*, une corrélation négative a été observée entre le taux de testostérone sérique et l'intensité d'infection suggérant que cette hormone pourrait jouer un rôle important dans la résistance à l'infection (Skelly *et al.*, 1994). Dans notre étude, nous détectons également une telle corrélation significative vis-à-vis de l'infection par *S. haematobium* mais nous ne pouvons pas écarter l'effet de l'âge. Chez les femmes infectées, le niveau d'estradiol corrèle négativement avec l'intensité alors que ce résultat n'est pas observé avec la progestérone.

L'ensemble de ces données indiquent donc que les hormones sexuelles pourraient jouer un rôle direct dans le développement et la maturité du parasite. Cet effet pourrait agir par une liaison de ces stéroïdes sur des homologues de récepteurs aux hormones, exprimés par le parasite comme il l'a été suggéré pour la testostérone mais également pour l'estradiol (Giannini *et al.*, 1995).

Il a été récemment décrit qu'un traitement par la testostérone semble affecté non seulement le développement du parasite *Nippostrongylus brasiliensis* chez le rat mais également la fécondité du parasite et la maturité des oeufs (Tiuria *et al.*, 1997). Une régulation négative de la progestérone sur la fécondité de *S. mansoni* a également été montrée en utilisant un test *in vitro* de ponte (Morrison *et al.*, 1986).

Ces exemples indiquent donc que les hormones sexuelles et ainsi le statut hormonal de l'hôte pourraient influencer la fécondité parasitaire. L'association entre un effet anti-fécondité et l'inhibition de l'activité enzymatique des 28GST des schistosomes étant bien documentée (voir Introduction), nous avons voulu évaluer si les hormones sexuelles pourraient avoir un rôle dans cet effet neutralisant.

II.2) Liaisons spécifiques entre les hormones sexuelles et la Sh28GST : effet sur l'activité enzymatique GST

L'inhibition de l'activité enzymatique des 28GST par les anticorps spécifiques est fortement associée à un effet anti-fécondité du parasite caractérisé par la réduction du nombre et de la qualité des oeufs pondus (Capron *et al.*, 1998). Récemment, il a été démontré que l'administration de la Sh28GST chez le singe induit cet effet sans affecter la charge parasitaire (Boulanger *et al.*, 1999). De plus, la reconnaissance par les anticorps des épitopes N (24-43) et C terminal (190-211) de la 28GST, deux séquences d'acides aminés impliquées dans le site enzymatique, pourrait être à l'origine de cette activité neutralisante (Xu *et al.*, 1993).

Des expériences d'immunohistochimie et de microscopie électronique sur les vers adultes de *S. mansoni* ont montré que la Sm28GST était fortement exprimée dans les organes génitaux des parasites mâles et femelles (Liu *et al.*, 1996). En effet, un marquage positif a été détecté dans les cellules germinales des deux sexes, les cellules vitellines des femelles et certaines cellules des testicules des mâles pouvant expliquer cette forte relation entre l'inhibition de la GST et l'effet anti-fécondité.

Il est bien décrit que les GST de mammifères sont impliquées dans le transport intra-cellulaire de nombreuses molécules, telles que les hormones (Listowsky *et al.*, 1988). Par leur forte affinité de liaison, ces GST peuvent lier des glucocorticoïdes, le DHEA ou des hormones thyroïdiennes

et ainsi influencer leur transport, leur action et leur métabolisme (Homma *et al.*, 1985). Ces GST ont aussi la capacité de se lier aux hormones sexuelles avec des affinités variables: forte pour la progestérone ($K_d < 10^{-6}$ M), modérée pour la testostérone ($10^{-6} < K_d < 10^{-4}$ M) et faible pour l'estradiol ($10^{-5} < K_d < 10^{-3}$ M). Elles pourraient donc jouer un rôle majeur dans le transport intra-cellulaire et faciliter l'action physiologique de ces stéroïdes.

Certaines hormones sexuelles sont capables d'inhiber l'activité enzymatique des GST de mammifères comme il l'a été démontré avec des dérivés de l'estradiol ou de la dehydroisoandrosterone vis-à-vis d'une GST testiculaire de rat (Aravinda *et al.*, 1995). De plus, il a été démontré chez l'homme que l'expression et l'activité enzymatique de GST de colon étaient différente en fonction du sexe (Singhal *et al.*, 1992). En particulier, l'administration de testostérone chez des souris femelles est capable d'induire l'expression d'une GST hépatique (Hatayama *et al.*, 1986) alors que l'injection de progestérone et d'estrogène chez le rat réduit l'activité GST (Hambali *et al.*, 1995). Ces résultats semblent dépendre de la sous classe α ou π des différentes enzymes mais soulignent l'importante relation entre les hormones sexuelles et les GST de mammifères.

Pour toutes ces raisons, nous avons recherché *in vitro* s'il existait une liaison spécifique entre ces stéroïdes et la protéine Sh28GST. Dans un second temps, nous avons analysé le rôle fonctionnel d'une éventuelle liaison par l'étude de l'activité enzymatique de cette GST parasitaire.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont à l'origine du manuscrit intitulé: "Specific binding of testosterone to *Schistosoma* 28GST protein inhibits the Glutathione S-transferase enzymatic activity".

II.2.1) Liaisons spécifiques entre la Sh28GST et les hormones sexuelles:

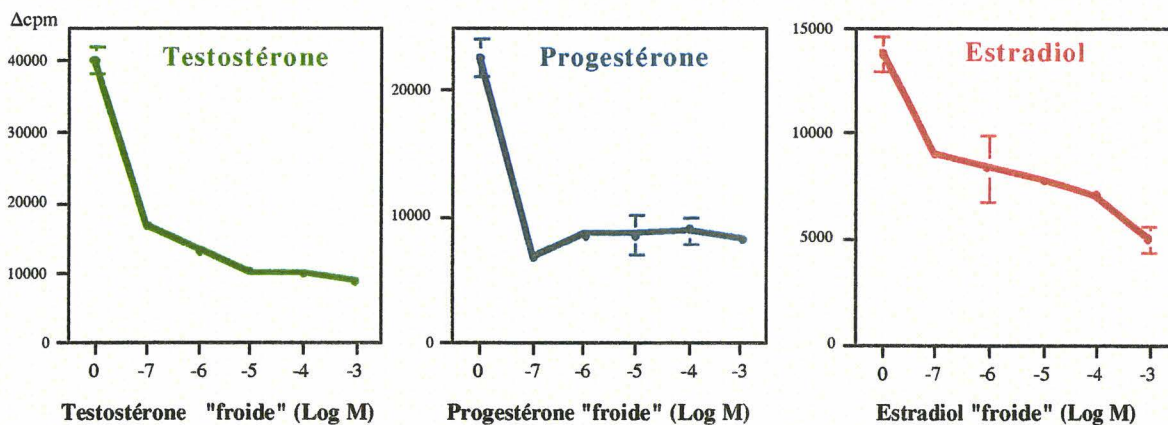
Cette étude a été réalisée par 2 méthodes différentes: l'analyse de liaison spécifique par un test de compétition en utilisant des hormones marquées à l'Iode¹²⁵ et la technologie BIACORE permettant un calcul fin de la constante d'affinité (collaboration avec les Docteurs Jean-Claude Mani et Martine Pugnière - CNRS UMR 9921 - Faculté de Pharmacie, Montpellier).

Test de compétition de liaison:

Nous avons mis au point cette technique en appliquant à notre modèle les méthodes couramment utilisées dans la recherche des liaisons récepteurs-ligands. La liaison de la testostérone, de la progestérone et de l'estradiol marquées à l'Iode¹²⁵ avec la protéine Sh28GST a été mesurée en présence de concentration d'hormones non-marquées (dit "froide") (Annexe III). Ce mélange a été ensuite incubé avec des IgG anti-Sh28GST préalablement fixées sur le plastique de tubes à

"ailette", utilisés pour la lecture de la radioactivité par un compteur γ . La quantité de radioactivité liée a été mesurée pour chaque concentration d'hormone "froide" (0 ou 10^{-7} à 10^{-3} M) et est exprimée en Δ cpm (bruit de fond sans Sh28GST soustrait). Les valeurs représentent la moyenne \pm SD de 3 expériences.

Fig. II.2 : Liaisons spécifiques entre les hormones et la Sh28GST



Pour ces trois hormones, une importante quantité de radioactivité a été observée en l'absence d'hormones non-marquées (0 M) suggérant que ces 3 hormones ont la capacité de lier la protéine Sh28GST. A cette concentration, la valeur des cpm apparait différente pour chacune de ces hormones. Cette variation ne signifie probablement pas que la testostérone (Δ cpm=40264) a la capacité de se lier plus fortement à la protéine que les deux autres hormones ($13774 < \Delta$ cpm < 22577). En effet, cette différence peut être attribuée à l'activité totale de radioactivité qui était variable selon les hormones (non montré).

En revanche, la quantité de radioactivité mesurée est fortement diminuée en présence de dose croissante d'hormones "froide" qui rentrent ainsi en compétition avec l'hormone marquée. Cette chute dose-dépendante indique que la liaison entre les hormones et la Sh28GST est spécifique mais nous pouvons observer que ce phénomène semble variable selon le type d'hormone. En effet, la compétition de liaison est observée dès l'utilisation d'une faible concentration d'hormone "froide" (10^{-7} M) pour la testostérone et la progestérone alors que cet effet ne semble pas être aussi prononcé avec l'estradiol. Pour ce dernier stéroïde, la présence d'une très forte concentration d'hormone "froide" (10^{-3} M) apparait nécessaire pour obtenir une forte compétition de liaison alors qu'un plateau est observé très rapidement pour les deux autres hormones. Malgré la présence de ce plateau, nous remarquons que la présence de 10^{-3} M d'hormones froides induit une réduction de radioactivité "liée" d'un facteur 4,5 pour la testostérone (40264 à 8934) alors que ce facteur n'est que de 2,7 pour la progestérone (22577 à 8303). Malgré l'impossibilité de calculer la constante d'affinité (K_d) par notre méthode, ces résultats semblent indiquer néanmoins l'existence d'une affinité de liaison différente entre les trois stéroïdes étudiées et la Sh28GST.

En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'affinité de liaison serait ainsi:
testostérone > progestérone > estradiol.

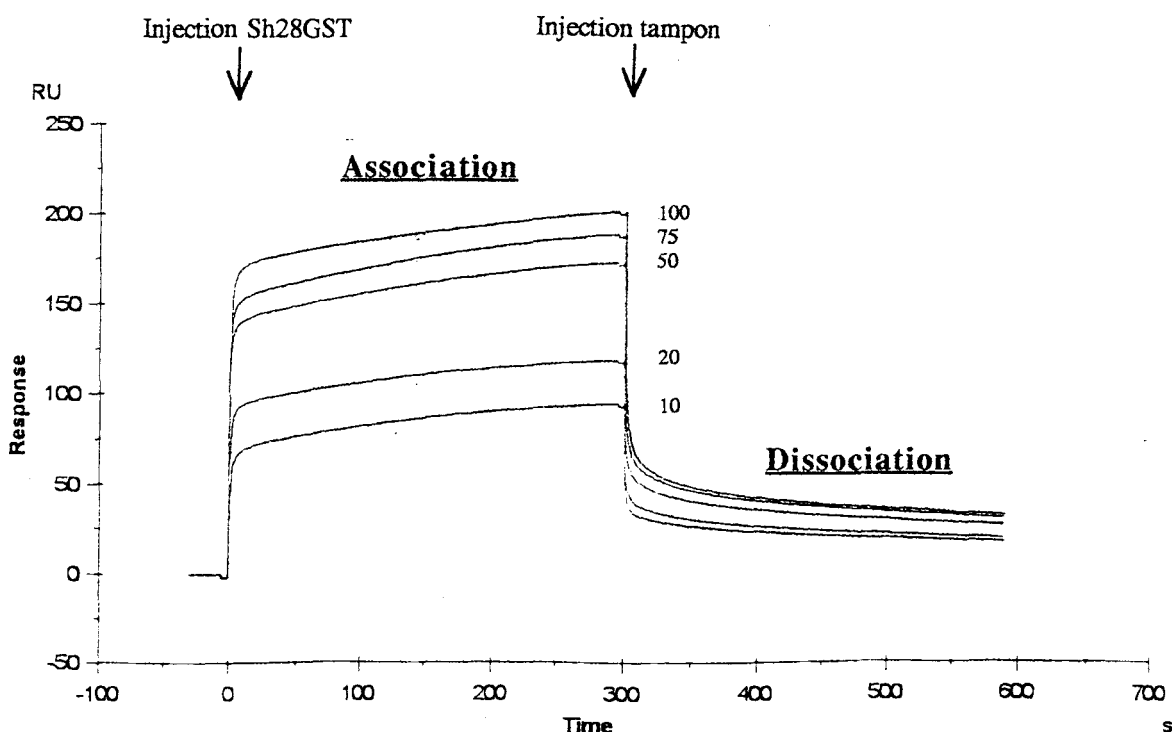
Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé la technique BIACORE qui est d'une plus grande sensibilité et qui permet également la mesure fine du K_d .

Technique BIACORE (Biacore AB, Uppsala, Suède):

Cette technique est basée sur un phénomène optique, la résonance plasmonique de surface (SPR) permettant de détecter en temps réel l'association et la dissociation des macromolécules, sans nécessité de marquage de ces molécules. Cette méthode a été utilisée pour mesurer les constantes d'association (k_a) et de dissociation (k_d) pour la liaison entre la testostérone et la Sh28GST. Malgré de nombreux essais, les expériences avec la progestérone et l'estradiol n'ont donné aucun résultat car ces deux hormones n'ont pas pu être immobiliser sur la matrice ("SA sensor chip"). En revanche, la testostérone marquée à la biotine a été déposée et s'est immobilisée sur une matrice recouverte de streptavidine (50 à 100 pg/mm²) (Annexe IV). Après saturation avec un large excès de biotine, plusieurs concentrations de Sh28GST (10, 20, 50, 75 et 100 µg/ml) ont été présentées (flux de 20 µl/min) aboutissant à une phase d'association. La phase de dissociation fait suite au flux d'une importante quantité de Tampon HBS et les sensorgrammes correspondant à la liaison sont enregistrés.

Fig. II.3 : Sensorgrammes de la liaison testostérone-Sh28GST

Les différentes phases et concentrations de Sh28GST (µg/ml) sont indiquées.



Les données cinétiques pour chaque concentration de Sh28GST ont été calculées à partir de ces sensorgrammes (logiciel BIAevaluation 3.01):

- Req: quantité de liaison observée au plateau du sensorgramme - exprimée en Unités de Résonance (RU)

- $K_d = k_d/k_a$: constante d'affinité à l'équilibre.

Comme nous pouvons le constater, l'injection de dose croissante de Sh28GST induit une quantité de RU de plus en plus élevée mais, après utilisation du logiciel, il apparaît que les constantes d'association et de dissociation restaient similaires entre ces différentes concentrations de protéine.

Les valeurs calculées sont présentées ci-dessous et correspondent aux résultats de l'expérience utilisant la Sh28GST à 10 µg/ml.

Req (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_d (M)
50	$3,28 \times 10^3$	$1,87 \times 10^{-3}$	$5,7 \times 10^{-7}$

Ces résultats confirment la spécificité de liaison entre la testostérone et la Sh28GST et cette technique BIACORE a permis de mettre en évidence une forte affinité de liaison comme l'indique la valeur très faible du K_d .

Après avoir démontré une liaison entre les hormones sexuelles étudiées et la protéine Sh28GST, nous nous sommes demandé si ces stéroïdes avaient la capacité de se lier spécifiquement aux trois épitopes majeurs de la 28GST et en particulier aux deux peptides impliqués dans le site enzymatique (aa 24-43 et 190-211).

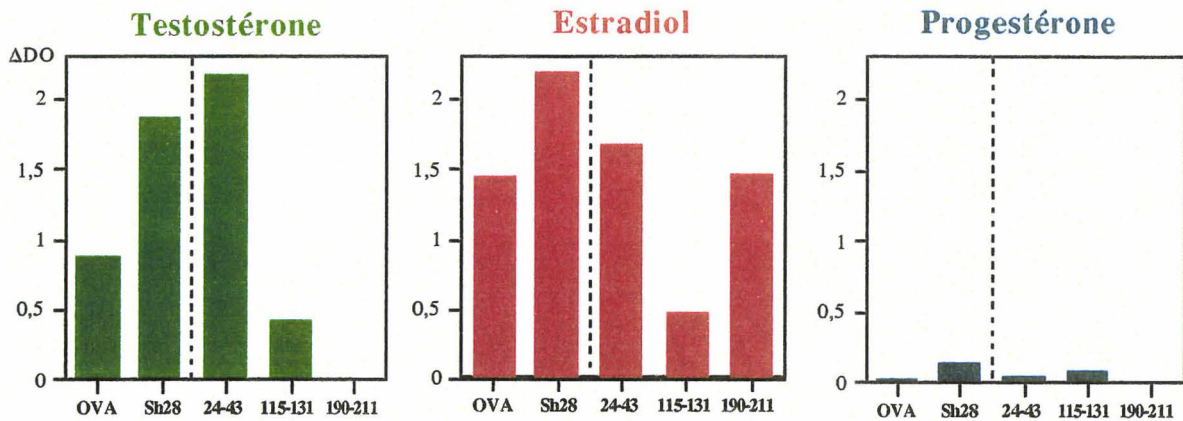
II.2.2) Liaisons entre les hormones et les peptides majeurs de la Sh28GST:

De nombreuses études montrent que les séquences d'acides aminés 24-43, 115-131 et 190-211 représentent des épitopes essentiels dans la réponse immune protectrice. En effet, la réponse immune dirigée contre le peptide 115-131 semble particulièrement impliquée dans la réduction de la charge parasitaire (Wolowczuk *et al.*, 1991) alors que les anticorps dirigés contre les deux autres épitopes ont la capacité de neutraliser l'activité enzymatique 28GST (Xu *et al.*, 1993).

La liaison entre ces peptides et les trois hormones sexuelles a donc été évaluée par une méthode ELISA utilisant les hormones marquées à la peroxydase (Annexe V). Comme témoins positifs, nous avons réalisé ces mêmes dosages avec la protéine Sh28GST mais également avec l'ovalbumine (OVA), albumine sérique connue pour leurs propriétés de forte liaison aux

stéroïdes (Listowsky *et al.*, 1988). Les résultats sont exprimés en ΔDO après avoir soustrait la valeur de DO obtenue en l'absence des protéines ou des peptides.

Fig. II.4 : Liaisons entre les hormones et les peptides de la Sh28GST

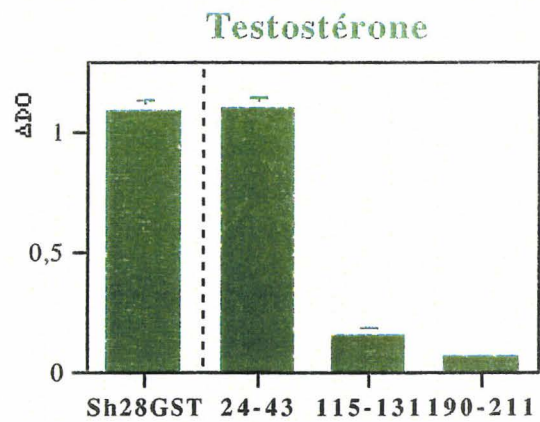


Nous mettons en évidence la liaison testostérone-Sh28GST et estradiol-Sh28GST confirmant ce que nous avons précédemment observé. Pour ces 2 stéroïdes, l'utilisation de 2 techniques différentes nous a donc permis d'obtenir les mêmes conclusions. En revanche et contrairement au résultat observé précédemment (Fig. II.2), aucune liaison spécifique n'a été détectée avec la progestérone. Notamment, nous ne retrouvons pas de liaison avec la Sh28GST en utilisant cette technique ELISA qui apparaît ainsi beaucoup moins sensible pour cette hormone que la technique du marquage radioactif.

Nous pouvons remarquer que l'estradiol a la propriété de lier fortement les peptides 24-43 et 190-211 alors que la testostérone semble lier uniquement le peptide 24-43.

Nous avons focalisé notre attention sur la liaison entre la testostérone et les trois peptides majeurs de la Sh28GST et avons testé leur affinité par la technique BIACORE pour cette hormone. Nous avons donc réalisé une seconde expérience en triplicate et les résultats, exprimés en moyenne \pm SD, sont présentés ci-dessous :

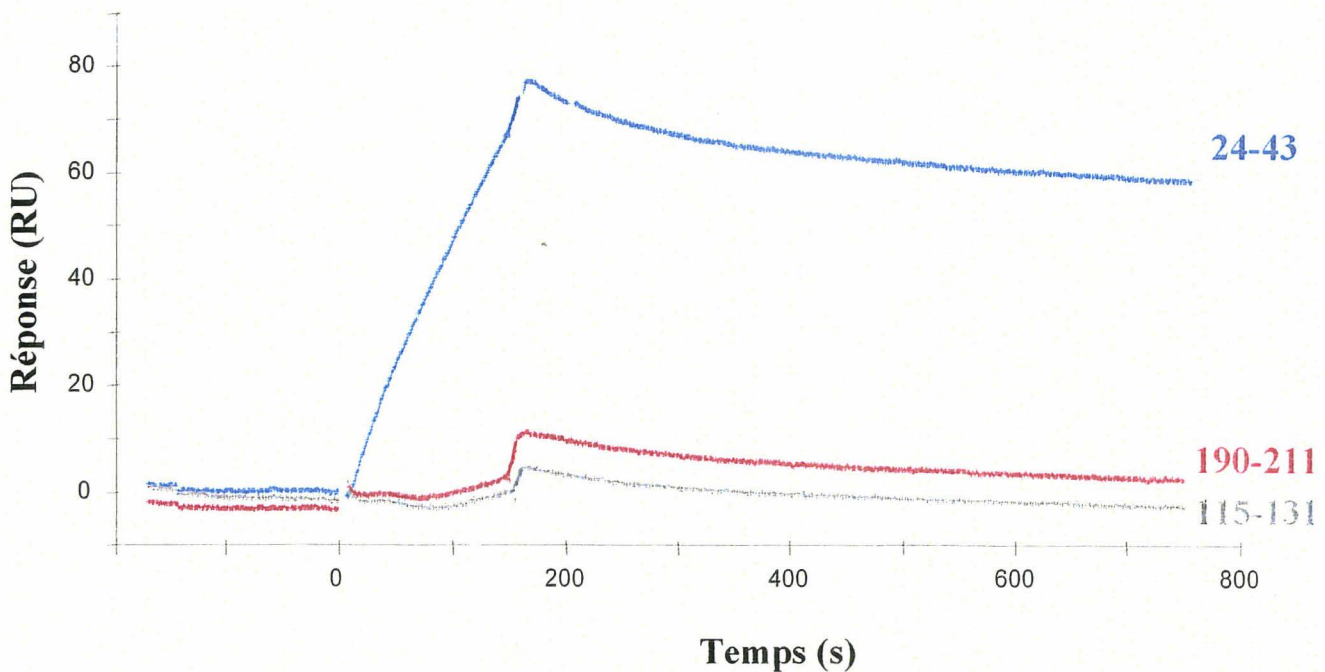
Fig. II.5 : Liaisons entre la testostérone et les peptides de la Sh28GST



Cette seconde expérience confirme la forte spécificité de liaison entre la testostérone et le peptide 24-43 avec une très bonne reproductibilité.

La technique BIACORE a également été utilisée où, cette fois-ci, les peptides 24-43, 115-131 ou 190-211 étaient injectés en flux à la concentration de 10 µg/ml. La figure ci-dessous présente les sensorgrammes obtenus après soustraction de la durée de la phase d'association par le logiciel BIAevaluation 3.01.

Fig. II.6 : Sensorgrammes des liaisons testostérone-peptides



La technique BIACORE a pu confirmer, dans notre étude, l'unique et très forte liaison entre la testostérone et le peptide 24-43 avec une réponse de 81 RU.

Les données cinétiques ont été calculées à partir de ces sensorgrammes et sont présentés dans ce tableau récapitulatif suivant:

	Analyte			
	Sh28GST	Peptide 24-43	Peptide 115-131	Peptide 190-211
RU	50	81	5	14
k_a (1/Ms)	3.28×10^3	44	nc	nc
k_d (1/s)	1.87×10^{-3}	3.25×10^{-4}	nc	nc
K_d (M)	5.7×10^{-7}	7.4×10^{-6}	nc	nc

nc: non calculable

Les Unités de Résonance (RU) calculées pour les peptides 115-131 et 190-211 sont très faibles, ce qui ne permet pas le calcul des différentes constantes (k_a , k_d). En revanche, la forte liaison entre la testostérone et le peptide 24-43 a permis de calculer une constante d'affinité relativement importante ($K_d=7,4 \times 10^{-6}$ M).

En parallèle, des expériences d'inhibition de liaison par compétition ont été réalisées en utilisant des serums et des IgG purifiés de souris immunisées par ces 3 différents peptides. Aucun résultat probant n'a été mis en évidence lié en particulier à des difficultés techniques après l'injection simultanée de ces sérums polyclonaux.

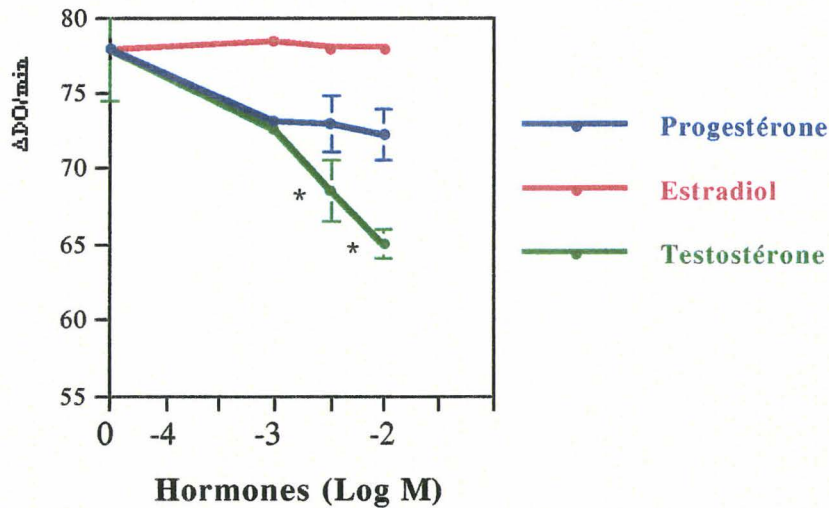
L'ensemble de ces résultats indiquent que l'estradiol et la testostérone sont capables de lier spécifiquement des peptides impliqués dans le site enzymatique de la Sh28GST. Afin d'évaluer le rôle fonctionnel de ces liaisons à l'antigène, nous avons analysé *in vitro*, l'effet de ces stéroïdes sur l'activité enzymatique de cette protéine.

II.2.3) Effet des hormones sexuelles sur l'activité enzymatique de la Sh28GST:

La réaction enzymatique, catalisée par la GST, a été effectuée en présence des substrats de l'enzyme, le 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CNDB), et le Glutathion réduit, GSH (Annexe VI).

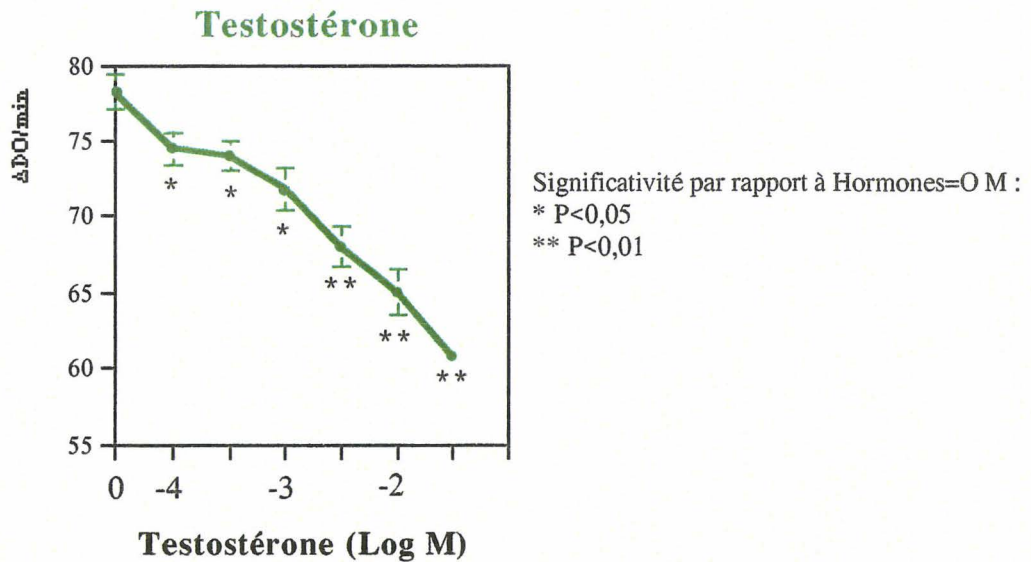
La Sh28GST (6 $\mu\text{g/ml}$ en Tp KPO_4 50 mM, pH 6.5) est incubée sur plaques 96 puits (NUNC) avec 20 μl d'hormones à différentes concentrations (0 à 10^{-2} M). L'activité enzymatique a été mesurée à 340 nm toutes les 15 s pendant 2 min. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SD (triplicate) des valeurs de $\Delta\text{OD}/\text{min}$.

Fig. II.7 : Effet des hormones sur l'activité enzymatique de la Sh28GST



Alors qu'aucun effet de l'estradiol n'a été observée, la présence de progestérone semble induire une très légère inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST mais cet effet est non significatif. En revanche, la protéine GST incubée en présence de 5×10^{-2} et 10^{-2} M de testostérone présente une activité enzymatique significativement plus faible (comparée à 0 M; test-*t* de Student).

Pour confirmer ce résultat, et afin d'étendre la gamme de concentration d'hormone utilisée, nous avons réalisé une autre expérience en présence de concentration de testostérone comprise entre 10^{-4} et 5×10^{-1} M.

Fig. II.8 : Effet de la testostérone sur l'activité enzymatique Sh28GST

Cette expérience indique qu'une concentration de 10^{-4} M de testostérone suffit pour inhiber l'activité enzymatique. En utilisant cette large gamme de concentration, nous montrons également que l'inhibition de l'activité GST par la testostérone est dose dépendante et apparait fortement significative à partir de concentrations de stéroïdes de 5×10^{-2} M.

L'ensemble de ces résultats indiquent que seule la testostérone a la capacité d'induire directement l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST. Plusieurs autres expériences ont été réalisées avec les deux autres hormones sexuelles et ont confirmé l'absence de leur capacité inhibitrice.

Les doses de testostérone utilisées dans ce test *in vitro* sont nettement supérieures à celles retrouvées *in vivo* dans le serum de mammifère (environ 10^{-8} à 10^{-7} M). Nous avons alors mesurée cette activité enzymatique GST en incubant la Sh28GST (10 μ g/ml) avec des serums de rats sains adultes des 2 sexes (n=5). L'activité apparait plus faible en présence des serums de rats mâles ($206,8 \pm 7,9$ vs $228,5 \pm 14,4$ pour les rats femelles) mais cette différence est non significative (P=0,08). Cet effet a été observé au cours de plusieurs expériences mais à chaque fois, la différence était non significative. Néanmoins, ce résultat est en faveur de l'hypothèse que la testostérone, à des doses physiologiques, pourrait agir directement sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST. D'autres expériences devront être réalisées en présence de différentes concentrations de Sh28GST mais également en utilisant des serums humains non-infectés.

II.2.4) Résumé et discussion : les liaisons Sh28GST-hormones sexuelles pourraient elles jouer un rôle dans le développement du parasite?

Les résultats du test de compétition montrent que les hormones sexuelles ont la capacité de se lier directement à la Sh28GST mais probablement avec des affinités différentes, la testostérone semblant présenter la plus grande affinité. Si, nous n'avons pas pu calculer la constante d'affinité K_d pour la progestérone et l'estradiol en utilisant la technologie BIACORE, nous montrons que seule la testostérone a la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de la Sh28GST.

Ainsi, nous avons mis en évidence une liaison de forte affinité (5×10^{-7} M) et fonctionnelle entre cette hormone et une GST parasitaire. Cette capacité de neutralisation de l'activité enzymatique pourrait être associée à une liaison unique de la testostérone avec l'un des deux peptides impliqué dans le site enzymatique, le 24-43. L'estradiol se lie directement aux deux peptides du site mais n'a aucun effet sur l'activité GST. Il semble donc que ces deux hormones sexuelles ont la capacité de lier le même peptide (24-43) mais sans générer la même conséquence enzymologique suggérant l'existence d'une différence d'affinité de liaison entre les différentes hormones sexuelles.

La taille de ces hormones sexuelles (PM environs de 300 g/mol) est évidemment très petite par rapport à celle de peptides de 20 acides aminés. L'hormone ne peut se fixer que sur une toute petite partie des peptides. La réalisation d'un "mapping" peptidique permettrait de déterminer le site exact de fixation et ainsi de définir précisément les acides aminés engagés dans la liaison avec la testostérone et impliqués dans cette inhibition enzymatique hormone-dépendante.

Les GST de mammifères ont la propriété de lier les hormones sexuelles et d'influencer ainsi leur transport et leur action (Listowsky *et al.*, 1988). Dans notre étude, nous montrons pour la première fois que ces hormones ont également la capacité de se lier à une GST de parasite. Ceci suggère que les schistosomes pourraient être sensibles au statut hormonal de l'hôte par le biais de liaisons d'hormones sexuelles à leur propre 28GST, protéine particulièrement abondante dans le tégument et le parenchyme des vers mâles et femelles (Liu *et al.*, 1996).

Les souris mâles infectées présentent une charge en vers plus faible et survivent plus longtemps que les souris femelles (Eloi-Santos *et al.*, 1992). Des souris mâles castrées sont également plus sensible à l'infection en terme de survie et l'administration précoce de testostérone au cours de l'infection induit une réduction du nombre de vers (Nakazawa *et al.*, 1997). L'effet de cette hormone interviendrait négativement dans le développement parasitaire, au niveau des schistosomules immatures. Dans notre étude, la testostérone présente une liaison de forte affinité avec la Sh28GST et pourrait donc agir négativement sur le parasite par ce biais. Le mécanisme d'action de ces hormones est encore mal connue mais pourrait intervenir par une liaison à des récepteurs nucléaires, dans le contrôle de l'expression de gènes parasitaires (de Mendonça *et al.*, 2000). Ces récepteurs nucléaires une fois activés, par la fixation de l'hormone,

se lie à des régions promotrices ou régulatrices de gènes cibles par leur HRE (Hormone Response Element), et ainsi activent ou répriment la transcription de gènes impliqués dans le développement du parasite.

Le rôle de la Sh28GST dans cette cascade d'évènement n'est qu'hypothétique mais cette protéine pourrait faciliter le transport intra-cellulaire des stéroïdes vers leur récepteur nucléaire ou jouer le rôle elle-même de récepteur nucléaire. Les expériences de microscopie électronique indiquent que la Sm28GST se localise majoritairement dans le noyau, mais également dans le cytoplasme de différentes cellules parasitaires (Liu *et al.*, 1996). Cette localisation particulière a également été démontré pour des GST de mammifères (Terrier *et al.*, 1990).

En plus d'une liaison spécifique entre les hormones sexuelles et la Sh28GST, nous montrons que la testostérone a la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de la Sh28GST, probablement par la reconnaissance spécifique du peptide 24-43. Or, l'inhibition de la GST semble fortement associée à un effet anti-fécondité sur le parasite aboutissant à la réduction de nombre d'oeufs déposés dans les tissus. Ainsi, les hormones sexuelles pourraient avoir un rôle sur le développement du parasite en inhibant directement sa capacité de féconder. Cet effet direct des stéroïdes a précédemment été observé avec l'estradiol vis-à-vis de l'activité enzymatique d'une GST testiculaire de rat (Aravinda *et al.*, 1995).

Il semble donc que la testostérone pourrait être impliquée directement dans un mécanisme anti-fécondité. Tout d'abord, la testostérone pourrait agir sur le métabolisme du parasite, en particulier sur la maturation sexuelle de la femelle qui nécessite la présence du vers mâle (Knopf, 1982). En effet, le développement efficace du système reproducteur et de la fécondité de la femelle dépend des échanges de molécules entre elle et le mâle accouplé, tels que des nutriments, neuromédiateurs ou hormones (Ribeiro-Paes *et al.*, 1997). Une importante quantité de glucose est transférée du mâle vers la femelle et apparaît nécessaire non seulement à la capacité reproductrice mais également à la survie de celle-ci (Cornford *et al.*, 1985). Les hormones thyroïdiennes de l'hôte semblent également jouer un rôle primordial dans le développement sexuel de la femelle et dans sa capacité de ponte comme il l'a été montré chez des rats thyroïdectomisés puis infectés (Knopf, 1982).

L'inhibition enzymatique de la 28GST par la testostérone pourrait jouer un rôle négatif dans ces mécanismes de transfert de métabolites entre les vers mâles et femelles. Nous pouvons imaginer d'une part que l'inhibition de cette GST chez le vers mâle, essentielle pour la détoxification du parasite, aboutirait à son dysfonctionnement métabolique. Ceci pourrait alors diminuer sa capacité de transférer les molécules essentielles au vers femelles ce qui réduirait sa fécondité. Cet effet pourrait notamment se produire pour des substances "hormone-like" sécrétées par le mâle et qui sont nécessaires à la vitellogénèse dans les femelles (Shaw *et al.*, 1977). Dans le vers femelle, la 28GST est fortement exprimée dans l'ootype, organe nécessaire au bon développement des oeufs parasitaires et en prolongement de l'utérus (Porchet *et al.*, 1994). Ces auteurs ont suggéré

que l'inhibition de l'activité enzymatique GST, provoquant la réduction de sa fonction protectrice de peroxydation anti-lipidique, pourrait induire des lésions de l'épithélium de l'ootype et par conséquent un dysfonctionnement des mécanismes de ponte.

Une étude a montré l'influence négative des hormones sur la ponte des oeufs de *S. mansoni* en utilisant, cette fois-ci, un test *in vitro* de fécondité (Morrison *et al.*, 1986). L'originalité de cette expérience était d'analyser l'influence de différents stéroïdes non pas sur le développement du vers mais directement sur leur fécondité. Seule la progestérone et ses dérivés induisaient une baisse significative de la fécondité et cet effet était associé à une réduction de la tension musculaire des parasites. En revanche, aucun effet de la testostérone et de l'estradiol dans ce mécanisme n'a pu être démontré mais les doses hormonales utilisées dans cette étude étaient faibles (10^{-4} M). Dans notre étude, une forte inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST a été observée à partir de 10^{-3} M de testostérone.

Nous venons de décrire que la capacité musculaire des parasites semble être impliquée dans les mécanismes de fécondité. L'influence de certaines hormones sexuelles sur la fécondité pourrait alors s'expliquer par leur propriété à inhiber le tonus musculaire.

Nous pouvons alors nous demander si l'inhibition de la GST par les stéroïdes et notamment par la testostérone ne pourraient pas intervenir dans ce phénomène. En effet, certaines GST semblent jouer un rôle prépondérant au niveau musculaire. Une forte présence de GST a été détectée dans les cellules musculaires de mammifères et leur activité enzymatique est augmentée au cours de la toxicité et de l'atrophie du muscle (Kondo *et al.*, 1993; Misra *et al.*, 1995). Chez la drosophile, il a été montré qu'une GST était fortement exprimée au niveau des muscles intervenant dans le vol, et qu'elle intervenait directement dans la contraction musculaire (Clayton *et al.*, 1998). En effet, cette GST interagit avec la troponine et cette association jouerait un rôle important dans la stabilité des liaisons entre les molécules de myosine. Une relation entre hormones sexuelles et GST musculaire a également été décrite où l'estradiol et la testostérone peuvent influencer l'expression d'une GST présente dans les cellules de muscle lisse chez le hamster (Hudson *et al.*, 1999).

Chez le schistosome adulte, la Sm28GST est fortement exprimée non seulement dans le tégument mais également dans des cellules musculaires du parenchyme et les muscles associés aux organes reproducteurs (Liu *et al.*, 1996). Ceci suggère que la présence de la 28GST serait associée au phénomène de contraction musculaire du parasite. Il est ainsi envisageable que l'inhibition de son activité enzymatique entraîne un dysfonctionnement musculaire induisant la réduction de la fécondité. Chez la femelle, les contractions musculaires au niveau de l'ootype, organe où la 28GST est exprimée (Porchet *et al.*, 1994), semblent intervenir dans les mécanismes de formation de l'oeuf (Basch *et al.*, 1991). Mais, le mécanisme d'inhibition de la 28GST pourrait se produire également directement sur le vers mâle qui, de part un défaut dans sa capacité musculaire, présenterait une dérégulation métabolique. Le mâle perdrait ainsi la capacité de transférer des substances nécessaires à la fécondation de la femelle.

Nous pouvons supposer que l'influence de la testostérone sur l'activité GST pourrait ainsi agir à deux niveaux: sur le métabolisme et/ou sur la tension musculaire du parasite. Pour ces deux actions, la conséquence serait la même : la réduction de la fécondité par une action directe des stéroïdes sur le schistosome par le biais de leur liaison spécifique avec la 28GST.

Dans ce chapitre, nous avons suggéré que les hormones sexuelles pourraient jouer un rôle indépendant de l'immunité spécifique dans l'acquisition d'une protection contre la schistosomiase. Dans les populations humaines infectées, la présence des oeufs excrétés diminue fortement avec l'âge et apparaît très faible chez l'adulte alors que l'infection par le parasite est fortement présente (Agnew *et al.*, 1996). Ainsi, les adultes semblent présenter un "effet anti-fécondité" naturellement acquis au cours de l'infection et ceci est particulièrement le cas pour *S. haematobium*.

Dans la première partie de ce chapitre, nous montrons que la présence des hormones sexuelles est maximale chez les adultes présentant une faible intensité d'infection. Ces stéroïdes pourraient ainsi jouer un rôle important dans ce mécanisme d'anti-fécondité, soit directement sur le parasite par leur liaison avec la 28GST, soit indirectement en orientant la réponse immune spécifique à la Sh28GST comme nous l'avons suggéré dans le chapitre I.

Suite à l'observation d'une réponse immune spécifique sexe-dépendante chez les individus infectés, nous nous sommes demandé si cet effet pouvait être retrouvé après des immunisations avec la Sh28GST. Des expériences ont alors été réalisées chez des souris mâles et femelles afin d'évaluer non seulement l'influence du sexe mais également des hormones sexuelles sur l'orientation de la réponse immune anti-Sh28GST.

II.3) Réponse immune anti-Sh28GST induite après immunisation chez la souris : effet du sexe et régulation par l'estradiol

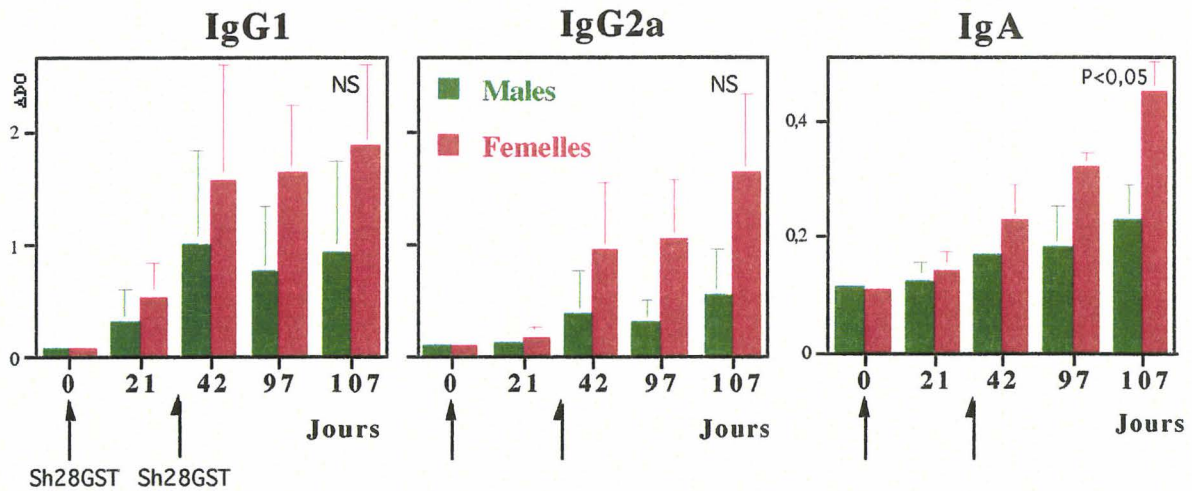
L'objectif premier de cette étude était d'analyser la cinétique de la réponse anticorps spécifique induite après immunisation par la Sh28GST de souris mâles et femelles (n=5 pour les 2 sexes). Dans un souci de comparaison, nous avons réalisé un protocole de vaccination identique à celui adopté pour les essais cliniques "Bilhvax" de Phase Ia chez l'homme. Pour cela, 2 administrations sous-cutanées de rSh28GST à 28 jours d'intervalles ont été effectuées en présence d'hydroxide d'alumine (alun) comme adjuvant. La Sh28GST utilisée était la protéine recombinante fabriquée par la société Eurogentec, utilisée pour l'administration chez l'homme (voir Introduction chap. IV).

L'administration de deux doses différentes a été réalisée chez des souris OF1 non-syngéniques: 4 µg/kg (environ 80 ng/souris) correspondant à une dose intermédiaire de celles administrées chez l'homme (100 ou 300 µg) ou 40 µg/kg correspondant à la dose la plus faible utilisée dans les expériences de toxicologie chez le rat (voir Introduction chap. IV.4.5)

Des saignées rétro-orbitales ont été réalisées et la réponse isotypique spécifique à la Sh28GST a été évaluée par une technique ELISA (Annexe VII).

II.3.1) Profil de la réponse anticorps anti-Sh28GST en fonction du sexe:

Nous avons dosé la présence des IgG1 et IgG2a, marqueurs isotypiques des profils de type Th2 et Th1 respectivement chez la souris, mais également de l'isotype IgA, essentiel dans la réponse immune anti-28GST et sexe-dépendante dans les populations humaines infectées (résultats chapitre I.3). Comme nous avons détecté une relative hétérogénéité entre les souris du même groupe, les données ne sont pas présentées en titre mais en DO obtenue pour une dilution du serum au 1/450 pour les IgG1 et IgG2a et au 1/40 pour les IgA. Les résultats sont exprimés pour chaque groupe en moyenne \pm SD des Δ DO (DO des souris saines soustraites pour chaque temps).

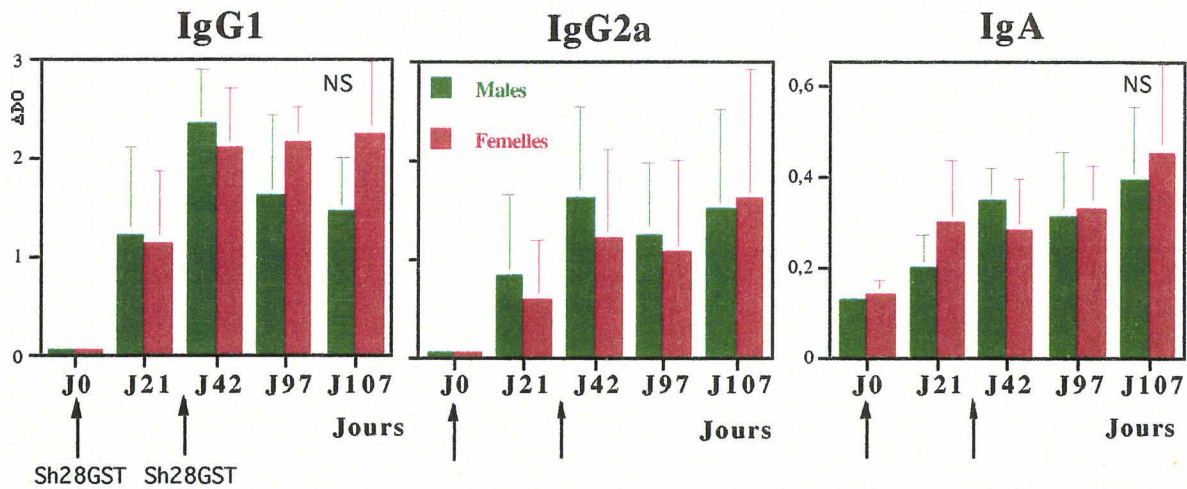
Fig. II.9 : Réponse anticorps anti-Sh28GST : faible dose (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

La réponse IgG1 spécifique apparaît dès la première administration (J21) et semble atteindre un plateau à partir de J42. En revanche, l'apparition des IgG2a est plus tardive et plus faible, en particulier pour les souris mâles. Ces 2 réponses isotypiques semblent plus fortes chez les femelles mais aucune différence significative n'a été détectée entre les deux sexes. A l'inverse de ces 2 isotypes (serum dilué au 1/450), la réponse IgA spécifique est faible (serum dilué au 1/40), n'apparaît pas chez les mâles alors qu'elle augmente avec le temps pour les souris femelles. Tardivement après l'immunisation (J107), une différence significative a été observée entre les deux sexes (test-*t* de Student).

Nous avons donc montré qu'une très faible dose de Sh28GST adjuvantée en Alum (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 80 ng/souris) était capable d'induire une réponse immunitaire précoce, relativement importante et appartenant à un profil mixte avec une présence d'IgG1 et d'IgG2a. La forte présence d'IgG2a chez les femelles nous apparaît surprenante car l'hydroxyde d'alumine est habituellement reconnu pour induire un profil de type Th2 (Comoy *et al.*, 1997). Cette très faible dose protéique a induit également la présence de l'isotype IgA chez les femelles soulignant la maturité déjà avancée de la réponse immune induite. Le principal résultat de cette expérience est néanmoins l'observation que la réponse spécifique est clairement sexe-dépendante et en particulier pour l'isotype IgA. Les isotypes IgG1 et IgG2a semblent majoritaires chez les femelles mais une forte hétérogénéité entre les souris explique que cette différence soit non significative.

Nous avons évalué si la quantité de Sh28GST administrée pouvait avoir une influence sur cette réponse anti-Sh28GST.

Fig. II.10 : Réponse anticorps anti-Sh28GST : forte dose (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)



L'administration d'une dose 10 fois plus élevée (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 800 ng/souris) n'a pas induit le même profil de réponse en fonction du temps et du sexe. En effet, les réponses IgG1 et IgG2a apparaissent plus précoces et plus importantes dès la première administration (J21) et aucune différence n'est observée entre les souris mâles et femelles. Cet effet apparaît encore plus marqué pour la réponse IgA car l'administration de cette forte dose a induit la production de cet isotype chez les mâles, contrairement à ce que nous avons observé avec la dose 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ainsi, l'utilisation d'une quantité 10 fois supérieure de Sh28GST semble inhiber l'effet du sexe sur la réponse spécifique que nous avons observée avec la faible dose.

Nous avons donc montré par ces deux expériences que l'administration de la Sh28GST en alum induit une réponse spécifique sexe-dépendante, mais uniquement en utilisant une faible dose. La réponse IgA anti-Sh28GST apparaît supérieure chez les femelles et suggère que les hormones sexuelles pourraient jouer un rôle également dans l'orientation de l'immunité spécifique induite après vaccination. Comme nous l'avons exposé dans la discussion du chapitre I, l'estradiol semble intervenir spécifiquement dans l'induction de l'isotype IgA, probablement en augmentant la production d'IL-10 et de TGF β . Pour cette raison, nous avons focalisé notre attention sur ce stéroïde et nous avons évalué son influence sur la réponse anticorps anti-Sh28GST chez les mêmes souris immunisées.

II.3.2) Effet *in vivo* de l'estradiol sur la réponse IgA anti-Sh28GST:

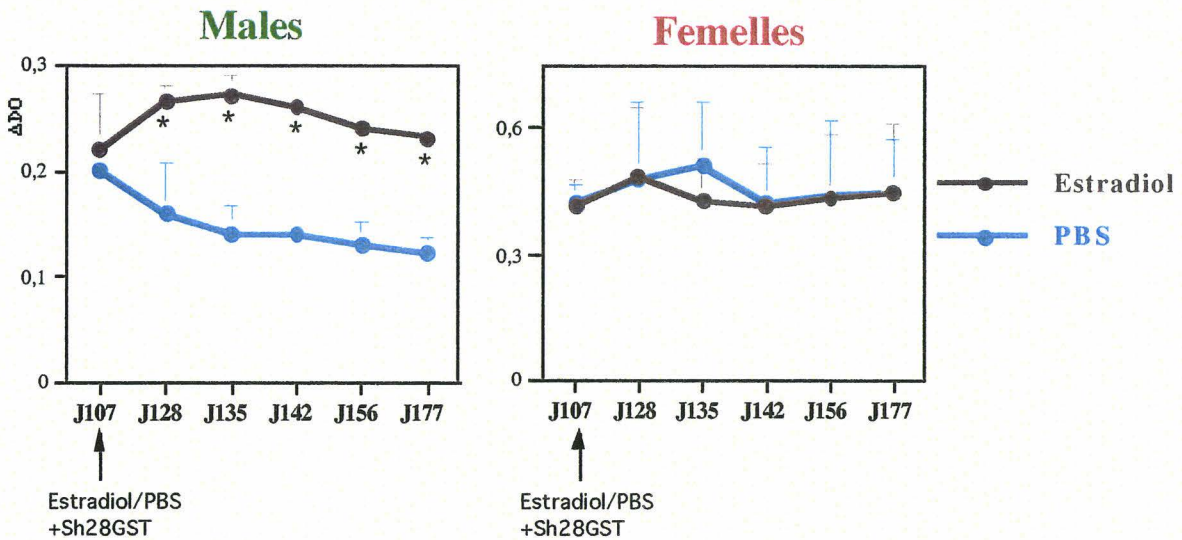
Les souris mâles et femelles préalablement utilisées ont été partagées en 2 groupes à J107:

- un groupe (n=3) recevant par voie sous-cutanée une dose de 10 μg d'estradiol diluée dans du PBS (0,2 ml)
- un groupe (n=2) ne recevant que du PBS dans les mêmes conditions.

Ces administrations ont été réalisées pendant 3 jours consécutifs (J107 à J109) puis le lendemain (J110), la Sh28GST en alum a été administrée chez toutes les souris (dose de 4 ou 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dépendante du groupe de départ à J0). Cette nouvelle administration de la Sh28GST a été effectuée pour visualiser le possible effet de l'estradiol sur la réponse rappel à l'antigène. Les souris à J107 présentaient une réponse IgA similaire entre les 2 groupes (estradiol ou PBS) avant les administrations de l'estradiol.

La possible influence de l'estradiol sur les autres réponses isotypiques ne sera pas montré car des différences importantes étaient observées à J107 entre ces 2 groupes. Il en est de même pour les souris de la dose 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et par conséquent, les résultats présentés ci-dessous concernent les souris mâles et femelles immunisées avec la faible dose de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Sh28GST.

Fig. II.11 : Effet de l'administration d'estradiol (faible dose - 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)



L'administration de l'estradiol chez les souris mâles induit une légère augmentation de la réponse IgA anti-Sh28GST entre J107 et J128 puis cette réponse spécifique se stabilise pendant près de 50 jours. L'injection de PBS chez les autres souris mâles n'a eu aucun effet et la présence de cet isotype décroît "naturellement" avec le temps. Chez les mâles, la réponse IgA est significativement supérieure chez les souris dérégulées par l'estradiol (test-*t* de Student).

Pour les isotypes IgG1 et IgG2a, aucune différence n'a été observé entre les deux sexes (non montré). Chez les souris femelles, aucune différence de la réponse IgA n'est observée entre les groupes traités et non-traités par l'estradiol.

Ces expériences sont préliminaires et devront être confirmées en utilisant des groupes composés d'un plus grand nombre de souris et en injectant à différents temps des doses plus ou moins importantes d'estradiol. L'administration d'autres hormones sexuelles devra également être envisagée comme nous le développerons ultérieurement dans le chapitre "Discussion et perspectives". Néanmoins, cette première expérience montre que l'administration d'une hormone stéroïde peut réguler *in vivo* une réponse immune spécifique préalablement induite par la vaccination.

II.4) **Discussion : hormones sexuelles et Sh28GST**

Au cours de ce chapitre, nous avons montré une relation non seulement directe entre les hormones sexuelles et la Sh28GST mais également indirecte entre ces stéroïdes et la réponse immune anti-Sh28GST. Afin de relier ces observations avec les données obtenues dans les populations humaines, nous avons réalisé le dosage de ces stéroïdes dans les sérums des individus infectés. Une présence majoritaire a été observée chez les adultes, population qui présente l'intensité d'infection (évaluée par le nombre d'oeufs) la plus faible malgré leur forte exposition au parasite. Comme il l'a été décrit au cours de l'infection par *S. haematobium* (Agnew *et al.*, 1996), un effet anti-fécondité semble présent chez ces adultes et nous suggérons que la relation entre hormones sexuelles et Sh28GST pourrait y jouer un rôle suivant deux hypothèses.

Tout d'abord, ces stéroïdes interviendraient directement par leur capacité de liaison à la Sh28GST, provoquant l'inhibition de son activité enzymatique. D'autre part, ces stéroïdes pourraient agir de manière complémentaire en orientant la réponse immune spécifique à la Sh28GST vers une réponse capable de neutraliser l'activité GST. Nos résultats préliminaires semblent indiquer effectivement que l'estradiol peut influencer positivement la réponse IgA spécifique, isotype associé à un effet anti-fécondité (Grzych *et al.*, 1991).

Nous montrons également que l'immunisation de souris mâles ou femelles par la Sh28GST (faible dose, 4 µg/kg) induit une réponse anticorps sexe-dépendante dont le profil isotypique partage des similarités avec celui observé chez les individus infectés. En effet, la réponse IgA apparaît dans les deux cas prépondérante dans la population féminine. La vaccination par la Sh28GST, évaluée chez l'animal, pourrait induire une réponse similaire à celle engendrée au cours de l'infection des populations humaines. Ainsi, la vaccination serait capable d'induire, en quelques jours, une réponse immune de type "protectrice" qui ne s'acquière naturellement qu'au cours de nombreuses années d'infection.

L'immunisation des souris avec une dose 10 fois supérieure (40 µg/kg) semble inhiber l'effet du sexe. Ceci peut également se rapprocher des observations dans les populations humaines où nous pouvons penser que les individus sont exposés naturellement à de très faible quantité de Sh28GST. La stimulation du système immunitaire par une plus forte quantité d'antigène spécifique pourrait alors anihiler l'effet du sexe. Nous aborderons ce problème dans le chapitre IV, présentant l'effet du traitement par le praziquantel sur la réponse immune des hommes et des femmes infectés.

Mais cette comparaison entre les réponses immunes obtenues après vaccination chez la souris et observées au cours de l'infection humaine ne peut être faite que pour la population féminine. En effet, aucune similarité n'a été observée avec les souris mâles. Malgré l'incertitude que l'isotype

IgG3 joue le même rôle ou soit régulé de la même manière entre la souris et l'homme, nous n'avons pas pu mettre en évidence de type de réponse anti-Sh28GST chez l'animal (non montré).

Les hormones sexuelles pourraient ainsi jouer un rôle prépondérant dans l'effet anti-fécondité, par une action directe sur la Sh28GST parasitaire, et également indirecte en régulant la réponse immune spécifique. Cette action complémentaire aurait comme conséquence l'inhibition de l'activité enzymatique de la 28GST.

Nous avons voulu évaluer indirectement l'influence de ces hormones sur la réponse immune spécifique neutralisant l'activité enzymatique 28GST. Le chapitre III présente ainsi les relations entre l'immunité spécifique développée dans les populations humaines infectées et l'inhibition de l'activité GST, en fonction du sexe.

III) Réponses IgG3 et IgA spécifiques aux 28GST : rôle dans l'immunité protectrice?

Au cours de l'infection par *S. haematobium*, les IgG3 et IgA sont les isotypes majoritairement dirigés contre la Sh28GST et leurs présences dépendent du sexe et de l'âge des individus infectés (Chapitre I). La réponse immune spécifique contre la 28GST a de plus la capacité d'inhiber son activité enzymatique et ainsi de participer activement à la protection via un effet anti-fécondité. De plus, une forte homologie de séquences existe entre les 28GST des différentes espèces de schistosomes. Ainsi, l'administration de la Sm28GST permet de protéger des singes infectés par *S. haematobium* (Boulanger et al., 1995). De même, les anticorps IgG3 et IgA présents chez des individus infectés par *S. haematobium* et spécifiques de la Sh28GST reconnaissent également la Sm28GST (voir I.5).

Pour toutes ces raisons, nous avons analysé la réponse anticorps anti-Sm28GST en fonction du sexe des individus infectés par *S. mansoni*. Tout d'abord nous avons voulu évalué si la réponse immune dirigée contre la Sm28GST était également sexe-dépendante chez des individus infectés par *S. mansoni*. Dans un second temps, nous nous sommes demandés si les réponses IgG3 et IgA spécifiques pouvaient jouer un rôle prépondérant dans l'immunité protectrice anti-bilharzienne. Dans le but d'identifier son rôle dans l'immunité protectrice acquise naturellement, les résultats seront présentés, non plus en fonction de l'âge, mais en fonction de l'intensité d'infection. Le second critère pour évaluer la fonction protectrice de cette réponse spécifique a été de mesurer la capacité des sérums à inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST.

III.1) Population étudiée et résultats parasitologiques:

Cette étude a été réalisée en 1995 dans le village de Guidakhar situé au bord du Fleuve Sénégal, à 10 km de Richard-Toll. Ce foyer était récent et endémique pour *S. mansoni* (environ 10 ans) et aucune différence de prévalence et d'histoire d'exposition n'a été observée en fonction de l'âge et du sexe (Marguerite *et al.*, 1999). L'intensité d'infection a été évaluée par la technique du Kato-Katz et les résultats sont exprimés par la moyenne géométrique du nombre d'oeufs par gramme de selles (EPG) à partir de 5 examens. Pour l'étude épidémiologique, la cohorte était composé de 155 individus infectés par *S. mansoni*, répartis en 4 classes d'âges comprenant un nombre équivalent d'hommes ($n=19\pm 2$) et de femmes ($n=20\pm 1$): 12-15, 16-23, 24-34 et ≥ 35 ans.

Les résultats parasitologiques indiquaient que l'intensité d'infection était significativement supérieure chez les hommes (moyenne EPG=732; valeurs individuelles de 12 à 6484) que chez

les femmes (moyenne EPG=180; de 4 à 3936) ($P < 0,01$, test de Mann-Withney). Pour l'analyse de la réponse immune en fonction de l'intensité d'infection, nous avons classé la cohorte en deux groupes : faible ou forte intensité. Compte tenu de la forte différence des résultats parasitologiques en fonction du sexe, la valeur de séparation entre ces deux groupes d'infection ne pouvait être identique entre les hommes et les femmes. La moyenne géométrique des EPG a donc été la valeur choisie pour séparer les groupes de forte ou faible infection : respectivement, $>$ ou < 732 pour les hommes et $>$ ou < 180 pour les femmes. Cette délimitation est en accord avec les classements recommandés par l'O.M.S. (WHO/SRT n°830).

Des prélèvements sanguins ont été réalisés puis tous les individus infectés dans le village ont été traités par le praziquantel (40 mg/kg). Comme conseillé par l'O.M.S., les femmes enceintes ou en période d'allaitement n'ont pas participé à cette étude.

III.2) Réponse anticorps anti-Sm28GST : variation en fonction du sexe et de l'intensité d'infection.

La présence des anticorps spécifiques à la Sm28GST a été évaluée par ELISA (Annexe I). Les résultats sont présentés individuellement et/ou en moyenne arithmétique en fonction des 4 groupes décrits plus haut et sont exprimés en $\Delta DO = OD_x - OD_n$. OD_x représente la valeur de DO pour un individu infecté et OD_n , la moyenne des valeurs obtenues pour 30 sérums contrôles de caucasiens. Chaque OD_n est donc différente entre chaque test isotypique et sa soustraction permet ainsi d'éliminer le bruit de fond non-spécifique pour chaque isotype.

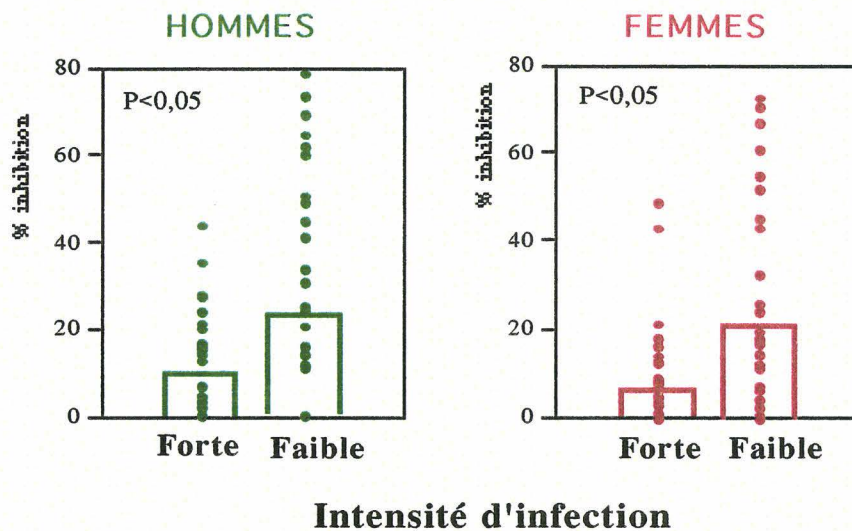
Tout d'abord, nous avons évalué le niveau des anticorps totaux dirigés contre la Sm28GST (Ig(H+L)) en fonction de l'intensité d'infection des hommes et des femmes (moyenne \pm SD des ΔDO).

Intensité d'infection (EPG)	HOMMES		FEMMES	
	Forte (>732)	Faible (<732)	Forte (>180)	Faible (<180)
n	40	36	43	36
Age moyen	26 (12-66)	31 (12-72)	23 (12-61)	30 (12-58)
Ig(H+L) anti-Sm28GST	1,03 \pm 0,60	1,07 \pm 0,66	0,97 \pm 0,49	0,86 \pm 0,48
valeur P (Mann-Withney)	0,323 (NS)		0,204 (NS)	

Comme l'indique ce tableau, aucune différence dans la réponse Ig totale contre la Sm28GST n'a été observée entre les 2 groupes d'intensité d'infection, aussi bien chez les hommes que chez les femmes.

Dans un second temps, nous avons évalué la capacité des sérums à inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST en fonction de l'intensité d'infection et du sexe (Fig. III.1). Ce test *in vitro* consiste à mesurer l'activité enzymatique de la Sm28GST (à 4 µg/ml) en présence de 20 µl de sérum d'un individu infecté (Annexe VIII). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition qui est calculé en comparant l'activité GST d'un sérum infecté avec celle mesurée dans 30 sérums de caucasiens non-infectés. Les résultats représentent la moyenne et la valeur individuelle du pourcentage d'inhibition dans chaque groupe.

Fig. III.1 : Inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST en fonction de l'intensité d'infection

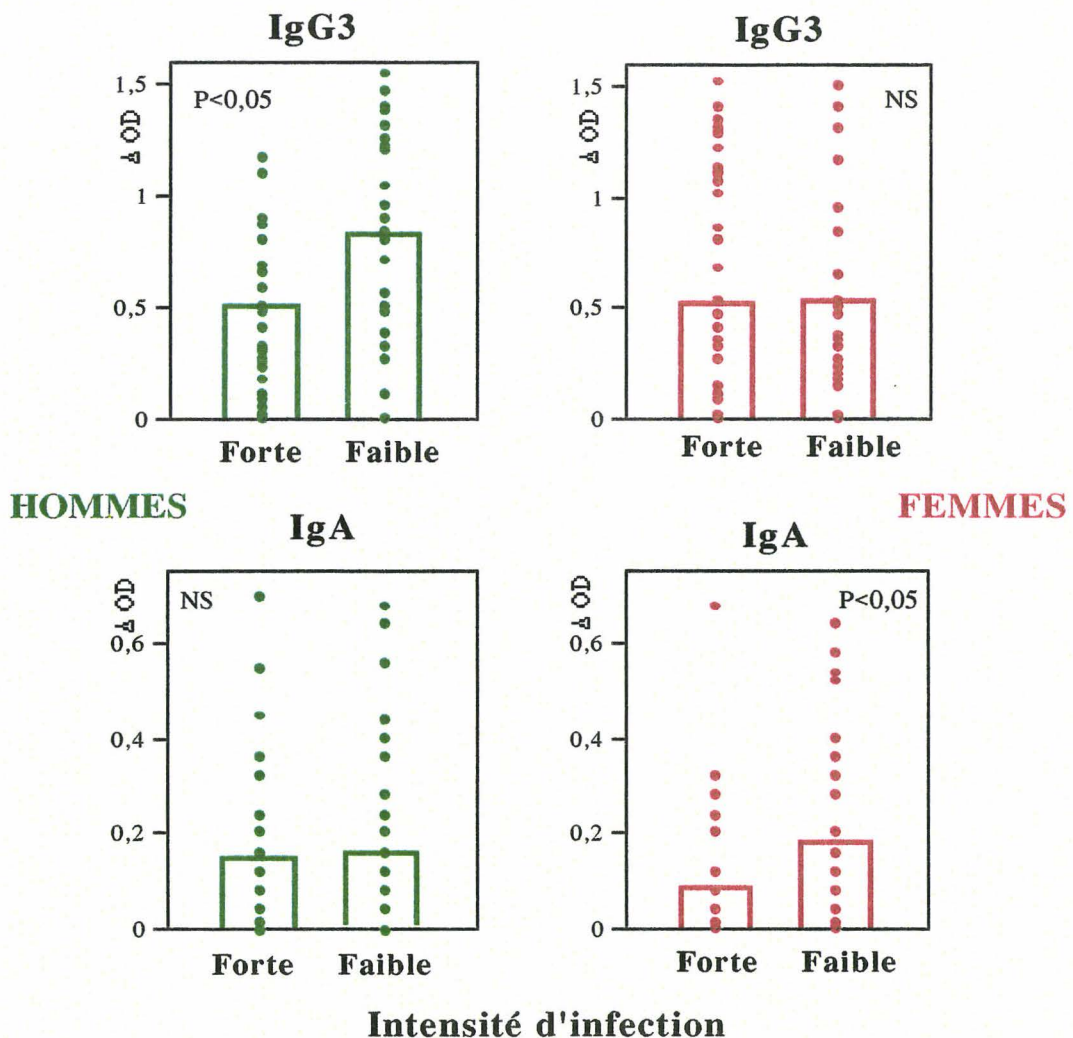


Contrairement à la réponse totale anti-Sm28GST, la capacité des sérums à neutraliser l'activité GST est différente en fonction de l'intensité d'infection que ce soit chez les hommes ou les femmes. En effet, la moyenne est significativement supérieure dans les groupes présentant une faible intensité d'infection comparativement aux groupes à forte intensité. Cet effet n'apparaît pas différent entre les hommes et les femmes et semble indiquer l'importance de l'inhibition de l'activité 28GST dans l'effet anti-fécondité pour les 2 sexes.

L'intensité d'infection est mesurée ici par le nombre d'oeufs présents, ce qui ne reflète pas la charge parasitaire. Il aurait été intéressant ainsi de doser la présence des antigènes circulants (CAA) afin d'évaluer si les deux groupes d'intensité différente en oeufs ne présentaient pas une charge parasitaire similaire. Néanmoins, des données épidémiologiques dans ce foyer indiquant que la prévalence et l'histoire d'exposition sont similaires en fonction de l'âge et du sexe

(Stelma *et al.*, 1993). Alors que la réponse anticorps totale anti-Sm28GST est identique entre les groupes d'intensité, l'inhibition enzymatique est elle prépondérante dans les groupes présentant un faible nombre d'oeufs. Ceci pourrait indiquer l'existence d'un effet anti-fécondité lié à cette inhibition dans les populations exposées. Un profil isotypique anti-28GST particulier pourrait donc jouer un rôle prépondérant dans la protection "naturelle" alors que la réponse spécifique totale est identique entre les 2 groupes d'intensité. Nous avons ainsi évalué les réponses IgG3 et IgA spécifiques à la Sm28GST en fonction des mêmes groupes d'intensité d'infection (Fig. III.2).

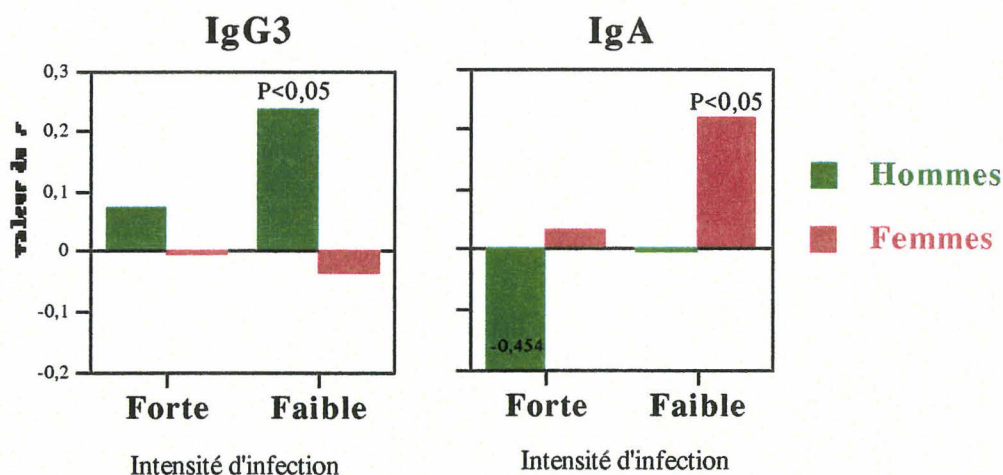
Fig. III.2 : IgG3 et IgA anti-Sm28GST en fonction de l'intensité d'infection



Tandis qu'aucune différence dans la réponse IgG3 n'a été observée chez les femmes entre les 2 groupes, elle est significativement plus élevée chez les hommes présentant une faible intensité d'infection. La réponse IgA, quant à elle, est prépondérante chez les femmes dans le groupe de faible infection. La réponse IgE, autre isotype majoritaire vis-à-vis de la Sh28GST (voir I.2), a également été analysée mais aucune différence statistique entre les groupes n'a été mise en évidence.

Nous avons voulu évaluer ensuite si ces réponses IgG3 et IgA spécifiques pouvaient intervenir directement dans l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST. Le test statistique de Kendall a été utilisé pour définir les corrélations individuelles entre la présence de ces réponses spécifiques et l'activité neutralisante. La valeur r du coefficient de corrélation est indiquée ainsi que la significativité statistique.

Fig. III.3 : Corrélations entre réponses IgG3 et IgA et inhibition enzymatique



Une corrélation positive et significative est mise en évidence, pour les hommes du groupe de faible infection, entre la réponse IgG3 anti-Sm28GST et le pourcentage d'inhibition de l'activité Sm28GST. Chez les femmes faiblement infectées, l'apparition de l'inhibition enzymatique est quant à elle positivement corrélée avec la présence des IgA spécifiques.

Chez les hommes, nous montrons ainsi que la réponse IgG3 est non seulement majoritaire mais également corrélée avec l'inhibition de l'activité Sm28GST dans le groupe de faible infection.

Aucune corrélation positive n'a été détectée dans le groupe de forte intensité et ceci pour les deux sexes.

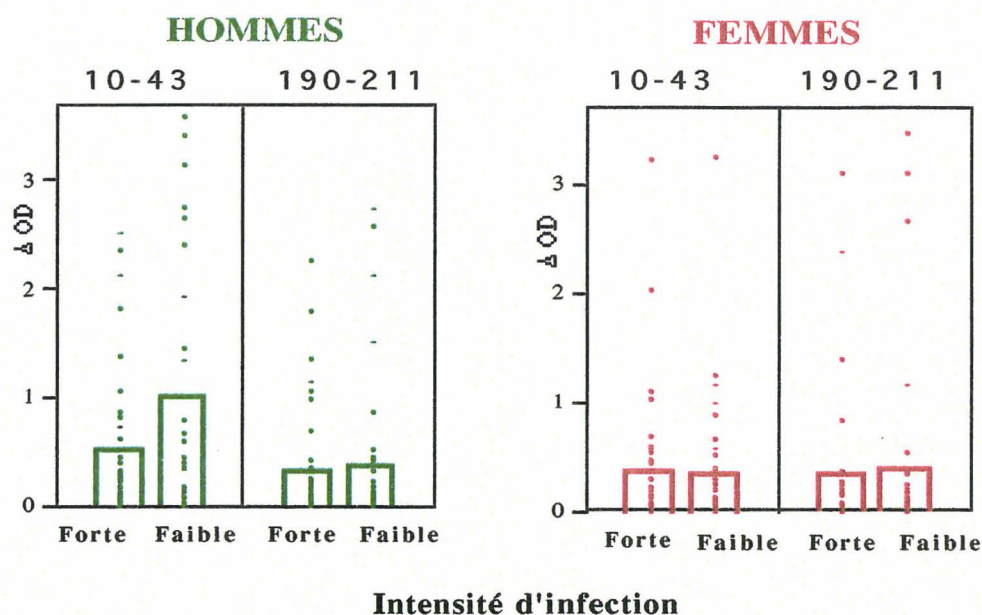
La significativité des ces corrélations a été confirmée par une analyse multivariée dans laquelle l'inhibition de la Sm28GST représentait la variable dépendante et les taux d'anticorps spécifiques, les variables indépendantes (non montré).

III.3) Réponses IgG3 et IgA dirigées contre les peptides N et C terminaux impliqués dans le site enzymatique de la Sm28GST:

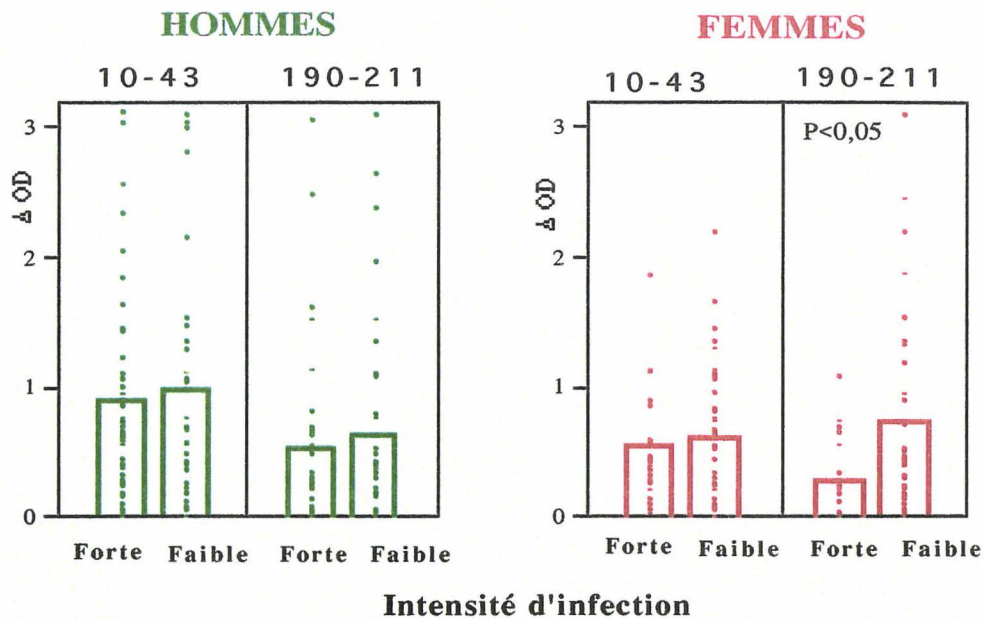
Comme nous l'avons présenté dans les chapitres précédents, la capacité des anticorps spécifiques à inhiber l'activité de la GST dépend de la reconnaissance des épitopes N (10-43) et C (190-211) terminaux composant le site enzymatique des 28GST. Cet effet a été démontré

dans de nombreuses expériences chez l'animal mais peu de résultats sont connus chez l'homme infecté. Nous avons donc évalué les réponses IgG3 et IgA spécifiquement dirigées contre les peptides 10-43 et 190-211 en fonction de l'intensité d'infection et du sexe. Ces séquences d'acides aminés sont dérivés de la structure primaire de la Sm28GST et ont été synthétisées par le groupe du Prof. A. Tartar (Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille). Les résultats sont exprimés individuellement et en moyenne pour chaque groupe précédemment décrit (Fig. III.4 et III.5).

Fig. III.4 : Réponses IgG3 spécifiques des peptides 10-43 et 190-211

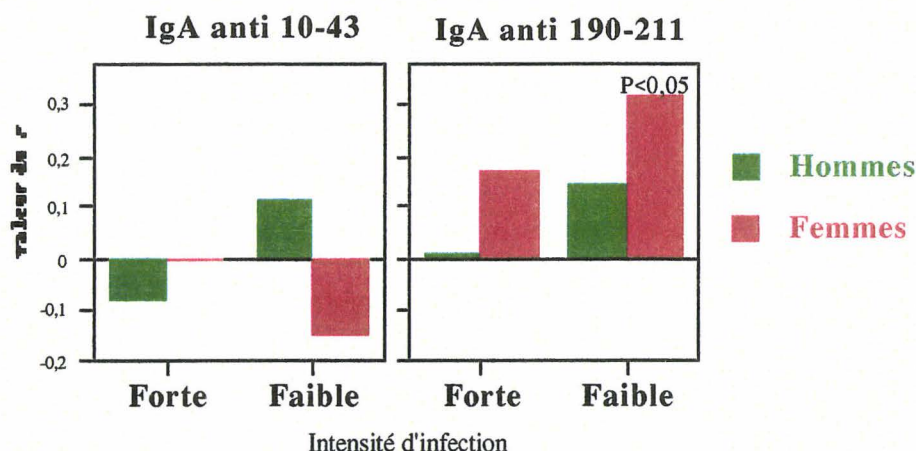


Nous mettons en évidence l'existence d'une réponse IgG3 spécifique aux deux peptides chez des individus infectés. Chez les hommes, la moyenne des IgG3 dirigés contre le 10-43 semble plus élevée dans le groupe faiblement infecté mais cette différence demeure non significative.

Fig. III.5 : Réponses IgA spécifiques des peptides 10-43 et 190-211

Une forte réponse IgA spécifique du peptide 10-43 est observée chez les hommes mais sans aucune différence entre les deux groupes d'intensité. En revanche chez les femmes et contrairement à la reconnaissance du peptide 10-43, une différence significative dans la réponse IgA anti 190-211 a été détectée entre les groupes d'intensité d'infection différente.

L'ensemble des résultats sur la réponse épitopique indique donc que seule la réponse IgA spécifique au peptide 190-211 varie en fonction de l'intensité d'infection et est prépondérante chez les femmes présentant une faible intensité. Comme pour la reconnaissance de la protéine entière, nous avons effectué des tests de corrélation statistique entre ces réponses épitopiques et l'inhibition de l'activité Sm28GST. Aucune significativité n'a été observée pour la réponse IgG3 mais nous avons pu néanmoins mettre en évidence une valeur positive du coefficient de corrélation ($r = +0,200$) pour la réponse vis-à-vis du peptide 10-43 chez les hommes du groupe de faible intensité. Les valeurs des coefficients pour la réponse IgA sont présentées en figure III.6.

Fig. III.6 : Corrélations entre IgA anti-peptides et inhibition enzymatique

Aucune corrélation statistique n'est observée pour le peptide 10-43. En revanche, la réponse IgA anti 190-211 est positivement corrélée ($P < 0,05$) avec l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST uniquement chez les femmes faiblement infectées.

La significativité de ces corrélations a été confirmée par une analyse multivariée dans laquelle l'inhibition de la Sm28GST représentait la variable dépendante et le niveau des réponses épitopiques, la variable indépendante (non montré).

Contrairement à l'isotype IgG3, nous avons donc mis en évidence que la réponse IgA chez les femmes est épitope-dépendante dans sa fonction neutralisante. Dans la population masculine, aucune relation n'a pu être observée statistiquement entre les réponses épitopiques et l'inhibition.

L'inhibition de l'activité enzymatique IgA-dépendante chez les femmes semble donc liée à la reconnaissance de l'épitope 190-211 tandis que la fonction neutralisante des IgG3, observée chez les hommes vis-à-vis de la protéine totale, ne semble pas faire intervenir l'un de ces deux peptides associés au site enzymatique.

III.4) Résumé et discussion : Importance et spécificité épitopique des réponses IgG3 et IgA anti-Sm28GST dans l'immunité protectrice

Cette étude avait pour objectif d'évaluer la réponse IgG3 et IgA anti-Sm28GST acquise naturellement au cours de l'infection par *S. mansoni*. Chez des patients infectés par *S. haematobium*, nous avons précédemment montré que ces 2 réponses isotypiques anti-Sh28GST étaient dépendantes du sexe des individus infectés. Nous confirmons ce résultat dans le cas d'une autre infection bilharzienne mais nous montrons, en plus, que ces isotypes pourraient jouer un rôle prépondérant dans l'immunité protectrice.

En effet, l'inhibition de l'activité enzymatique GST est supérieure dans le groupe de faible intensité d'infection comparativement à celui de forte intensité, et ceci aussi bien chez les hommes que chez les femmes. Au contraire, la réponse Ig(H+L) anti-Sm28GST ne varie pas en fonction de l'intensité d'infection pour les deux sexes, indiquant que la réponse Ac contre la Sm28GST, prise dans sa totalité, ne semble pas intervenir dans la neutralisation de l'activité enzymatique. Ce résultat suggère la participation spécifique d'isotypes. En effet, nous montrons une forte association entre l'inhibition de la GST et la présence des IgG3 et IgA spécifiques chez les individus faiblement infectés. Cette association apparaît cependant dépendante du sexe des individus. La réponse IgG3 anti-Sm28GST est majoritaire et est positivement corrélée avec l'inhibition chez les hommes faiblement infectés alors que cet effet est lié à la réponse IgA chez les femmes. Ces 2 isotypes spécifiques pourraient donc jouer un rôle similaire dans l'activité neutralisante et ainsi dans l'immunité protectrice acquise naturellement au cours de l'infection.

Une telle association entre les IgG3 et IgA dirigés contre une GST parasitaire a déjà été montré au cours de l'infection humaine par *Onchocerca volvulus* (Salinas et al., 1996). De plus, ces auteurs indiquent que ces 2 isotypes anti-GST (Ov24) et plus particulièrement les IgG3 pourraient jouer un rôle prépondérant dans l'immunité protectrice contre cette filariose mais aucune analyse en fonction du sexe n'a été effectuée.

Cette fonctionnalité de la réponse immune spécifique dépend non seulement du sexe des individus infectés mais également de la reconnaissance des épitopes impliqués dans le site enzymatique. En effet, les réponses IgG3 et IgA dirigées contre les peptides 10-43 et 190-211 semblent sexe-dépendantes mais ne sont pas toutes associées à l'inhibition enzymatique. Chez les hommes, aucune différence significative entre les groupes d'infection et aucune corrélation statistique avec l'inhibition n'ont été mises en évidence pour ces réponses épitopiques. Néanmoins, la moyenne des IgG3 anti 10-43 semblait plus importante dans le groupe des hommes faiblement infectés dans lequel un coefficient de corrélation positif et non négligeable ($r=+0,2$) était observé entre cette réponse et l'inhibition de la Sm28GST. Malgré l'absence de

significativité, nous pouvons suggérer que la reconnaissance de ce peptide par les IgG3 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la GST. Evidemment, la participation d'autres épitopes, impliqués ou non dans le site enzymatique, est également envisageable. Néanmoins, nous démontrons que l'isotype IgG3 dirigé contre l'ensemble de la protéine joue un rôle dans la neutralisation de la Sm28GST chez les hommes infectés.

Chez les femmes, non seulement les IgA spécifiques interviennent dans l'inhibition mais particulièrement les IgA dirigés contre le peptide 190-211. En effet, nous montrons la prépondérance de cette réponse épitopique et sa corrélation significative avec l'inhibition GST chez les femmes faiblement infectées.

Ce résultat confirme les observations décrites précédemment dans des modèles animaux associant inhibition enzymatique et reconnaissance du peptide 190-211 (Xu *et al.*, 1993). Nos résultats montrent pour la première fois que cette association apparaît IgA-dépendante et que les IgA dirigés contre l'épitope 190-211 pourraient jouer à elles seules un rôle prépondérant dans cet effet neutralisant et donc intervenir dans les mécanismes d'anti-fécondité.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons suggérer une différence dans l'affinité ou la spécificité de certains isotypes pour ces peptides. Notamment l'isotype IgA reconnaîtrait particulièrement l'épitope 190-211 alors les IgG3 auraient une affinité plus importante pour le 10-43. Mais nous ne pouvons pas écarter la participation d'un autre épitope non identifié et n'appartenant pas au site enzymatique. Pour les IgG3, il a été en effet montré dans une population infectée au Kenya que la séquence 140-153 était un épitope majeur (Auriault *et al.*, 1990) mais aucune étude n'a été réalisée pour démontrer l'importance de ce peptide dans l'activité enzymatique de la GST.

De plus, la réponse épitopique est variable en fonction du sexe des individus infectés et l'association entre les IgA anti 190-211 et l'inhibition de la Sm28GST n'est observée dans la population féminine. La maturité de la réponse immune spécifique à la Sm28GST semble ainsi être différente entre les hommes et les femmes, comme nous l'avons observé au cours de l'infection par *S. haematobium* (chapitre I). Un profil de production de cytokines différent selon le sexe et le rôle des hormones stéroïdes dans l'orientation de la réponse immune spécifique pourraient jouer un rôle prépondérant dans ce phénomène, comme nous l'avons exposé précédemment (I.4 et I.6).

Dans le chapitre I, nous avons démontré que cette réponse sexe-dépendante était observée vis-à-vis de la Sh28GST alors qu'aucune différence n'était détectée dans l'immunité dirigée contre les antigènes totaux (SEA). Dans l'étude sur l'infection *S. mansoni*, l'évaluation de la réponse anti-SEA ou anti-SWAP n'a pas été effectuée mais nous avons analysé la réponse immune spécifique à la KLH (Keyhole Limpet Haemocyanin). En effet, cet antigène partage un épitope carbohydrate commun avec la GP38 de *S. mansoni* (Grzych *et al.*, 1987) et il a été démontré que l'immunité induite par son administration chez le bétail infecté par *S. bovis* provoquait une

réduction du nombre des oeufs déposés dans les tissus (Bushara *et al.*, 1993). Les réponses IgG3 et plus particulièrement IgA anti-KLH ont été majoritairement observées dans les groupes de faible intensité d'infection pour les deux sexes mais aucune différence statistique n'a été détectée par comparaison avec le groupe de forte intensité (non montré). Malgré l'absence de significativité, ce résultat suggère que ces réponses isotypiques dirigées contre la KLH pourraient également prendre part dans l'immunité protectrice mais aucune réponse sexe-dépendante n'a été détectée pour ces deux isotypes. La variation des isotypes IgG3 et IgA en fonction du sexe semble donc un événement spécifique à l'antigène 28GST.

La variabilité de la réponse immune en fonction du sexe a donc été observée vis-à-vis de la Sh28GST et de la Sm28GST chez des individus infectés, mais avant toute chimiothérapie par le praziquantel. Or, comme nous l'avons décrit dans l'introduction générale, ce traitement provoque un relargage massif d'antigènes suite à la destruction du vers et ainsi induit une stimulation importante de la réponse immunitaire anti-parasitaire. Nous avons alors évalué l'effet de ce traitement sur la réponse immune spécifique à la 28GST et les résultats sont présentés dans le chapitre IV.

IV) Effet du traitement par le praziquantel sur l'orientation de la réponse immune spécifique à la Sh28GST :

De nombreuses études montrent l'importance de la réponse humorale de l'hôte dans l'efficacité du traitement par le praziquantel (PZQ). En effet, chez des souris infectées par *S. mansoni*, l'effet du PZQ est augmenté après le transfert passif d'un sérum de lapin immunisé par du SWAP (Doenhoff *et al.*, 1987) ou après la vaccination par des antigènes de membrane (Fallon *et al.*, 1995). L'efficacité du PZQ est à l'inverse diminuée chez des souris ne possédant pas de cellules T ou B (Sabah *et al.*, 1985; Brindley *et al.*, 1987).

Au cours de l'infection humaine, l'efficacité de la chimiothérapie est réduite dans des foyers de récente infection, populations qui n'ont pas encore développé une immunité anti-parasitaire importante (Stelma *et al.*, 1995). L'efficacité curative du PZQ est variable selon les individus ce qui pourrait être associé à une différence dans leur statut immunitaire (Fallon *et al.*, 1992).

De plus, le traitement par le PZQ induit une variation de la réponse immune anti-parasitaire de l'hôte infecté, particulièrement en accélérant et en orientant le développement de la réponse immune acquise au cours de l'infection par *S. haematobium* (Mutapi *et al.*, 1998). Le traitement au PZQ associé à une réponse immune anti-parasitaire semble ainsi augmenter l'efficacité protectrice par un effet synergique.

Dans notre laboratoire, Loïc Dupré *et al.* ont démontré chez des souris infectées par *S. mansoni* le fort potentiel protecteur de la vaccination par la Sm28GST combinée à un traitement par le PZQ (Dupré *et al.*, 1999). Ce double traitement augmente la survie de ces animaux, par comparaison aux souris n'ayant reçu que la vaccination ou le traitement au PZQ. Cette association prévient également le développement de la pathologie en réduisant fortement le nombre d'oeufs déposés dans les tissus. De plus, l'inhibition enzymatique de la Sm28GST est fortement augmentée après l'administration du PZQ chez les souris préalablement immunisées et reste associée à l'apparition de la réponse IgA. Ces phénomènes sont liés aux mécanismes d'action du PZQ qui démasque la Sm28GST à la surface du vers.

Ces résultats, obtenus dans un modèle animal, nous ont amené à évaluer si cet effet de la chimiothérapie sur la réponse immune spécifique pouvait être retrouvé dans les populations infectées par *S. haematobium*. Cette étude pré-clinique devait également apporter certaines informations avant les futurs essais cliniques de Phase II effectués chez des individus infectés par *S. haematobium* (Introduction chap. IV.4.5). En effet, pour des raisons éthiques mais également d'efficacité vaccinale, les administrations de la Sh28GST sont précédées ou suivies par le traitement au PZQ.

IV.1) Population étudiée et paramètres d'infection:

L'effet de la chimiothérapie a été évalué en comparant les résultats immunologiques obtenus avant, 5 semaines et 6 mois après le traitement au PZQ de la population du village d'Ourou-Madiou, précédemment décrite dans le chapitre I.1.

Les résultats de la prévalence d'infection dans la cohorte, mesurée par la détection des oeufs dans les urines après filtration urinaire, étaient les suivants:

Avant traitement (n=108): 100 % - date de prélèvements: avril/juin 1996

5 semaines après PZQ (n=102): 20% - date de prélèvements: juillet 1996

6 mois après PZQ (n=77): 32,5% - date de prélèvements: décembre 1996

Nous pouvons constater que le traitement par le PZQ a induit une forte baisse de la prévalence d'infection à 5 semaines suivie d'une légère augmentation entre 5 semaines et 6 mois. Pour les deux dates après le traitement, l'intensité d'infection exprimée en moyenne géométrique était très faible chez les individus trouvés positifs (5 semaines: 1,1 oeufs/10 ml d'urine - 6 mois: 1,023). De plus, la majorité des individus positifs étaient des enfants de la classe d'âge 8-15 ans: 60,8% des individus positifs à 5 semaines et 56% à 6 mois.

Les résultats observés 5 semaines après traitement indiquent donc une importante efficacité de la chimiothérapie en particulier chez les adultes. La faible évolution de la prévalence observée entre 5 semaines et 6 mois après PZQ pouvait suggérer que la réinfection parasitaire était relativement faible au cours de cette période. Or, une étude malacologique effectuée dans des villages situés à proximité d'Ourou-Madiou a montré la forte transmission de *S. haematobium* de juillet à novembre 1996 (Shaw *et al.*, 1999). Cette forte transmission, spécifique au mollusque *Bulinus senegalensis*, est donc présente dans ce foyer d'infection au cours de notre étude après le traitement.

Nous avons voulu confirmer ou infirmer ces résultats en évaluant la charge parasitaire par le dosage sérique des antigènes circulants à 6 mois (CAA, Annexe IX). Les résultats de ce test indique tout d'abord que 78% des enfants (8-15 ans) et 30% des adultes sont trouvés positifs 6 mois après le traitement. Nous avons classé ces données en fonction de l'infection mesurée en oeufs dans les urines (Filtration Urinaire, FU): 60% des individus FU+ présentaient également un test CAA positif mais 30% des individus FU- étaient cependant positifs en CAA et donc infectés. Ce dernier résultat était particulièrement observé chez les adultes. Ces données cumulées à celles des FU montrent que les individus infectés à 6 mois représentent 52% de la population et non plus 32,5% initialement détecté par la prévalence. Il faut préciser que ce test CAA est prévu pour détecter des antigènes circulants de *S. mansoni* et ne pourrait donc pas être très sensible pour *S. haematobium*. En effet, il a été montré que la sensibilité de ce dosage dans le sérum pouvait varier de 31 à 76 % selon le foyer d'infection à *S. haematobium* (De Clercq *et*

al., 1997). Une positivité encore plus importante aurait pu être observée si nous avions pu doser le CAA spécifique de *S. haematobium*.

L'ensemble des données parasitologiques (oeufs et CAA) mais surtout l'observation des résultats malacologiques dans ce foyer suggèrent que les enfants mais également les adultes sont exposés au parasite entre 5 semaines et 6 mois après le traitement au PZQ. Cependant l'intensité de réinfection semble très faible dans ce foyer. Ceci pourrait expliquer le fait que la plupart des adultes ne sont pas détectés positifs, non seulement en terme d'oeufs dans les urines mais également après le dosage de CAA non spécifique de l'espèce.

IV.2) Effet du traitement par le PZQ sur la réponse humorale anti-Sh28GST : population totale

Pour deux raisons principales, ce chapitre présentera les résultats obtenus uniquement chez les adultes. Premièrement, nous avons montré que les adultes, contrairement aux enfants, présentaient une réponse anticorps anti-Sh28GST avant le traitement anti-bilharzien. Deuxièmement, cette réponse immune spécifique est dépendante du sexe des adultes infectés avec une variation pour les isotypes IgG3 et IgA (Chapitre I). Les données sur la population adulte permettra ainsi d'évaluer l'effet du traitement sur la réponse immune spécifique "existante" au cours de l'infection mais également de comparer cet effet chez les hommes et chez les femmes qui présentent un profil immunitaire différent. Les résultats immunologiques chez les enfants seront présentés dans le chapitre V.

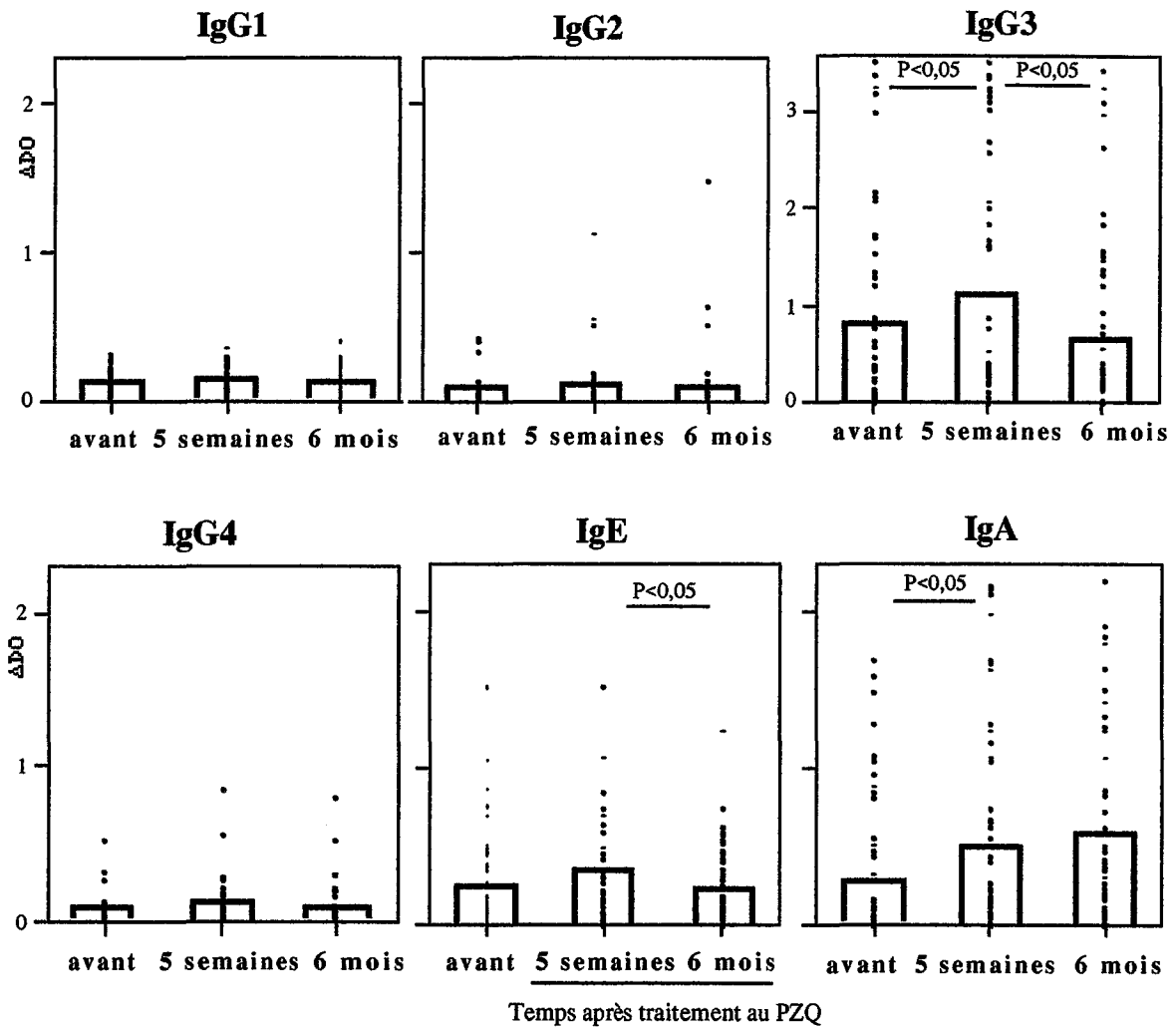
L'évaluation des réponses isotypiques a été réalisée dans une population composée de 49 adultes (≥ 16 ans) qui ont participé à l'ensemble de l'étude: prélèvements avant, 5 semaines et 6 mois après le traitement au PZQ.

La présence des anticorps spécifiques à la Sh28GST a été évaluée par ELISA (Annexe I).

Les résultats sont présentés individuellement et en moyenne arithmétique et sont exprimés en $\Delta DO = OD_x - OD_n$. OD_x représente la valeur de DO pour un individu infecté et OD_n , la moyenne des valeurs obtenues pour 30 sérums contrôles de caucasiens.

Pour la comparaison des moyennes dans ce chapitre, les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le test de Wilcoxon sur données appariées.

Fig. IV.1 : Réponse isotypique anti-Sh28GST - population totale adulte



Aucune variation significative dans le temps n'a été observée pour les isotypes IgG1, IgG2, IgG4. La réponse IgE est significativement différente entre 5 semaines et 6 mois après traitement. Les réponses IgG3 et IgA spécifiques sont significativement supérieures 5 semaines après le traitement, comparativement aux données observées avant le traitement. La comparaison entre 5 semaines et 6 mois montrent une baisse significative de la réponse IgG3 revenue à son niveau de base alors que le niveau des IgA reste élevé.

Ces résultats montrent que seules les réponses IgG3 et IgA sont régulées par le traitement par le PZQ. En effet, l'influence propre du PZQ (comparaison avant et 5 semaines après PZQ) génère l'augmentation des deux réponses isotypiques. Par contre la régulation isotypique semble différente lorsque nous comparons les données entre 5 semaines et 6 mois après le traitement. Ce dernier effet pourrait être induit par la probable réinfection parasitaire favorisant uniquement la stabilité de la réponse IgA.

Pour la suite de l'étude, les résultats seront donc présentés en fonction de ces deux phénomènes:

- Effet du traitement par le PZQ : comparaison avant - 5 semaines
- Effet d'une réinfection : comparaison 5 semaines - 6 mois

IV.3) Effet du traitement par le PZQ sur les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST en fonction du sexe:

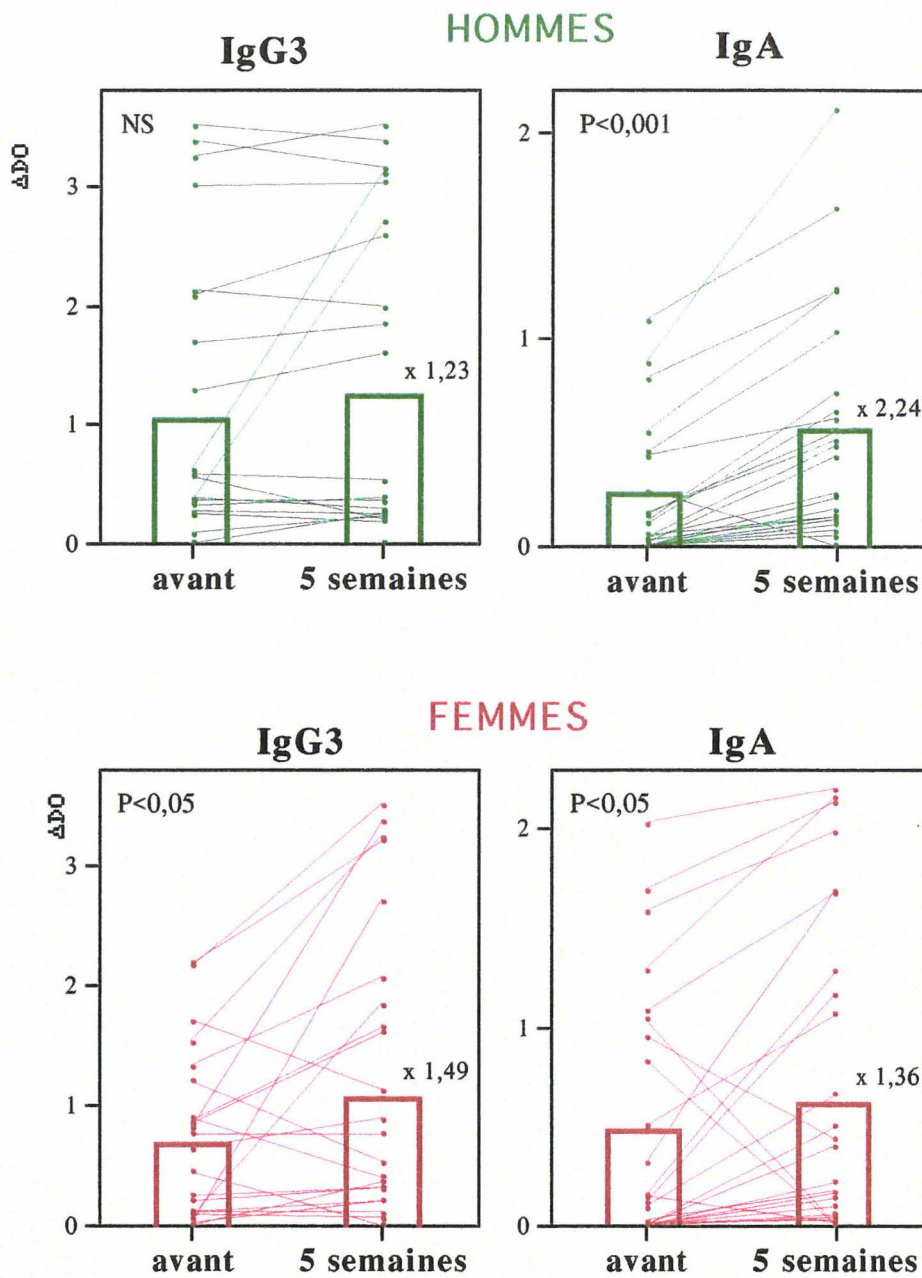
Nous avons montré avant chimiothérapie, que le profil immunitaire spécifique à la Sh28GST était différent selon le sexe des individus infectés (chapitre I). Nous nous sommes alors demandé si l'effet du traitement par le PZQ pouvait être différent entre les hommes et les femmes. Ceci revenait à évaluer l'effet du PZQ sur une réponse immune spécifique présentant des différences avant traitement.

Pour cette étude, la cohorte était composée de 22 hommes et 27 femmes présentant, avant traitement, une intensité d'infection identique (hommes: 4,06 et femmes: 4,35 oeufs/10 ml d'urine).

Comme nous l'avons décrit pour la population totale, aucun effet du traitement n'a été observé pour les réponses IgG1, IgG2 et IgG4 anti-Sh28GST chez les hommes et chez les femmes et ceci quelque soit les comparaisons entre avant le traitement, 5 semaines et 6 mois après PZQ (non montré). La réponse IgE est quand à elle significativement inférieure à 6 mois comparativement à 5 semaines et ceci pour les deux sexes étudiés séparément ($P < 0,05$).

Après la démonstration de l'importance des réponses IgG3 et IgA spécifiques avant le traitement et de leur présence sexe-dépendante (voir chapitres I et III), nous avons focalisé notre attention sur l'évolution de ces deux isotypes après le traitement des hommes et des femmes. Ces résultats sont présentés aux Fig. IV.2 et IV.4 et sont exprimés individuellement et en moyenne arithmétique pour chaque groupe. La variation de la moyenne 5 semaines après PZQ est également indiquée en chiffre.

Fig. IV.2 : Effet du traitement par le PZO en fonction du sexe

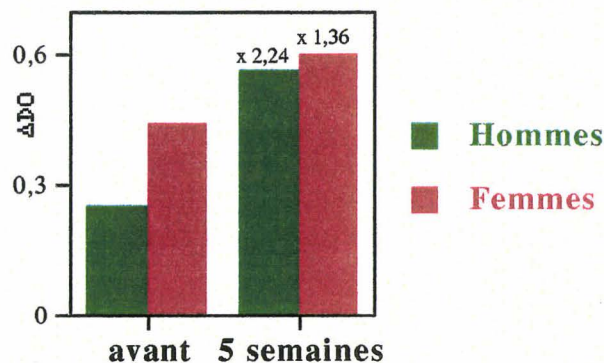


Avant le traitement, nous retrouvons pour l'ensemble des adultes (n=49), les variabilités que nous avons précédemment décrite en fonction du sexe: réponse IgG3 majoritaire chez les hommes ($1,09 \pm 1,04$ vs $0,62 \pm 0,61$) et IgA prépondérante chez les femmes ($0,44 \pm 0,5$ vs $0,25 \pm 0,28$). Ces différences avant traitement ne sont pas significatives (IgG3: $P=0,058$; IgA: $P=0,122$) car les deux classes d'âge précédemment décrites (16-34 et ≥ 35 ans) ont été regroupées dans cette nouvelle étude. Pour rappel, nous avons démontré dans cette même cohorte que les réponses IgG3 et IgA étaient significativement différentes en fonction du sexe uniquement pour une classe d'âge particulière chez les adultes (IgG3 pour 16-34 ans et IgA pour ≥ 35 ans, voir Fig. I.3).

Cinq semaines après traitement, une augmentation significative est observée pour la réponse IgA chez les hommes alors que la réponse IgG3 reste stable. L'augmentation de cet isotype apparaît homogène dans la population masculine où la moyenne est multipliée par un facteur supérieur à 2. Pour la population féminine, les réponses IgG3 et IgA augmentent significativement 5 semaines après le traitement mais ceci apparaît moins homogène que l'augmentation des IgA observée chez les hommes.

La Fig. IV.3 montre de façon plus claire encore l'effet important du traitement sur la réponse IgA chez les hommes.

Fig.IV.3 : Effet du traitement sur la réponse IgA (en moyenne)



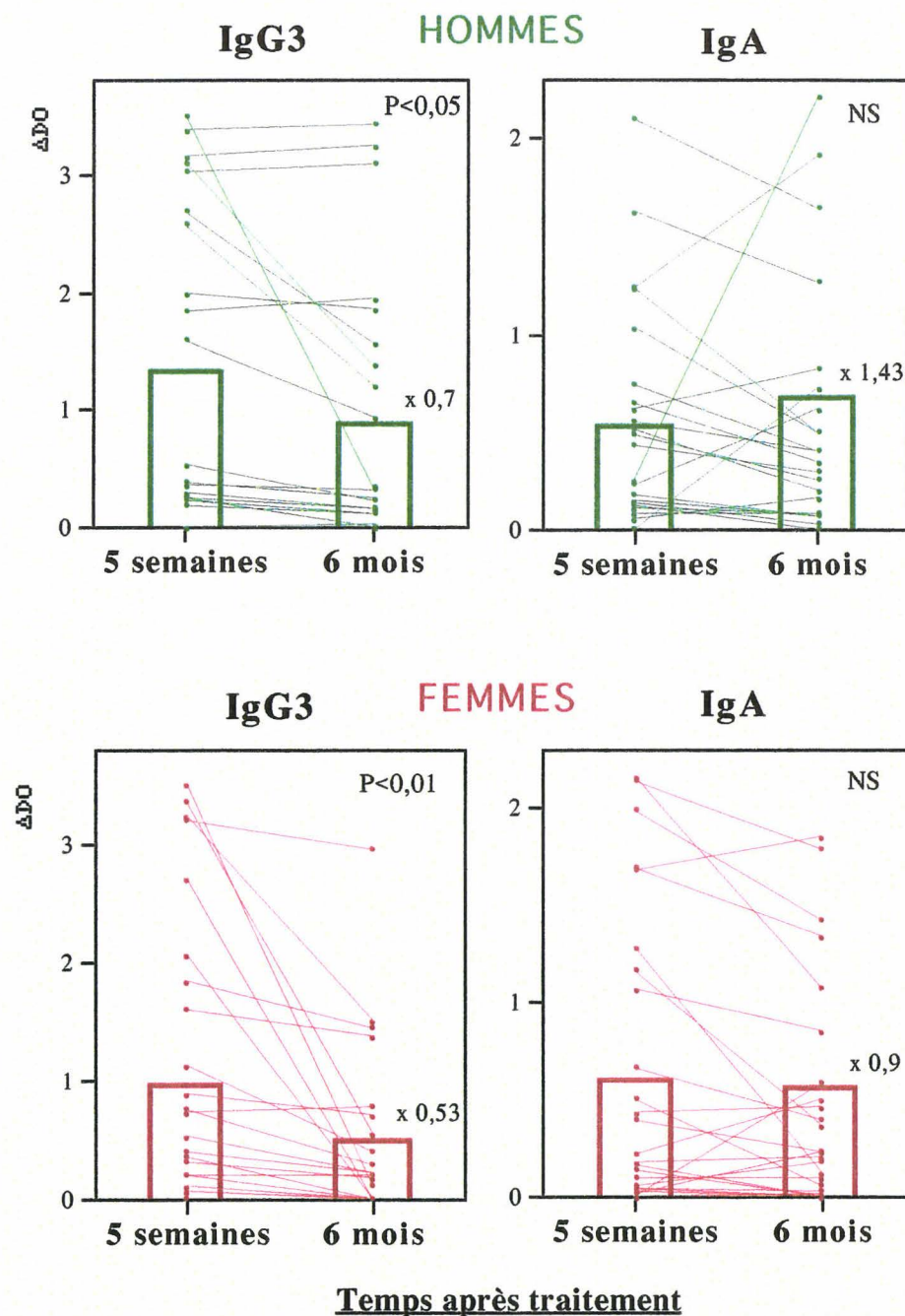
Cette figure montre que le traitement a non seulement induit une augmentation de la réponse IgA pour les deux sexes mais semble également "abolir" la différence sexe-dépendante de la réponse immune acquise observée avant traitement. Ce même résultat est obtenu pour la réponse IgG3 qui devient donc comparable entre les hommes et les femmes 5 semaines après le traitement.

Le traitement par le PZQ régule donc différemment la réponse immune anti-Sh28GST en fonction du sexe, bien que les hommes et les femmes présentaient une intensité d'infection similaire. En effet, l'influence du PZQ est prépondérante sur l'isotype IgA chez les hommes, population qui présentait une faible réponse IgA spécifique avant le traitement. A l'inverse, la chimiothérapie ne semble avoir aucun effet sur la réponse IgG3 qui était déjà relativement importante avant traitement pour cette population masculine.

Par contre chez les femmes, les deux isotypes sont augmentés modérément.

Après avoir analysé l'effet du traitement, nous nous sommes intéressé à la réexposition au parasite et analysé son influence selon le sexe des individus infectés. Nous avons donc comparé les résultats des réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST entre 5 semaines et 6 mois après le traitement.

Fig. IV.4: Effet de la réinfection en fonction du sexe

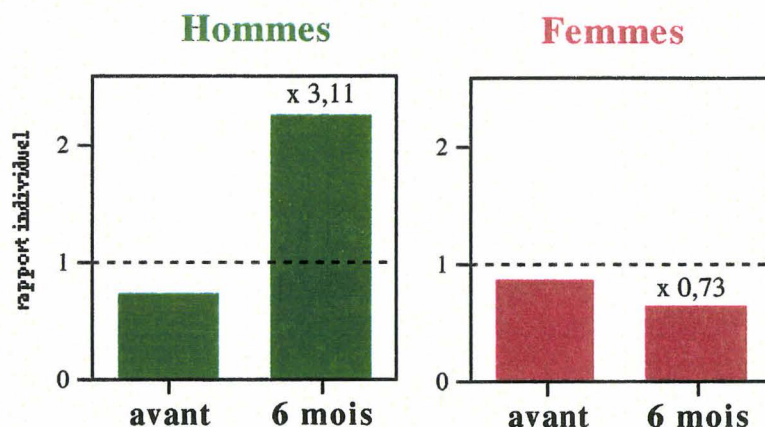


La réponse IgG3 anti-Sh28GST est significativement inférieure 6 mois après le traitement chez les hommes et chez les femmes. Mais cet effet apparaît individuellement plus homogène chez les femmes que chez les hommes. A l'inverse, aucune différence significative n'est observée pour la réponse IgA chez les deux sexes.

Au cours de cette période, l'effet du traitement apparaît similaire en fonction du sexe des individus infectés : la réponse IgG3 anti-Sh28GST chute alors que la réponse IgA reste stable.

L'ensemble de ces résultats a montré que le traitement par le PZQ suivi d'une période d'exposition induit la régulation des réponses IgG3 et IgA spécifiques. Nous avons voulu alors évalué la conséquence de ces deux effets sur la balance entre ces deux isotypes en comparant les résultats entre avant et 6 mois après traitement. Le rapport IgA/IgG3 spécifique pour chaque individu a été calculé. Ces résultats sont présentés en moyenne pour chaque groupe et l'augmentation de la moyenne 6 mois après traitement est indiqué.

Fig. IV.5: Effet PZO + réinfection : Rapport individuel IgA/IgG3



Chez les femmes, les deux effets cumulés ne semblent pas influencer la balance isotypique IgA/IgG3. A l'inverse pour les hommes, la régulation isotypique est largement en faveur de la réponse IgA après traitement et réinfection. Cette évolution est caractérisée, à 6 mois, par une valeur moyenne des rapports individuels supérieure à 2 (x 3,11 par rapport à l'avant traitement).

Nous avons précédemment suggéré que les isotypes IgG3 et IgA présentaient des affinités différentes dans la reconnaissance d'épitopes impliqués dans le site enzymatique de la 28GST (Chapitre III). Les réponses IgG3 et IgA spécifiques aux deux peptides impliqués ont donc été évaluées et sont présentées dans l'étude suivante.

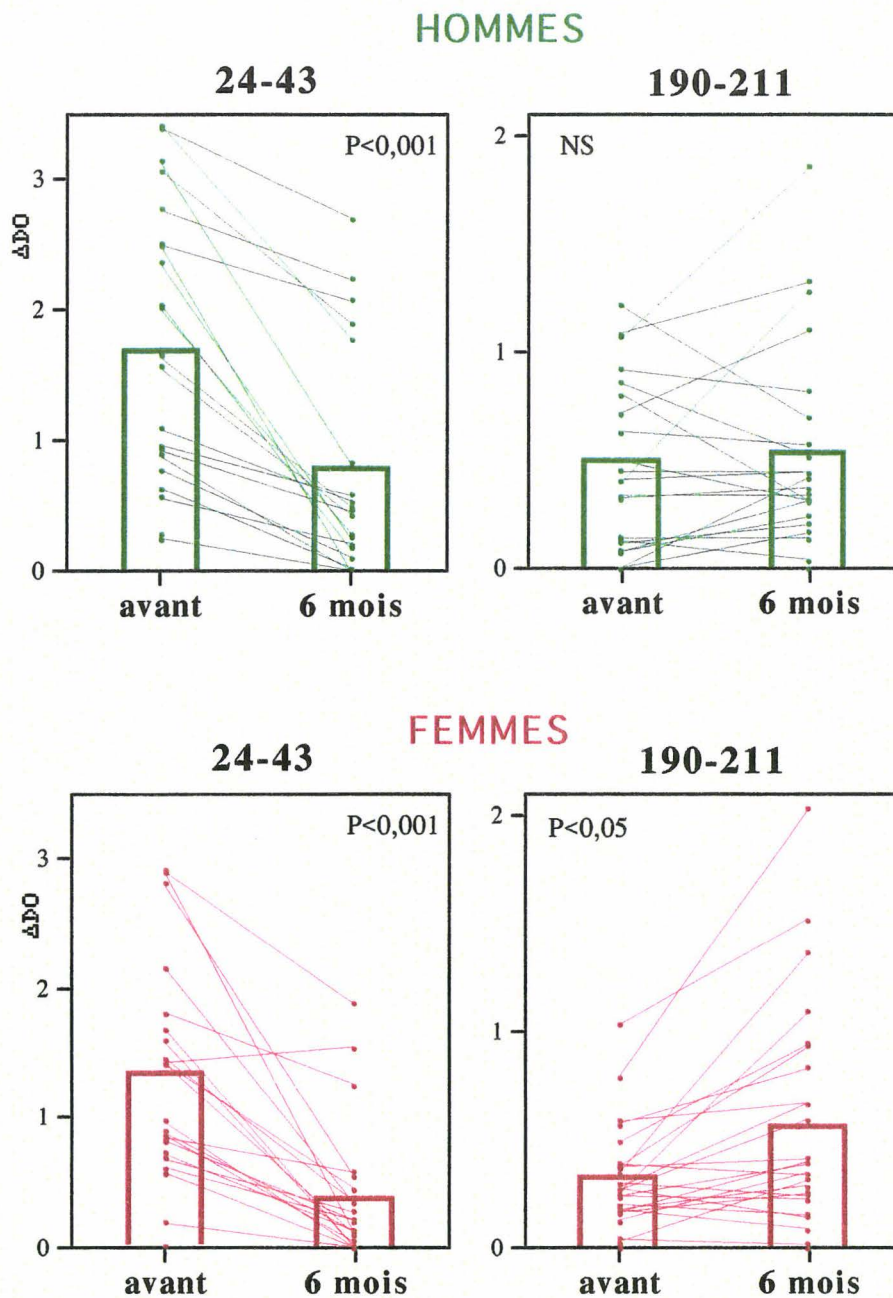
IV.4) Effet du traitement et de la réexposition sur les réponses IgG3 et IgA spécifiques des peptides N et C terminaux en fonction du sexe

Cet effet a été évalué en comparant les données obtenues avant et 6 mois après chimiothérapie. Nous avons focalisé notre attention sur les 2 peptides (24-43 et 190-211), impliqués dans le site enzymatique de la Sh28GST. Nous avons montré précédemment que seule la reconnaissance de l'épitope 190-211 par les IgA pouvait être associée à l'inhibition de l'activité 28GST chez les femmes infectées par *S. mansoni* (Remoué *et al.*, 2000; Chap. III). Nous avons de plus suggéré l'existence d'une affinité différente entre les IgG3 et les IgA dans la reconnaissance de ces deux épitopes et que ce phénomène était dépendant du sexe des individus. L'effet du traitement sur ces réponses épitopiques a donc été comparé entre les hommes et les femmes.

Les peptides linéaires ont été synthétisés par la société Biocytex (Marseille) et la présence des anticorps a été évaluée par ELISA (Annexe I).

Effet sur les réponses IgG3 dirigées contre les peptides 24-43 et 190-211 :

Aucune différence significative n'a été observée pour la réponse IgG3 dirigée contre le peptide 190-211 entre avant traitement et 6 mois après et ceci chez les hommes ($0,20 \pm 0,17$ vs $0,14 \pm 0,09$ respectivement) et les femmes ($0,09 \pm 0,04$ vs $0,09 \pm 0,03$) (non montré). En revanche, le niveau des IgG3 dirigés contre le 24-43 est significativement inférieur 6 mois après le traitement, chez les hommes ($0,10 \pm 0,1$ vs $0,20 \pm 0,15$ - $P < 0,01$) et les femmes ($0,09 \pm 0,08$ vs $0,17 \pm 0,09$ - $P < 0,05$). L'effet du traitement et d'une réinfection sur la réponse IgG3 épitopique semble donc similaire en fonction du sexe des individus infectés.

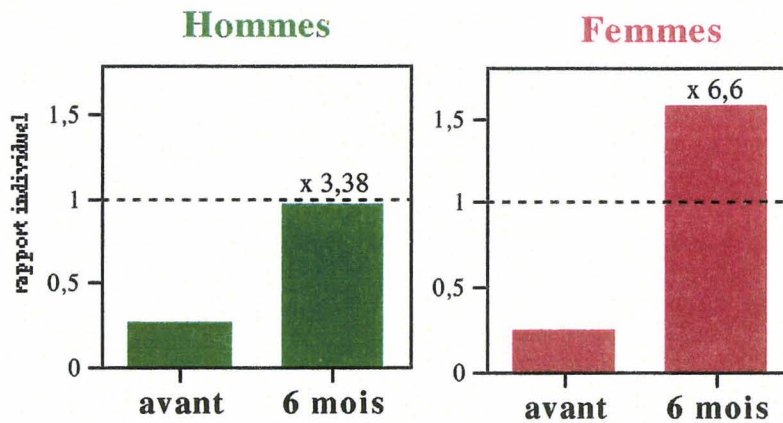
Fig. IV.6 : Effet sur les réponses IgA anti-peptides en fonction du sexe

Chez les hommes et chez les femmes, la réponse IgA dirigée contre le peptide 24-43 est significativement inférieure 6 mois après le traitement et ceci apparaît très homogène pour tous les individus. En revanche, la réponse IgA anti 190-211 reste stable après le traitement de la population masculine tandis qu'une augmentation significative est observée après 6 mois chez les femmes. Un effet sexe-dépendant est donc observé uniquement pour la réponse IgA dirigée contre le peptide 190-211.

Ces résultats apparaissent plus clair encore après le calcul des rapports individuels entre les réponses IgA contre le 190-211 et celles contre le 24-43. Le graphe ci-dessous présente la

moyenne arithmétique des rapports individuels pour les hommes et les femmes. L'augmentation de cette moyenne est également indiquée:

Fig. IV.7 : Rapports individuels des réponses IgA épitopiques 190-211/24-43



Cette figure indique que la balance épitopique pour la réponse IgA devient "équilibrée" chez les hommes 6 mois après traitement (moyenne proche de 1). Dans cette population, la variation observée entre avant et 6 mois est en faveur de la réponse dirigée contre le 190-211, mais serait induite par la seule chute des IgA contre le 24-43 car la réponse vis-à-vis du 190-211 reste stable (Fig. IV.6). En revanche chez les femmes, le traitement induit un fort déséquilibre de cette balance épitopique en orientant la réponse IgA vers la reconnaissance du peptide 190-211. Ceci est caractérisé par le fort coefficient multiplicatif (x 6,6) et une moyenne des rapports supérieure à 1.

L'ensemble des résultats, comparant les réponses IgG3 et IgA épitopiques, indique que la chimiothérapie suivi de la période de réinfection induit deux phénomènes marquants:

(1) les réponses vis-à-vis du peptide 24-43 chutent 6 mois après le traitement à la fois chez les hommes et chez les femmes

(2) une régulation positive après le traitement est observée pour la réponse IgA spécifique au peptide 190-211, mais uniquement chez les femmes.

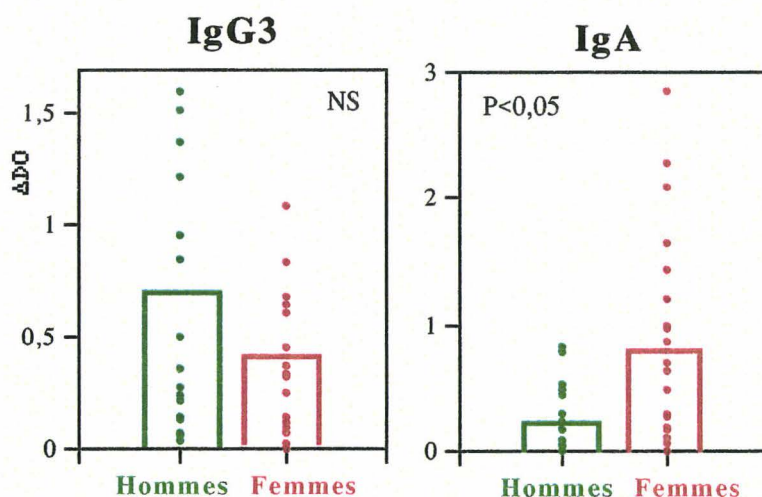
Le traitement par le PZQ de la population féminine semble donc influencer la régulation de la réponse IgA épitopique vers la production d'IgA spécifique du peptide 190-211, au détriment du peptide 24-43.

Tout au long de ce chapitre, nous avons analysé l'effet d'une chimiothérapie anti-bilharzienne jusqu'à 6 mois après traitement. Nous pouvons alors nous demander si cet effet était retrouvé après une longue période d'exposition au parasite.

IV.5) Effet du traitement sur la réponse immune anti-Sh28GST: influence à long terme?

Au cours du mois de mars 1999, l'équipe du programme ESPOIR a été prévenu par le comité de santé du village d'Ourou-Madiou que certains enfants présentaient de nouveau du sang dans les urines. Des filtrations urinaires ont été réalisées et ont indiqué que l'intensité d'infection était redevenu similaire à celle observée avant le traitement par le PZQ (juin 1996). Préalablement à un nouveau traitement global du village, 41 adultes de notre cohorte initiale (16 hommes et 25 femmes; >16 ans) ont accepté un nouveau prélèvement sanguin. Nous avons alors évalué les réponses IgG3 et IgA spécifiques à la Sh28GST chez les mêmes individus. Cette date correspondait donc à environ 3 ans après le traitement par le PZQ et nous voulions savoir si les variations des réponses immunes anti-Sh28GST précédemment observées pouvaient être retrouvées après cette longue période d'exposition. Les résultats sont présentés en fonction du sexe des individus infectés.

Fig. IV.8 : IgG3 et IgA anti-Sh28GST 3 ans après traitement



La réponse IgG3 spécifique n'est pas significativement différente entre les deux sexes même si la moyenne observée semble supérieure chez les hommes. Au contraire, le niveau des IgA est significativement supérieure chez les femmes indiquant que cette réponse isotypique présente un profil sexe-dépendant similaire à celui observé avant traitement (Chapitre I). Il faut noter cependant que, pour l'ensemble des adultes (n=49) regroupant les 2 classes d'âge 16-34 et ≥35 ans, cette réponse IgA était majoritaire chez les femmes avant traitement mais sans différence significative par rapport aux hommes (Fig. IV.2). Or, cette différence est devenue significative 3 ans après le traitement. L'effet de l'exposition au parasite pourrait expliquer ce phénomène.

Néanmoins, les profils immunitaires qui sont ici observés longtemps après le traitement sont différents de ceux évalués après 5 semaines. En effet, nous retrouvons l'existence d'une réponse immune sexe-dépendante alors que cet effet n'existait plus 5 semaines après le traitement. Après avoir classé les résultats en fonction des deux classes d'âge précédemment décrites chez les adultes (16-34 et ≥ 35 ans), les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST semble présenter, 3 ans après le traitement, le même profil que celui observé en fonction de l'âge avant chimiothérapie (Fig. I.3). En effet, la réponse IgG3 apparaît prépondérante chez les hommes âgés de 16 à 34 ans alors que la réponse IgA est majoritaire chez les femmes de plus de 35 ans (non montré).

Au vu de ces résultats, nous pouvons suggérer que la réponse immune spécifique 3 ans environ après traitement présente un profil immunitaire "normal" acquis naturellement au cours de l'infection. Pour la population étudiée, cela indique que l'effet du traitement sur l'immunité spécifique, mise en évidence 6 mois après, semble être un phénomène transitoire.

IV.6) Résumé et discussion : traitement par le PZQ et maturation de la réponse immune spécifique

Spécificité de la réponse immune anti-Sh28GST

Pour les infections bilharziennes chez l'homme, l'effet du traitement par le PZQ sur les réponses immunes dirigées contre l'ensemble des antigènes parasitaires (SWAP ou SEA) a été particulièrement décrit chez les enfants. Mais l'objectif principal de nombreuses études était de comparer les différentes réponses isotypiques entre des enfants résistants et susceptibles à la réinfection. En particulier, les résultats se sont focalisés sur la balance entre les IgE et les IgG4 au cours des infections par *S. mansoni* ou *S. haematobium*. Il a été démontré que la résistance à la réinfection était associée à une forte réponse IgE et une faible réponse IgG4 vis-à-vis du SWAP ou du SEA (Dunne *et al.*, 1992; Demeure *et al.*, 1993; Hagan *et al.*, 1991). De plus, l'effet du traitement sur la balance IgE/IgG4 semble être plus prononcé chez les enfants que chez les adultes (Grogan *et al.*, 1997; Satti *et al.*, 1996).

L'effet du traitement sur la réponse IgG1 apparaît contradictoire puisque certaines études montrent une augmentation (Satti *et al.*, 1996) et d'autres une diminution 6 mois après le traitement (Webster *et al.*, 1997). Dans une autre étude, Mutapi *et al.* (1998a) ont montré que l'augmentation des IgG1 était associée à une diminution des IgA anti-SEA après le traitement d'enfants infectés par *S. haematobium* tandis qu'aucune différence n'était observée pour la réponse IgG3. Dans une population infectée par *S. mansoni*, aucune variation de la réponse IgG3 mais aussi IgA n'était également détectée après traitement (Webster *et al.*, 1997).

Ces résultats sont observés de 3 mois à 2 ans après chimiothérapie et ne concernent donc pas l'effet propre du PZQ (rarement évalué à 5 semaines) mais plutôt son influence associée à une réinfection. Il semble donc exister, entre différentes études, un consensus dans la régulation des IgE et des IgG4 après traitement tandis que de fortes variations sont observées pour les réponses IgG1 et IgA. Finalement, aucun effet du PZQ n'a été mis en évidence sur l'isotype IgG3.

Ainsi, l'influence d'un traitement sur les réponses dirigées contre l'ensemble des antigènes parasitaires ne semble pas correspondre aux résultats que nous observons dans notre étude vis-à-vis de la Sh28GST. En effet, nous montrons un effet uniquement pour les réponses IgG3 et IgA spécifiques, notamment par l'augmentation de ces deux isotypes 5 semaines après le traitement pour la population totale. La chimiothérapie ne semble donc pas provoquer la même régulation isotypique entre les réponses dirigées, d'une part contre le SWAP et le SEA, et d'autre part celles spécifiques de la 28GST. Ceci souligne une fois de plus la particularité de la réponse immune spécifique des 28GST. Un tel effet sur l'augmentation des IgA spécifiques a également été montré vis-à-vis de la Sm28GST chez des adultes (Grzych *et al.*, 1991) et chez des enfants infectés par *S. mansoni* (Auriault *et al.*, 1990). Cette dernière étude indique aussi l'absence d'effet du PZQ sur les réponses IgE et IgG1 spécifiques.

Cependant, nous avons analysé cet effet du PZQ à deux périodes distinctes :

- comparaison entre avant et 5 semaines après traitement
- comparaison entre 5 semaines et 6 mois après PZQ

Ceci nous a permis de caractériser deux phénomènes différents dans la régulation de la réponse isotypique spécifique de la Sh28GST. Le premier était marqué par la seule augmentation des IgG3 et des IgA pour la population totale et pourrait correspondre à l'effet propre du traitement. Le second montrait une chute des IgG3 et IgE anti-Sh28GST tandis que la réponse IgA restait stable entre 5 semaines et 6 mois. Cet interval semble correspondre à une période d'exposition au parasite comme l'indique nos données parasitologiques et les études malacologiques de transmission à *S. haematobium* réalisées dans ce foyer d'infection (Shaw *et al.*, 1999). Connaissant la situation épidémiologique dans cette région, il semble probable que les individus dans ce village se sont réinfectés au cours de ces 5 mois.

L'orientation isotypique observée pourrait être liée à la stimulation particulière de la production de certaines cytokines comme nous l'avons présenté dans le chapitre I. L'effet propre du traitement sur la réponse cellulaire a été peu étudié au cours des infections humaines et concerne la spécificité aux antigènes totaux (SWAP ou SEA). La majorité des études ont effectivement comme objectif de comparer les réponses cellulaires des individus résistants ou susceptibles à une réinfection. Néanmoins, une augmentation de la prolifération des PBMC et de la production d'IL-4 par les CD4⁺ a été démontré 5 semaines après traitement (Grogan *et al.*, 1996). Mais une

étude au Kenya indique un effet sur la sécrétion d'IL-5, d'IFN γ et de TNF α spécifique au SEA (Roberts *et al.*, 1993). Dans une autre population infectée par *S. mansoni*, le traitement induit également la production d'IFN γ mais cette fois-ci associée à une diminution de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 spécifique (Contigli *et al.*, 1999). Ces différences semblent dépendre de la phase aiguë ou chronique de l'infection bilharzienne. Ces données contradictoires sur la production de cytokines vis-à-vis des antigènes totaux ne peuvent pas expliquer la régulation isotypique que nous observons. Cependant, une étude chez des souris infectées par *S. japonicum* montre qu'un traitement au cours de la phase aiguë (9 semaines après infection) induit l'augmentation du TGF β localement au niveau hépatique, tandis que le traitement en phase chronique (24 semaines) induit sa diminution (Kresina *et al.*, 1993). Bien que cette évaluation ne concerne pas une production systémique, cette cytokine semble être régulée après le traitement au PZQ. De part son effet sur la production des IgA (van Vlasselaer *et al.*, 1991), cette cytokine pourrait intervenir dans la régulation isotypique que nous observons.

Traitement et réponse immune spécifique : maturation différente en fonction du sexe

En fonction du sexe des individus infectés, l'effet principal du traitement par le PZQ est caractérisé par la très forte augmentation des IgA spécifiques chez les hommes. Cinq semaines après traitement, le niveau de cette réponse isotypique devient ainsi similaire entre les hommes et les femmes. Ceci semble également être retrouvé pour les IgG3, mais d'une manière moins marquée. Le traitement a donc "abolit" le profil lié au sexe que nous avons observé avant traitement (chapitre I). En revanche, la période de réinfection semble avoir la même influence en fonction du sexe. Nous observons, en effet, une chute de la réponse IgG3 anti-Sh28GST associée à une stabilité de la réponse IgA chez les hommes et chez les femmes.

La conséquence de ces deux effets cumulés a été présenté sous la forme du calcul des rapports individuels entre les IgA et les IgG3, évalué avant et 6 mois après traitement. Ceci semble indiquer que le traitement induit une "commutation isotypique", uniquement chez les hommes. En effet, une forte augmentation des IgA pour la population masculine semble associée à la chute de la réponse IgG3 vis-à-vis de la protéine Sh28GST alors qu'une telle régulation de la balance isotypique n'était pas observée chez les femmes.

Du point de vue du profil épitopique, le traitement induit particulièrement les réponses IgA dirigées contre l'épitope 190-211 chez les femmes. En effet, les réponses IgG3 et IgA spécifiques du 24-43 chutent 6 mois après le traitement pour les deux sexes tandis que seule la réponse IgA vis-à-vis du peptide 190-211 augmente significativement chez les femmes. L'effet du traitement associé à la période de réinfection pourrait donc engendrer une "commutation

épitopique" de la réponse IgA chez les femmes. Il est à noter que l'effet du traitement au PZQ sur les réponses IgG et IgA dirigées contre différents épitopes avait déjà été évalué dans une population infectée par *S. mansoni* (Evengard *et al.*, 1994). Aucune variation des réponses spécifiques aux peptides 24-43 et 190-211 de la Sm28GST n'avait été observée 6 mois après le traitement mais cette étude n'avait pas comparé les réponses épitopiques entre les hommes et les femmes.

L'ensemble de ces résultats indique que la variation de la réponse anti-Sh28GST induite par le traitement au PZQ suivi d'une réexposition au parasite est différente en fonction du sexe des individus infectés. L'effet du traitement induirait une régulation isotypique de l'immunité en agissant sur la balance IgG3/IgA vers la production des IgA anti-Sh28GST chez les hommes tandis qu'il induirait une régulation épitopique chez les femmes en faveur d'une réponse IgA spécifique du peptide 190-211. Cette influence chez les femmes semble s'effectuer au dépend de la régulation négative des réponses immunes spécifiques à l'épitope 24-43. La stimulation de l'immunité spécifique après démasquage de l'antigène à la surface du vers (Dupré *et al.*, 1999) aboutirait ainsi chez les femmes à la sélection des cellules B ou T spécifiques de l'épitope C terminal.

Cette spécificité épitopique pourrait être une des caractéristiques de la maturité de la réponse immune anti-28GST et il apparaît relativement logique que ceci soit observé particulièrement chez les femmes. En effet, nous avons démontré, avant traitement, que les femmes avaient déjà développé une immunité spécifique IgA-dépendante, contrairement à la population masculine. La réponse immune vis-à-vis de cet antigène spécifique semble donc plus mature chez les femmes car l'apparition de cet isotype est souvent associée à une chronicité et à une maturité immunitaire au cours des infections parasitaires (Atkins *et al.*, 1997; Salinas *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 1985). Une nouvelle stimulation de cette immunité spécifique par un traitement au PZQ semble donc induire l'augmentation des IgA contre la protéine totale chez les hommes et une plus grande affinité de la réponse IgA vers la spécificité épitopique 190-211 chez les femmes. Nous avons précédemment démontré l'affinité particulière de la réponse IgA vis-à-vis de ce peptide qui se caractérisait par sa capacité fonctionnelle à neutraliser l'activité enzymatique de la Sm28GST (chapitre III; Remoué *et al.*, 2000).

Nous avons alors évalué la capacité des sérums à inhiber l'activité enzymatique de la Sh28GST (utilisée à 10 µg/ml dans ce test) après le traitement. Le pourcentage d'adultes positifs n'étaient que d'environ 12% à 5 semaines, sans aucune différence entre les hommes et les femmes. En revanche, une inhibition significative de la Sh28GST était détectée chez 22% des femmes et 14% des hommes, 6 mois après le traitement. Ces résultats semblent indiquer que l'inhibition GST est plus importante 6 mois après le traitement et en particulier chez les femmes. Comme escompté, la réponse IgA spécifique au peptide 190-211 jouerait un rôle prépondérant dans cette fonction neutralisante.

Nos résultats sur l'importante augmentation des IgA anti-28GST après traitement sont en accord avec une étude précédemment décrite chez des souris immunisées par la Sm28GST puis infectées par *S. mansoni* (Dupré *et al.*, 1999). Le traitement par le PZQ de ces souris induit l'apparition d'une réponse IgA spécifique associée à une forte inhibition de l'activité enzymatique GST. Cette synergie aboutit, de plus, au contrôle du développement de la pathologie et la survie des animaux. Dans notre étude sur les populations humaines, nous n'avons malheureusement pas effectué un contrôle de l'évolution de la pathologie avant et 6 mois après traitement (par échographie du tractus urinaire et de la vessie).

Néanmoins, ces résultats observés dans un modèle animal et confrontés à nos données dans les populations humaines, encouragent le développement d'une stratégie vaccinale avec la Sh28GST en l'association avec un traitement par le PZQ.

Effet du traitement : influence transitoire

Nous avons présenté les résultats des réponses IgG3 et IgA spécifiques 3 ans après le traitement de cette même population. A cette date, le niveau d'intensité d'infection était redevenu similaire à celui observé avant le traitement. Il en était de même pour les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST en fonction du sexe des individus infectés. Malgré quelques variations dans la significativité statistique, probablement dû à un faible nombre d'individus dans chaque groupe, la réponse IgG3 était en effet majoritaire chez les hommes tandis que l'isotype IgA était prépondérant dans la population féminine. Ce profil semblait ainsi similaire à celui observé avant le traitement, non seulement en fonction du sexe mais également en fonction de l'âge.

Ceci indique que la réponse immune acquise 3 ans après le traitement présente de nouveau un profil "classique". Dans cette population située dans un foyer de faible réinfection, le traitement par le PZQ a donc, au minimum, un effet jusqu'à 6 mois mais son influence sur la réponse immune spécifique ne semble pas s'exercer à long terme. Pour affiner nos résultats, il aurait été intéressant d'évaluer l'évolution de la réponse immune un an et deux ans après le traitement.

Le résultats présentés montrent l'orientation particulière des réponses IgG3 et IgA spécifiques à la Sh28GST après un traitement par le PZQ. La connaissance de cette régulation chez les adultes infectés par *S. haematobium* nous apporte d'importants renseignements sur l'évolution de la réponse immune spécifique au candidat vaccinal. En particulier, nous avons pu analyser l'effet d'une stimulation de l'immunité spécifique chez une population présentant au préalable une réponse immune anti-Sh28GST acquise. Ceci nous a permis d'évaluer cet effet avant la mise en place des essais cliniques de Phase II au cours desquels le traitement par le PZQ sera associé à la vaccination.

V) Réponse immune spécifique aux 28GST chez les enfants infectés: Effet du traitement par le praziquantel et influence de co-infections parasitaires

Les enfants âgés de 6 à 10 ans, infectés par *S. haematobium*, représentent la population cible des essais cliniques de Phase II au Niger et de Phase III (voir Introduction, chap. IV.4.5). Dans ces deux cas, un traitement par le praziquantel (PZQ) sera associé à la vaccination par la Sh28GST.

Au cours de l'étude pré-clinique, nous avons ainsi évalué l'effet du traitement sur la réponse immune spécifique à la Sh28GST chez des enfants infectés par *S. haematobium*.

Dans de nombreux pays en voie de développement, les enfants sont souvent exposés à de nombreuses infections parasitaires, bactériennes et virales. En particulier, le paludisme et la schistosomiase sont les deux parasitoses les plus répandues en Afrique.

La co-infection avec *Plasmodium falciparum* représente ainsi un problème majeur de santé publique dans les régions où l'infection bilharzienne est endémique, comme cela est notamment observé dans le Nord du Sénégal.

De plus, l'évolution épidémiologique des deux schistosomiasis majeures est particulière dans cette région. En effet, le nombre de foyers mixtes à *S. haematobium* et *S. mansoni* augmentent depuis quelques années et de fortes intensités d'infection y sont observées (Ernould et al., 1999; De Clercq *et al.*, 1999).

La présence d'un tel état multi-infectieux ne peut pas être anodin d'un point de vue immunologique et il est ainsi fort probable que le développement d'une réponse immune anti-parasitaire soit influencé par l'existence de co-infections.

Pour ces raisons, l'influence d'une co-infection bilharzienne ou celle d'une co-infection palustre sur la réponse immune anti-28GST a également été évaluée chez les enfants.

V.1) Effet du traitement par le PZQ sur la réponse immune anti-Sh28GST chez des enfants infectés par *S. haematobium*

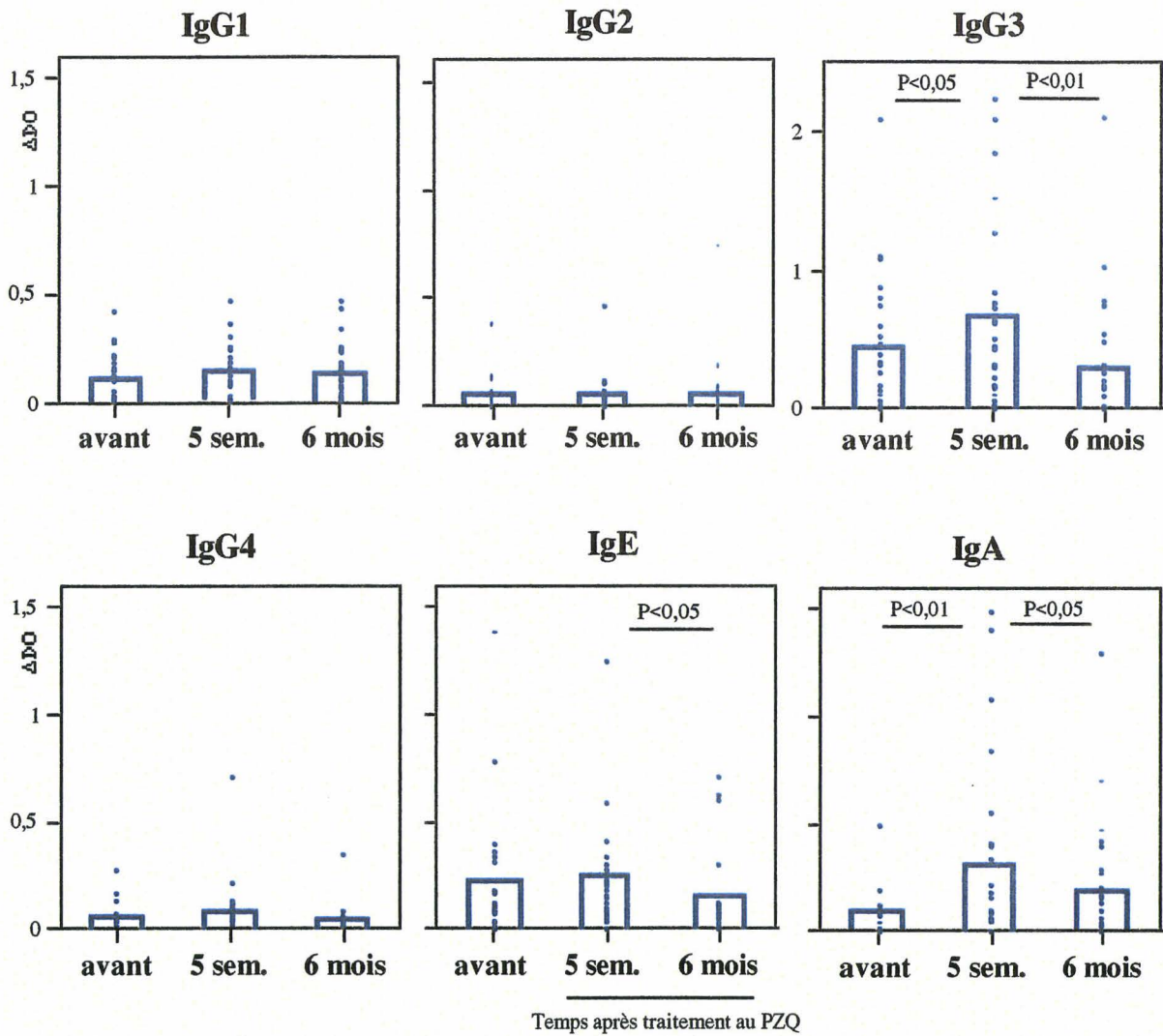
L'effet de la chimiothérapie a été évalué en comparant les résultats immunologiques obtenus avant l'administration du PZQ, 5 semaines (5 sem.) et 6 mois après traitement chez des enfants âgés de 8 à 15 ans (n=28) dans le village d'Ourou-Madiou.

Avant traitement, tous les enfants présentaient une filtration urinaire (FU) positive et l'intensité moyenne d'infection étaient de 22 oeufs/10 ml d'urine. Cinq semaines après le traitement, au moins 1 oeuf/10 ml d'urine (FU+) était retrouvé pour 36% des enfants alors que, 6 mois après le traitement, 46% étaient FU+. Néanmoins, le dosage des antigènes circulants (CAA) montrait que la grande majorité des enfants (78%) étaient trouvés positifs, 6 mois après le traitement. Comme nous l'avons décrit chez les adultes (Chap. IV), ce résultat suggère que cette population semble être réinfecté entre 5 semaines et 6 mois après traitement. Ceci peut être confirmé par les études malacologiques réalisées dans ce foyer d'infection démontrant la forte transmission de *S. haematobium* au cours de cette période (Shaw *et al.*, 1999).

La présence des anticorps spécifiques à la Sh28GST a été évaluée par ELISA (Annexe I). Les résultats sont présentés individuellement et en moyenne arithmétique et sont exprimés en $\Delta DO = ODx - ODn$. ODx représente la valeur de DO pour un individu infecté et ODn, la moyenne des valeurs obtenues pour 30 sérums contrôles de caucasiens.

Le test de Wilcoxon a été utilisé pour évaluer la significativité statistique de la comparaison entre les moyennes (données appariées).

Fig. V.1 : Réponse isotypique anti-Sh28GST (enfants 8-15 ans)



Aucune variation significative n'a été observée pour les réponses IgG1, IgG2 et IgG4. Les taux d'anticorps IgG3 et IgA spécifiques augmente significativement 5 semaines après traitement. A 6 mois les réponses IgG3, IgE et IgA sont significativement inférieures que celles observées 5 semaines après traitement.

Comme nous l'avions suggéré précédemment (Chap. IV), l'analyse réalisée à 5 semaines montre l'effet propre du traitement et la période entre 5 semaines et 6 mois correspondrait à une période d'exposition au parasite. Chez les enfants, la régulation des isotypes IgG3 et IgA est donc différente selon les deux périodes considérées. Le traitement au PZQ induit une augmentation de ces deux réponses isotypiques alors que l'effet inverse est observé au cours de la période d'exposition.

V.2) Effet d'une co-infection bilharzienne sur la réponse immunitaire anti-28GST chez les enfants infectés:

Au cours d'études épidémiologiques, réalisées dans le cadre du programme ESPOIR (équipe du Prof. J. Vercryusse - Université de Gand), un foyer récent d'infection mixte *S. mansoni*/*S. haematobium*, à dominance *mansoni*, a été identifié dans le village de Nder, situé sur les berges du Lac de Guiers (Picquet *et al.*, 1996). D'autre part, l'évolution épidémiologique de foyers mixtes (*S. haematobium* dominant) a été analysée dans la Région du Fleuve, particulièrement dans la région du bas Delta, situé à proximité du barrage de Diama. Cette étude a permis d'identifier le foyer de N'Diougue M'Beresse localisé à 35 km au nord-est de St-Louis.

Ces données parasitologiques nous ont permis d'entreprendre des études immuno-épidémiologiques chez des enfants mono-infectés par *S. mansoni* ou *S. haematobium* et doublement infectés. Nous avons focalisé notre étude sur ces deux foyers pour les raisons suivantes:

- Nder : mono-infection par *S. mansoni* versus double infection
- N'Diougue M'Beresse : mono-infection par *S. haematobium* versus double infection

Nous avons ainsi évalué l'influence de la co-infection par *S. haematobium* sur la réponse immunitaire anti-Sm28GST dans le village de Nder tandis que le foyer de N'Diougue M'Beresse nous permettait d'analyser l'effet d'une co-infection par *S. mansoni* sur la réponse humorale spécifiquement dirigée contre la Sh28GST.

V.2.1) Influence de la co-infection par *S. haematobium* sur la réponse immunitaire anti-Sm28GST:

Dans le village de Nder, l'étude épidémiologique a montré une forte prévalence (près de 100%) et une forte intensité d'infection à *S. mansoni* (moyenne géométrique = 589 EPG avec 35% des individus sécrétant plus de 1000 EPG). Ceci a été observé quel que soit l'âge des individus (De Clercq *et al.*, 1999). En revanche, la prévalence (28%) et l'intensité d'infection (moy. géo. = 6,3 oeufs/10 ml avec 2 % des individus avec FU > 50 oeufs/10 ml d'urine) étaient modérées pour *S. haematobium*.

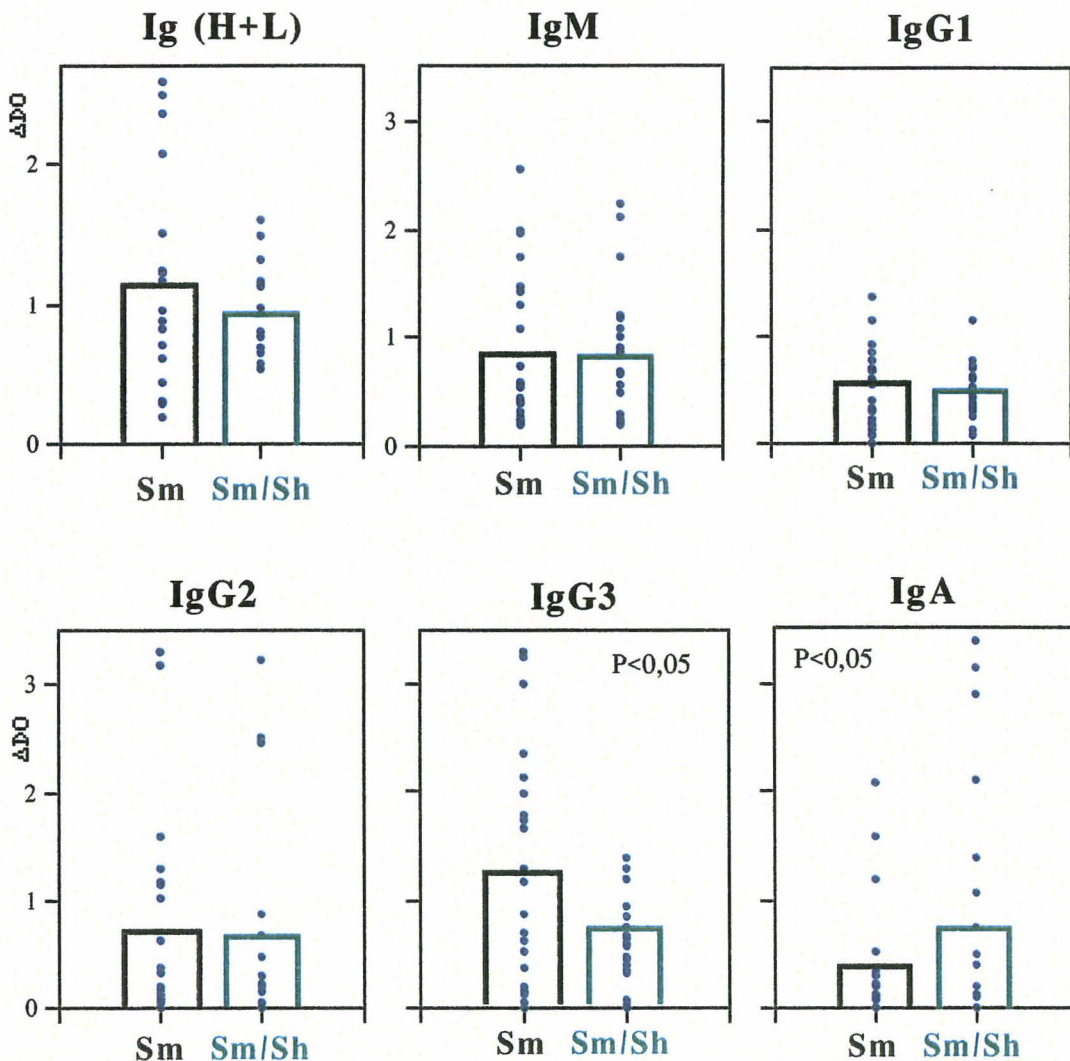
Dans la cohorte sélectionnée, l'évaluation de la réponse immune spécifique à la Sm28GST a été réalisée pour deux groupes d'enfants âgés de 8 à 15 ans:

- mono-infectés par *S. mansoni* (**Sm**) : n=23; intensité d'infection (moy géo) = 365 EPG
- double-infectés (**Sm/Sh**) : n=18; intensité d'infection Sm (moy.géo.) = 1060 EPG
intensité d'infection Sh (moy. géo.) = 5,6 oeufs/10 ml

La population Sm/Sh présentait une moyenne géométrique de l'intensité d'infection à *S. mansoni* significativement supérieure à celle observée dans la population mono-Sm ($P < 0,05$).

La réponse immune totale (Ig (H+L)) spécifique à la Sm28GST et le niveau des différents isotopes (sauf IgE) ont été évalués par ELISA (Annexe I). Les résultats (ΔDO) sont présentés individuellement et en moyenne arithmétique. Les différences statistiques entre les moyennes des deux groupes ont été évaluées par le test de Mann-Whitney.

Fig. V.2 : Réponse immune anti-Sm28GST - enfants (8-15 ans)



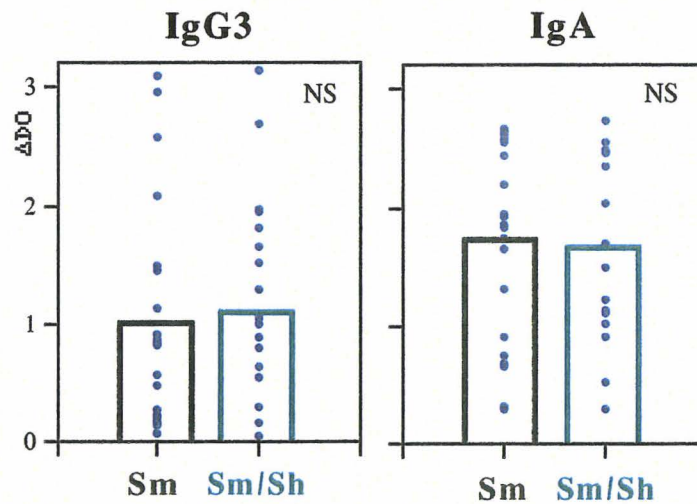
Aucune réponse IgG4 spécifique n'a été mise en évidence dans les deux groupes. La réponse totale anti-Sm28GST ainsi que le niveau des isotypes IgM, IgG1 et IgG2 ne sont pas différents en fonction des deux groupes d'infection. Le niveau des IgG3 spécifiques est significativement inférieur chez les enfants Sm/Sh, comparativement au groupe mono-infecté. A l'inverse, la réponse IgA est significativement plus élevée chez les enfants doublement infectés.

Le rôle d'une différence d'intensité d'infection pour *S. mansoni* entre les deux groupes ne peut pas être écarté pour expliquer la variabilité des réponses isotypiques anti-Sm28GST observée. En effet, la plus forte intensité dans le groupe Sm/Sh (moy. EPG = 1060), pourrait induire la production d'IgA spécifiques au dépend de l'isotype IgG3. Mais aucune différence dans la réponse Ig(H+L) spécifique n'a été observée entre les deux groupes. De plus, nous avons montré précédemment au cours de l'infection par *S. mansoni* (Chap. III) que la présence d'une forte réponse IgA spécifique n'était pas lié à une forte intensité d'infection. Au contraire, cette réponse isotypique était soit invariable en fonction de l'intensité (chez les hommes), soit majoritaire dans le groupe présentant une faible intensité (chez les femmes). D'autre part, aucune différence dans la réponse totale anti-Sm28GST n'a été détectée en fonction de l'intensité d'infection.

Il nous semble ainsi peu probable qu'une différence d'intensité d'infection pour *S. mansoni* intervienne dans la régulation des réponses IgG3 et IgA spécifiques observées.

La présence de la co-infection par *S. haematobium* semble donc réguler la balance IgG3/IgA en faveur de la production d'IgA anti-Sm28GST.

Nous nous sommes demandés si l'effet de la co-infection bilharzienne sur la réponse immune était spécifique à la Sm28GST ou pouvait se retrouver vis-à-vis des antigènes parasite totaux. Les réponses IgG3 et IgA dirigées contre le SWAP et le SEA ont alors été évaluées en fonction de ces deux mêmes groupes d'infection. Seule la réponse vis-à-vis du SEA est présentée ici car des résultats similaires ont été observés entre celle-ci et la réponse immune anti-SWAP (non montrés).

Fig. V.3 : Réponse IgG3 et IgA vis-à-vis d'antigènes totaux (SEA)

Nous observons ainsi qu'une co-infection bilharzienne n'a aucun effet sur la régulation des deux réponses isotypiques spécifiques aux antigènes parasitaires totaux. L'influence de cette co-infection sur la réponse immunitaire acquise est donc uniquement observée vis-à-vis de la Sm28GST.

V.2.2) Influence de la co-infection par *S. mansoni* sur la réponse immunitaire anti-Sh28GST:

Une étude complémentaire a été réalisée dans le village de Ndioungue M'Beresse. Contrairement à l'étude présentée ci-dessus, l'intensité d'infection à *S. mansoni* était relativement faible dans le groupe doublement infecté (moy. géométrique = 88 EPG avec 7% des enfants sécrétant plus de 1000 EPG) alors que ce foyer présentait une forte infection à *S. haematobium* (moy. geo. = 47,8 oeufs/10 ml avec 55 % des individus avec FU > 50 oeufs/10 ml).

Au sein de la cohorte étudiée, la réponse immunitaire spécifique à la Sh28GST a été comparée entre deux groupes d'enfants âgés de 7 à 14 ans:

- mono-infectés *S. haematobium* (**Sh**): n=17; intensité d'infection (moy géo) = 33,2 oeufs/10 ml
- double-infectés (**Sh/Sm**) : n=43; intensité d'infection Sh (moy. géo.) = 49,8 oeufs/10 ml
intensité d'infection Sm (moy. géo.) = 88,2 EPG

Dans cette population, aucune différence significative dans l'intensité d'infection à *S. haematobium* n'a été détectée entre les deux groupes.

Une étude immunologique (dosage des anticorps et production des cytokines) a été réalisée avant le traitement par le PZQ puis 1 et 6 mois après chimiothérapie. Dans cette même population, des paramètres biochimiques et hématologiques ont été dosés et l'évaluation des pathologies, hépatiques et urinaires, a été réalisée par échographie. Cette étude pré-clinique avait pour objectif d'évaluer ces différents paramètres chez des individus doublement infectés, population cible des essais vaccinaux de Phase IIa et IIb qui seront réalisées dans ce même village.

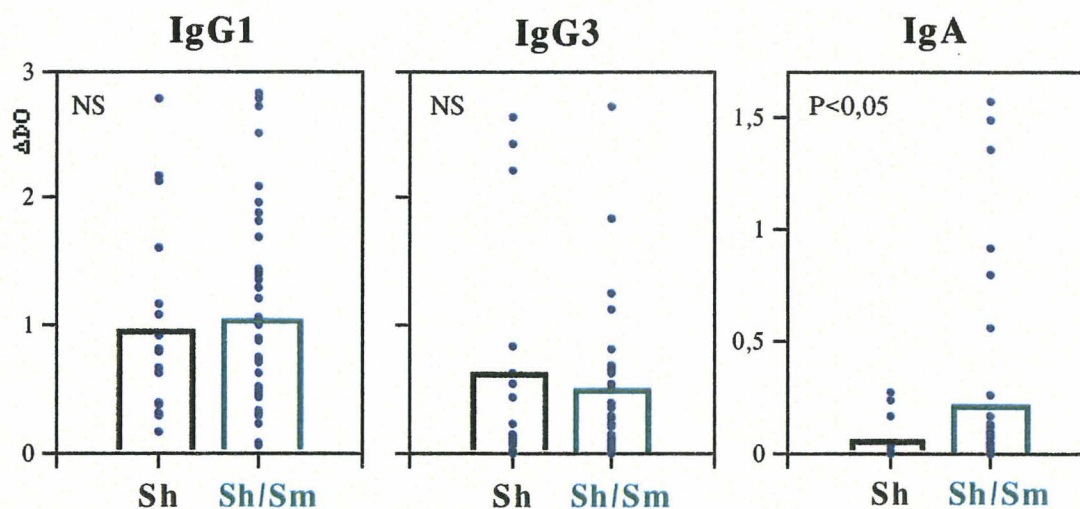
Au regard des résultats précédemment observés dans le village de Nder, nous avons focalisé notre attention sur l'influence de la co-infection bilharzienne sur les réponses isotypiques anti-Sh28GST. Seules les résultats obtenus avant traitement seront présentés ici.

Le taux des différents isotopes a été évaluée par ELISA (Annexe I).

Les résultats (ΔDO) sont présentés individuellement et en moyenne arithmétique.

Les différences statistiques entre les moyennes des deux groupes ont été évaluées par les test de Kruskal-Wallis après une analyse variance utilisant le test ANOVA.

Fig. V.4 : Réponse immune anti-Sh28GST (enfants 7-14 ans)



Aucune différence pour les réponses IgG1, IgG3 mais également IgG(H+L) et IgM (non montré) a été observée entre les deux groupes d'infection. En revanche, la moyenne de la réponse IgA anti-Sh28GST est significativement supérieure dans le groupe doublement infecté ($P<0,05$).

Nous avons évalué la réponse isotypique dirigée vis-à-vis du SEA dans cette même population et aucune différence n'est détectée quelque soit l'isotype (non montré).

Comme nous l'avons observé vis-à-vis de la Sm28GST (Nder), la co-infection bilharzienne induit également une augmentation de la réponse IgA spécifique à la Sh28GST. Cette variation

ne peut pas être attribuée à l'effet de l'intensité d'infection à *S. haematobium* différente (voir ci-dessus).

En revanche, nous ne retrouvons pas chez ces enfants la variation précédemment observée à Nder pour l'isotype IgG3. Un déséquilibre dans le nombre d'enfants entre les deux groupes (n=17 vs 44) pourrait être une des explications. Néanmoins, au regard de nos résultats, il semble que l'influence d'une co-infection par *S. mansoni* ou par *S. haematobium* sur l'infection hétérologue ne provoquent pas la même régulation de l'isotype IgG3.

L'ensemble de ces résultats montre que la co-infection bilharzienne induit uniquement l'augmentation de la réponse IgA spécifique aux deux 28GST (quelque soit sa nature : *S. haematobium* ou *S. mansoni*). Cet effet semble lié spécifiquement à la réponse immune anti-28GST car aucune variation isotypique n'a été détectée pour la réponse dirigée contre l'ensemble des antigènes parasitaires (SEA).

Le paludisme étant une infection prépondérante dans la Région du Fleuve Sénégal, nous avons évalué par la suite l'effet de cette co-infection sur la réponse immune spécifique.

V.3) Réponse immune anti-Sh28GST chez des enfants : influence de la co-infection par *Plasmodium falciparum*.

Dans la Région du Fleuve Sénégal, des études épidémiologiques menées par l'équipe du Professeur Vercryusse montrent que la transmission autrefois saisonnière de *P. falciparum* est désormais continue tout au long de l'année. Ceci est probablement dû à l'expansion de l'irrigation après la construction du barrage de Diama. Ainsi, les foyers d'infection palustre et bilharzienne sont géographiquement associés. L'augmentation de la prévalence de formes graves de neuro-paludisme observée dans la région du Fleuve pourrait être liée à la co-infection bilharzienne. En effet, certaines études du programme ESPOIR ont montré que la prévalence d'une telle co-infection pouvait atteindre près de 70% chez les enfants (village de Ndioungue M'Beresse). Il est même probable que cette prévalence soit proche de 100% dans certains foyers de la Région du Fleuve.

Le rôle de la balance entre les cytokines pro/anti-inflammatoires ou de type Th1/Th2 dans l'immunité anti-malaria semble controversé puisque ces deux types de profil immunitaire peuvent être associés aux accès palustres graves (Ho *et al.*, 1998; Elghazali *et al.*, 1997). En effet, il est reconnu que la pathogénèse est associée à la présence de fort taux de TNF α et d'IFN γ , mais ces cytokines peuvent également jouer un rôle important dans la réponse immune

protectrice au cours des phases initiales de l'infection (Omer *et al.*, 2000). La production de ces cytokines pro-inflammatoires semblent dépendre de la cinétique de l'infection palustre. En effet, le $TNF\alpha$, l' $IFN\gamma$ et l'IL-1 sont fortement sécrétées au cours des stades précoces (stade pré-érythrocytaire) et leur production serait ensuite régulée par la présence d'IL-10 au cours des phases chroniques (Richards *et al.*, 1997). Mais, la présence simultanée d' $IFN\gamma$ et d'IL-10 a été montrée chez des patients infectés par *P. falciparum* en phase aiguë (Wenish *et al.*, 1995), et une forte réponse IgE spécifique (marqueur d'un profil Th2) semble plus fréquemment retrouvée dans les formes neurologiques de paludisme (Perlman *et al.*, 1994).

L'IL-10, l'IL-4 et le $TGF\beta$ semblent jouer un rôle central dans la régulation de l'immunité anti-paludéenne, non seulement en inhibant la production de cytokines inflammatoires mais également en favorisant une réponse anticorps protectrice (Omer *et al.*, 2000; Wenish *et al.*, 1995).

Ces quelques exemples montrent la capacité de l'infection palustre à orienter le profil immunitaire et soulignent l'importance d'évaluer l'influence d'une telle co-infection sur la réponse immune spécifique aux schistosomes. En particulier, de forts taux d' $IFN\gamma$ et de $TNF\alpha$ observés au cours de l'infection palustre pourraient avoir une action néfaste sur le développement de la pathologie bilharzienne. En effet, il a été démontré chez l'homme que des taux élevés de ces deux cytokines inflammatoires étaient associés à la présence d'une hépatosplénie, caractéristique d'une forte morbidité bilharzienne (Mwatha *et al.*, 1998).

Dans notre étude, l'effet de la co-infection palustre a été analysé vis-à-vis de la réponse humorale spécifique à la Sh28GST, chez des enfants infectés par *S. haematobium*. Dans l'objectif d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase, il est crucial de comprendre l'influence immunologique d'une infection palustre dans la population cible des essais cliniques de Phase II et III.

Cette étude a été réalisée dans le village d'Ourou-Madiou (cohorte présentée dans le Chap. I).

L'intensité d'infection pour *S. haematobium* (FU) est indiquée par la moyenne géométrique du nombre d'oeufs/10 ml d'urine. La présence de *P. falciparum* a été observée après un frottis sanguin et une goutte épaisse (l'intensité d'infection n'a pas été mesurée).

La réponse immune spécifique a été comparée entre deux groupes (enfants âgés de 8 à 15 ans):

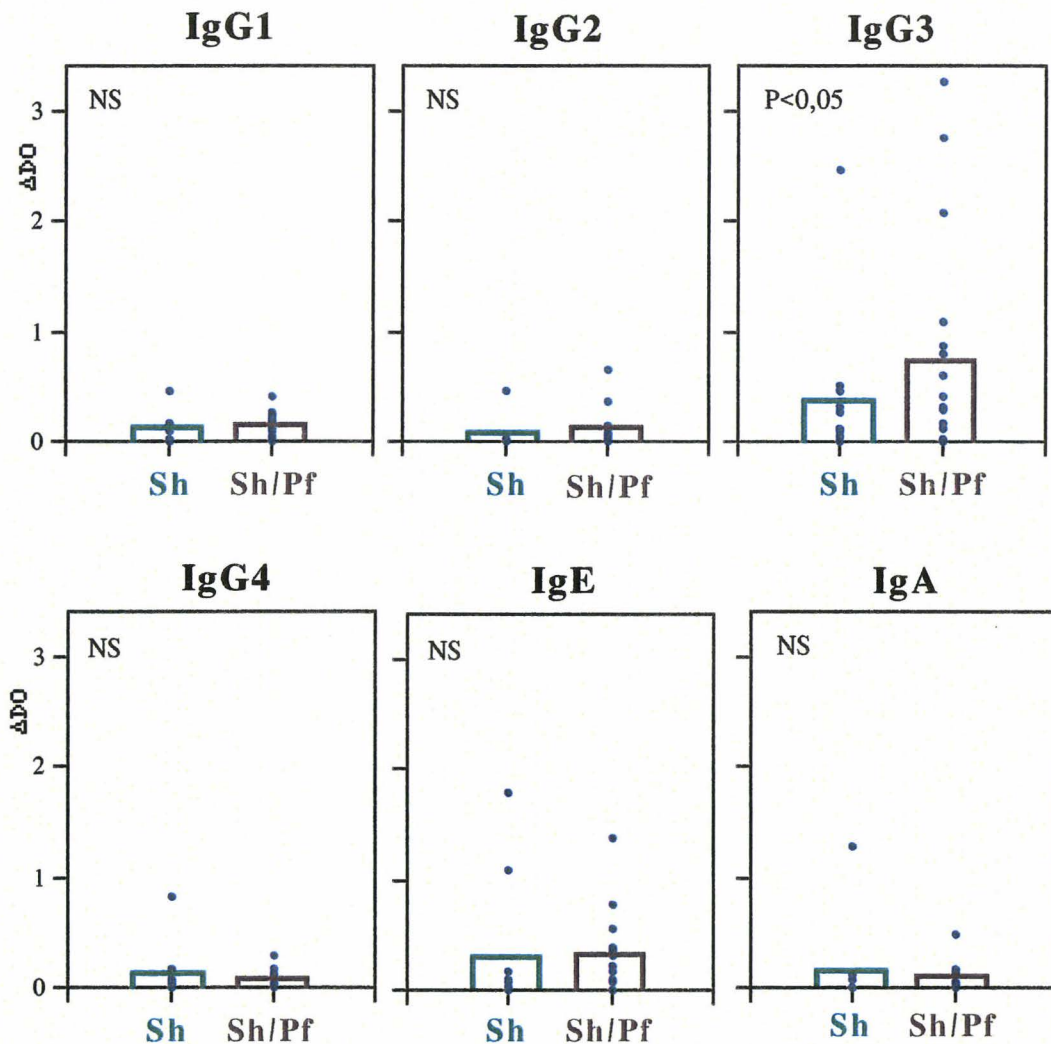
- mono-infectés par *S. haematobium* (Sh) : n=14; FU = 30,6
- doublement infectés par *S. haematobium* et *P. falciparum* (Sh/Pf) : n=18; FU = 15,12

L'intensité d'infection pour *S. haematobium* était similaire entre ces deux groupes (test de Mann-Whitney).

Le niveau des différents isotypes a été évalué par ELISA (Annexe I).

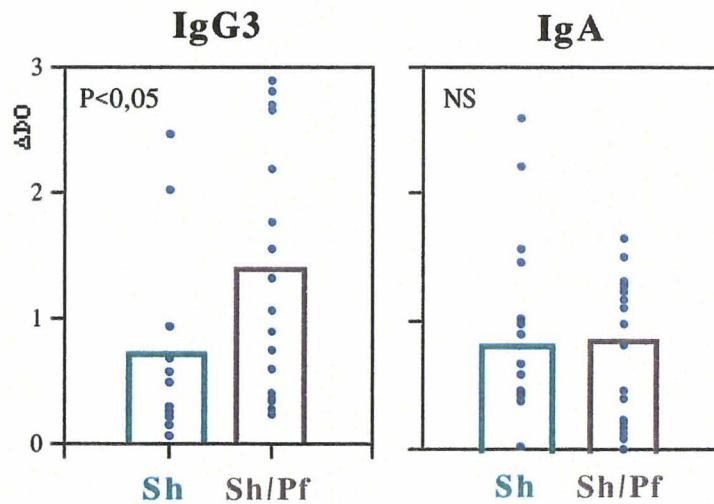
Les résultats (Δ DO) sont présentés individuellement et en moyenne arithmétique et les différences statistiques entre les moyennes de chaque groupe ont été évaluées par le test de Mann-Whitney.

Fig. V.5 : Réponse isotypique anti-Sh28GST (enfants 8-15 ans)



Aucune différence entre les deux groupes d'infection n'a été observée pour les isotypes IgG1, IgG2, IgG4, IgE et IgA. Seule la réponse IgG3 spécifique est significativement plus élevée chez les individus co-infectés par *P. falciparum*.

Nous nous sommes alors demandés si la co-infection palustre pouvait également influencer la réponse immune dirigée contre l'ensemble des antigènes parasitaires. Les réponses IgG3 et IgA anti-SEA ont été évaluées en fonction de ces deux groupes d'infection.

Fig. V.6 : Réponse IgG3 et IgA anti-SEA (enfants 8-15 ans)

La réponse IgG3 spécifique du SEA est significativement supérieure chez les enfants doublement infectés alors qu'aucune variation de la réponse IgA n'a été observée entre les deux groupes d'infection.

L'ensemble de ces résultats indiquent que la co-infection par *P. falciparum* semble orienter uniquement la réponse IgG3 spécifique aux antigènes de schistosome. Cet effet est observé non seulement vis-à-vis des antigènes totaux (SEA) mais également spécifiquement à l'antigène Sh28GST. Cette influence ne peut pas être attribuée à une différence d'intensité d'infection à *S. haematobium* entre les deux groupes.

V.4) Résumé et discussion : Maturation de la réponse immune anti-28GST chez les enfants infectés.

Dans ce chapitre, nous avons montré que plusieurs facteurs étaient capables d'orienter différemment la réponse immune spécifique aux 28GST:

- le traitement au PZQ, suivi d'une période d'exposition au parasite
- la co-infection bilharzienne ou palustre

Nous avons focalisé notre attention sur les enfants pour trois raisons principales.

- (1) Cette population est la plus touchée par les infections bilharziennes et palustre
- (2) Ils représentent la population cible de la vaccination anti-bilharzienne et l'évaluation de l'effet de ces différents facteurs immunorégulateurs est cruciale.

(3) A cet âge pré-pubert, l'effet des hormones sexuelles sur la réponse immune anti-Sh28GST est peu probable, comme nous l'avons suggéré dans le Chapitre I. L'effet du traitement ou de la co-infection sur l'immunité spécifique serait alors indépendant de toute régulation hormonale.

V.4.1) Effet du traitement au PZQ chez les enfants :

Cette étude chez les enfants a été réalisée dans le même foyer d'infection que celle présentée chez les adultes dans le chapitre IV. L'objectif principal était de comparer l'effet du traitement entre ces deux populations qui ne présentaient pas le même type de réponse immune spécifique avant chimiothérapie. Pour rappel, nous avons en effet démontré que les réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST étaient majoritaires chez les adultes comparativement aux enfants infectés par *S. haematobium* (Fig. I.2).

Il est reconnu que l'efficacité du PZQ dépend de l'intensité de la réponse immune spécifique de l'hôte infecté (Fallon *et al.*, 1992). Dans notre étude, une présence d'oeufs dans les urines étaient détectée chez 36% des enfants 5 semaines après le traitement, et chez 46%, 6 mois après chimiothérapie. A l'inverse chez les adultes, la prévalence d'infection était nulle à 5 semaines (en terme d'oeufs dans les urines).

Ceci semble confirmer de nombreuses données épidémiologiques indiquant que l'efficacité du PZQ est plus faible chez les enfants que chez les adultes. Au regard de nos résultats, une faible intensité de la réponse immune spécifique à la Sh28GST, observée chez les enfants, pourrait être une des explications à ce phénomène.

L'effet propre du traitement au PZQ sur la réponse isotypique anti-Sh28GST a été évalué en comparant les résultats obtenus avant et 5 semaines après traitement. Chez les enfants comme chez les adultes (Fig. IV.1), l'administration du PZQ induit une augmentation des réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST tandis qu'aucune variation pour les autres isotypes n'a été observée. Avant le traitement, les taux sériques de ces deux isotypes étaient extrêmement faibles chez les enfants, contrairement aux adultes. Le développement de cette réponse immune spécifique semble donc s'acquérir avec l'âge au cours de l'infection par *S. haematobium*. L'effet d'un traitement par le PZQ chez les enfants pourrait accélérer l'apparition de cette immunité spécifique acquise naturellement au cours des années.

Ce phénomène a précédemment été décrit chez des enfants infectés par *S. haematobium* au Zimbabwe, mais vis-à-vis de la réponse immune spécifique aux antigènes parasitaires totaux (Mutapi *et al.*, 1998). Les auteurs montrent qu'un traitement au PZQ induit l'augmentation des IgG1 anti-SEA au détriment de la réponse IgA, profil immunitaire naturellement observé chez les adultes au cours de l'infection. Dans notre étude, la variation isotypique après le traitement des enfants est tout à fait différente soulignant la spécificité de la réponse immune dirigée contre

la Sh28GST. Cependant, ceci devra être confirmé par l'évaluation des réponses isotypiques vis-à-vis du SEA.

Les résultats de Mutapi *et al.* (1998) sont présentés 5 semaines après le traitement et la même régulation immunitaire semble encore plus marqué 6 mois après chimiothérapie. Mais dans notre étude, la comparaison des données obtenues à 5 semaines et 6 mois après le traitement montre que le niveau des réponses IgG3, IgE mais également IgA anti-Sh28GST chutent au cours de cette période (Fig. V.1). Au cours de ce temps de réinfection, un effet similaire a été observé chez les adultes mais une différence importante était observée. En effet, seule la réponse IgA spécifique restait stable pendant la période de réinfection chez les adultes (Fig. IV.1).

Six mois après traitement, 78% des enfants de notre cohorte étaient positifs en CAA, et une légère augmentation de la prévalence d'infection (en terme d'oeufs dans les urines) était détectée entre 5 semaines et 6 mois après PZQ (de 36 à 46%). En plus des données malacologiques précédemment décrits dans ce foyer qui montrent une forte transmission au cours de cette même période (Shaw *et al.*, 1999), nos résultats parasitologiques semblent confirmer que les enfants se sont réinfectés rapidement (moins de 6 mois après le traitement).

L'effet d'un traitement par le PZQ suivi d'une période de réinfection semble donc induire une régulation similaire de la réponse immune spécifique chez les enfants et les adultes. Cependant, seule une différence dans la réponse IgA spécifique est observée entre les adultes et les enfants au cours de la période de réinfection. En effet, la réinfection chez l'enfant n'a pas induit la stimulation de la réponse IgA spécifique que nous avons observé chez les adultes.

Cette variabilité est probablement lié à une différence de maturation de la réponse immune spécifique entre les enfants et les adultes et nous pouvons ainsi imaginer que la stimulation de l'immunité anti-Sh28GST par un facteur tel que le traitement, resterait relativement faible chez l'enfant.

L'ensemble de ces résultats montre l'importance du choix des enfants comme population cible des essais cliniques. En effet, la réponse immune anti-Sh28GST peut être stimulée chez des enfants infectées par *S. haematobium* et l'effet de cette stimulation semble induire un profil isotypique pouvant être associé à l'acquisition d'une protection contre le parasite (voir chap. I et III).

V.4.2) Maturation différente selon le type de co-infections?

Chez les enfants infectés par *S. haematobium*, les deux types de co-infection majeures dans la région du Fleuve Sénégal n'induisent pas la même orientation de la réponse immune spécifique à la Sh28GST. En effet, une co-infection bilharzienne induit une maturation de la réponse immune spécifique vers un profil isotypique IgA tandis que l'effet d'une co-infection par *P. falciparum* se traduit par une augmentation des IgG3 spécifiques à la Sh28GST.

Effet de la co-infection bilharzienne :

Peu de données épidémiologiques sont décrites dans la littérature à propos d'infections mixtes à *S. haematobium* et à *S. mansoni*. De tels foyers ont été retrouvés en Egypte (Manson-Baher *et al.*, 1987), au Cameroun (Robert *et al.*, 1989) et récemment dans le village de Nder par une équipe du Programme ESPOIR (De Clercq *et al.*, 1999). Chez la souris, il a été montré qu'une co-infection par *S. haematobium* modulait la formation du granulome bilharzien induit par les oeufs de *S. mansoni* exacerbant la pathologie hépatique (Jacobs *et al.*, 1999). Dans la région du Fleuve Sénégal, J-C Ernould *et al.* (1999) ont montré une augmentation de l'intensité d'infection à *S. mansoni* après le traitement au PZQ des individus doublement infectés. Ce type de co-infection pourrait ainsi représenter un problème majeur de santé publique dans les zones d'endémies.

Cependant, aucune étude immunologique évaluant l'influence de ce type de co-infection n'est connue chez l'homme

La particularité des deux foyers mixtes, décrits dans notre étude, était leur complémentarité en terme de co-infection bilharzienne. En effet, le foyer de Nder présentait une forte intensité d'infection à *S. mansoni* associée à une faible présence de l'espèce *S. haematobium* tandis que la balance infectieuse était inversée dans la population de Ndioungue M'Beresse. Ceci nous donnait l'opportunité d'évaluer, dans chaque cas, l'effet d'une co-infection par *S. haematobium* ou *S. mansoni* sur la réponse immune hétérologue.

Dans les deux cas, la co-infection bilharzienne régule la réponse immune anti-28GST en l'orientant vers l'isotype IgA. Aucune variation pour les autres isotypes n'a été observée, hormis les IgG3 dirigés contre la Sm28GST dans le foyer de Nder. En effet, les enfants doublement infectés présentaient un taux sérique plus élevé d'IgG3 spécifiques, comparativement au groupe mono-infecté par *S. mansoni*. Plusieurs explications pourraient être avancées. D'une part, les deux groupes étaient déséquilibrés en terme d'effectifs dans la population de Ndioungue M'Beresse (Sh: n=17; Sh/Sm n=44) ce qui ne permettrait pas d'évaluer d'une manière satisfaisante la réponse IgG3, dans le groupe mono-infecté. D'autre part, la particularité de la réponse immune spécifique à la Sm28GST dans ce foyer et/ou une

plus forte influence de la co-infection par *S. haematobium* sur l'immunité pourraient également intervenir.

Pour le foyer de Nder, la co-infection bilharzienne semble agir sur la balance isotypique IgG3/IgA en faveur d'une réponse IgA anti-28GST. Nous avons précédemment décrit cette régulation isotypique liée à l'effet du traitement au PZQ chez les adultes infectés par *S. haematobium* (Chap. IV). Cette orientation particulière de la réponse immune anti-28GST semble être caractéristique d'une maturation de la réponse spécifique. En effet, la présence de l'isotype IgA est souvent associée à la chronicité de l'infection parasitaire induisant la forte maturité de la réponse immune spécifique (Atkins *et al.*, 1997; Salinas *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 1985). Ceci sera discuté ultérieurement dans un contexte général (Discussion générale et Perspectives).

La Sm28GST et la Sh28GST partagent 90 % d'homologie de séquences en acides aminés (Trottein *et al.*, 1992). Nous ne pouvons donc pas écarter le fait que des anticorps spécifiques à la Sh28GST vont reconnaître également la Sm28GST et inversement, comme nous l'avons d'ailleurs montré dans le chapitre I dans la population infectée par *S. haematobium* à Ourou-Madiou. Néanmoins nous ne mettons pas en évidence une différence quantitative de la réponse globale dirigée contre la 28GST entre les enfants co-infectés et les enfants mono-infectés mais uniquement une différence qualitative. Par exemple dans le village de Nder, les individus co-infectés par *S. haematobium* et *S. mansoni* ne présentent pas une réponse Ig (H+L) plus élevée que les enfants uniquement infectés par *S. mansoni*. Seule une différence dans les réponses IgG3 et IgA anti-Sm28GST est observée entre les deux groupes indiquant que cette co-infection influence uniquement une régulation qualitatif du profil isotypique de la réponse immune spécifique.

L'influence des cytokines intervenant dans cette régulation isotypique pourrait être prépondérante. Ainsi, le TGF β et l'IL-10 interviennent en synergie dans l'induction de la production des IgA (Defrance *et al.*, 1992). Aucune étude de la production des cytokines n'a été réalisé dans la population de Nder. En revanche, nous avons évalué la production des cytokines après stimulation *in vitro* par la Sh28GST des cellules mononuclées du sang, chez les enfants de la cohorte de Ndioungue M'Beresse (technique du "sang total" mise au point au laboratoire de Sor).

Comme nous l'avons observé précédemment (chap. I), la production de cytokines spécifique à la Sh28GST est très faiblement détectée chez les enfants infectés par *S. haematobium*. Néanmoins, la production moyenne de TGF β semble plus importante dans le groupe doublement infecté comparativement aux enfants mono-infectés ($47,1 \pm 46,3$ vs $35,7 \pm 32,5$ pg/ml, respectivement). Cette différence n'est pas significative mais les effectifs entre les deux groupes ne sont pas équilibrés comme nous l'avons signalé plus haut. Aucune différence n'a été détectée pour la production d'IFN γ , de TNF α , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-13.

Effet de la co-infection par *P. falciparum* :

Chez des enfants infectés par *S. haematobium* (village d'Ourou-madiou), la présence du paludisme semble réguler positivement la seule réponse IgG3 spécifique aux antigènes de schistosomes. Contrairement à ce que nous avons observé précédemment dans le cas d'une co-infection bilharzienne, la co-infection palustre est capable d'orienter à la fois la réponse immune anti-SEA et anti-Sh28GST.

Il est à noter que l'effet d'une telle co-infection a été également évalué chez les enfants infectés par *S. haematobium* dans la cohorte de Ndioungue M'Beresse (prévalence de co-infection palustre de 69%). Les résultats n'ont pas été présentés dans ce chapitre car les deux groupes d'infection étaient composés d'un très faible effectif (Sh: n=8; Sh/Pf: n=9). Néanmoins, la réponse IgG3 anti-Sh28GST était également plus importante chez les enfants doublement infectés (moy. $\Delta DO = 0,98 \pm 0,69$) comparativement aux enfants uniquement infectés par *S. haematobium* (moy. $\Delta DO = 0,56 \pm 0,51$). Bien que cette différence ne soit pas significative, l'influence de la co-infection palustre semble provoquer la même régulation de la réponse immune spécifique à la Sh28GST dans cet autre foyer.

Une infection par *P. falciparum* est connue pour induire la production majoritaire des isotypes IgG1 et IgG3, notamment vis-à-vis des antigènes spécifiques MSP 1 et 2 (Merozoite Surface Protein), deux des candidats vaccinaux les plus prometteurs (Taylor *et al.*, 1995; Nguer *et al.*, 1997). La présence de ces deux isotypes cytophiliques et capables de fixer certaines molécules du complément, pourrait prévenir l'invasion des érythrocytes par les parasites et ainsi compromettre le cycle asexué de *P. falciparum*.

Une étude en Gambie indique cependant que les réponses IgG3 et IgG1 spécifiques à MSP2 ne semblent pas jouer un rôle similaire dans l'immunité protectrice (Taylor *et al.*, 1998). En effet, la présence des IgG3 spécifiques, majoritaire chez les adultes, semble être associée à la résistance au neuropaludisme tandis qu'une forte réponse IgG1 anti-MSP2 était prépondérante chez les patients présentant des formes graves. Ces résultats suggèrent que l'acquisition de la réponse IgG3 spécifique pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'immunité protectrice, et ceci d'un point de vue clinique.

Le rôle de l'IL-10 dans la production des isotypes IgG1 et IgG3 par les cellules B a été démontré chez l'homme (Brière *et al.*, 1994). Chez des adultes infectés par *P. falciparum* au Sénégal, Garraud *et al.* (1999a) ont démontré le rôle spécifique de cette cytokine dans la sécrétion des IgG spécifiques du fragment C-terminal de la protéine MSP1, nommé MSP1₁₉, représentant un des candidats vaccinaux majeurs vis-à-vis des stades sanguins de l'infection. Ce même effet a été également observé après stimulation *in vitro* de cellules B provenant de patients

sains (Garraud *et al.*, 1999b). Une forte présence d'IL-10 circulante étant détectée dans le sang de patients infectés (Peyron *et al.*, 1994), ces auteurs suggèrent que la production des IgG1 et des IgG3 spécifiques est fortement régulée par l'IL-10 au cours de l'infection palustre.

Dans la cohorte de Wourou-Madiou, la production des cytokines a été évalué après stimulation *in vitro* par la Sh28GST ou le SEA des PBMC des enfants mono-infectés ou co-infectés par *P. falciparum* (non montrés). Cette production spécifique chez les enfants était relativement faible quelque soit la cytokine étudiée. Néanmoins, la production d'IL-10 spécifique au SEA était majoritaire dans le groupe doublement infecté ($86,62 \pm 49,7$ ng/ml vs $61,35 \pm 21,54$ ng/ml). Une telle différence n'était pas observée pour les autres cytokines étudiées (IFN γ , TNF α , IL-12 et IL-5). La co-infection palustre pourrait donc favoriser la production d'IL-10 spécifique intervenant dans l'augmentation de la réponse IgG3 dirigée contre les antigènes parasitaires totaux du schistosome.

En revanche, aucune différence dans la production d'IL-10 spécifique à la Sh28GST n'a été observée entre les deux groupes d'infection. Ce même résultat est obtenu pour le TNF α , l'IL-6 et le TGF β . Par contre, une production plus élevée d'IFN γ est observée chez les enfants doublement infectés (130 ± 180 vs 30 ± 40 pg/ml). Mais cette différence n'est pas significative avec le test de Mann-Whitney ($P < 0,05$ par le test ANOVA), probablement dû au faible nombre de "positifs" et à de fortes variations individuelles dans chaque groupe.

Il a été décrit dans de nombreuses infections humaines induisant une réponse de type Th1 (Syphilis, Rubéole, Virus Syncytial Respiratoire), et en particulier dans la Borreliose à *B. burgdorferi* (maladie de Lyme), que la forte présence d'IFN γ était associée à une réponse isotypique majoritairement IgG3 (Widhe *et al.*, 1998). Le rôle de cette cytokine sur la régulation des IgG3 reste cependant controversé chez l'homme et semble dépendre de l'infection étudiée.

Dans le cas d'une co-infection par *P. falciparum*, l'augmentation de la réponse IgG3 anti-Sh28GST pourrait être associée à la régulation IFN γ -dépendante. Bien que non montrée vis-à-vis de la Sh28GST, l'influence de l'IL-10 ne peut pas être écartée car sa forte production a été détectée vis-à-vis du SEA dans le groupe doublement infecté. De plus, des taux élevés d'IFN γ et d'IL-10 sériques sont retrouvés chez les mêmes patients au cours de l'infection palustre aiguë (Wenish *et al.*, 1995). Une coopération entre ces deux cytokines pourrait ainsi intervenir dans la régulation de la production des IgG3 spécifiques au cours d'une co-infection plasmodium/schistosomes.

L'influence d'une co-infection bilharzienne sur la réponse immune spécifique aux antigènes de *P. falciparum* pourrait également être évaluée chez des individus doublement infectés. Ces perspectives sont à la base d'un projet intitulé "Neuropaludisme : approches épidémiologiques, expérimentales et pharmacologiques" (responsable: Prof. M. Capron, INSERM U167) accepté

par le programme VIHPAL (Ministère de l'éducation nationale, de la recherche et de la technologie).

En particulier, il serait intéressant d'analyser l'effet de la co-infection par *S. haematobium* sur la réponse immune spécifique aux antigènes MSP1 et MSP2 développée au cours de l'infection palustre et qui présente la particularité d'être associée à une réponse anticorps de type IgG3.

La présence d'une co-infection induit ainsi un profil de réponse immune anti-28GST variable selon le type de co-infection étudiée. De plus, la co-infection bilharzienne semble orienter spécifiquement l'immunité dirigée contre les 28GST alors que celle par *P. falciparum* régulerait les réponses vis-à-vis de l'ensemble des antigènes du schistosome.

Dans les pays en voie de développement, la présence endémique de co-infections, en particulier du paludisme, pourrait être retrouvée dans la plupart des foyers d'infection à *S. haematobium*.

Au cours de futurs essais cliniques, l'influence de l'agent palustre sur la réponse immune dirigée contre un antigène vaccinal devra être prise en compte non seulement lors de l'évaluation de l'immunogénicité du candidat vaccin mais également lors de l'étude de l'efficacité vaccinale.

VI) Essai clinique "Bilhvax" de Phase 1a :

Résultats d'immunogénicité

L'essai clinique a été réalisé au Centre d'Investigation Clinique (CIC) du CHR de Lille, sous la responsabilité du Professeur Ch. Libersa. Dans cette étude, l'investigateur était l'Institut Pasteur de Lille (investigateur principal: Prof. A. Capron), le promoteur était la Délégation Régionale à La Recherche (Nord-Pas de Calais). L'étude a été financée par l'INSERM.

C'est une étude en simple aveugle, monocentrique, contrôlée et randomisée chez 3 groupes de volontaires sains.

Après les études de toxicologie réalisées par la société CERB montrant la parfaite innocuité de la préparation vaccinale Bilhvax chez l'animal (Introduction, chap. IV.4.5), le premier essai clinique chez l'homme concernant un vaccin anti-bilharzien a débuté courant 1998.

Les dates importantes concernant la mise en place et la réalisation de cette étude sont indiqués ci-dessous:

- 30/06/97 : Avis favorable du Comité Technique du CIC
- 07/10/97 : Avis favorable du CCPPRB de Lille (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale)
- 28/04/98 : Avis favorable de l'Agence du Médicament
- 15/06/98 : Premières présélections des sujets
- 22/09/98 : Inclusion du premier sujet
- 28/09/98 : Première administration chez le premier sujet
- 22/06/99 : Fin de l'essai clinique au CIC
- 22/09/99 : Contrôle et validation des résultats d'innocuité (CIC) et d'immunogénicité
- 01/10/99 : Levée des codes

Objectifs de l'étude :

L'objectif principal de la Phase 1a était d'évaluer l'innocuité de la préparation vaccinale chez des volontaires sains. L'immunogénicité est l'objectif secondaire de cet essai clinique et a pour but d'évaluer la réponse immune humorale et cellulaire induite après administration du candidat vaccinal.

- Innocuité : Cette partie clinique a été réalisée au CIC de Lille.

La présence d'effets indésirables immédiats, ou à long terme, après administrations a été évaluée par l'observation des critères cliniques suivants: tolérance locale, régionale et générale;

observation de la fréquence cardiaque et respiratoire; suivi des paramètres biologiques tout au long de l'étude (hématologie, biochimie).

- Immunogénicité :

L'induction d'une réponse immune anti-Sh28GST après vaccination a été évaluée pour les réponses anticorps et cellulaire spécifique:

(1) Réponse anticorps : dosage des différents isotypes et évaluation de l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST par les anticorps

(2) Réponse cellulaire : prolifération des cellules mononuclées et dosage des cytokines immunorégulatrices dans les surnageants de culture après stimulation *in vitro* par la Sh28GST. Ces études ont été réalisées par la technique du "sang total" qui ne nécessite pas la purification des PBMC et permet d'utiliser une quantité de sang moins importante.

VI.1) Protocole de l'étude :

Produits utilisés:

La Sh28GST présente dans la préparation vaccinale est une protéine recombinante produite à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, selon les normes GMP (Good Manufacturing Practices), par la société Eurogentec (Belgique). La préparation vaccinale se présentait sous forme lyophilisée.

L'adjuvant utilisé est l'hydroxyde d'aluminium (Alun, Al_2O_3 , Alhydrogel 2 %; Superfros Biosector, Suède). Cet alun fait partie des adjuvants pouvant être utilisés chez l'homme pour les préparations vaccinales (Pharmacopée Européenne, Editions 1998). La solution d'alun a servi à la fois d'excipient à la Sh28GST (reconstitution de la Sh28GST lyophilisée avant l'administration) et de placebo (Alhydrogel 2 %).

Critères d'inclusion des sujets:

Les sujets caucasiens étaient de sexe masculin, âgés de 18 à 30 ans. Ils ne présentaient pas de paramètres cliniques, biologiques perturbés (évaluation au CIC). Lors d'un bilan de pré-inclusion, nous nous sommes également assurés que les sujets ne présentaient pas d'anticorps anti-Sh28GST.

Protocole d'administrations:

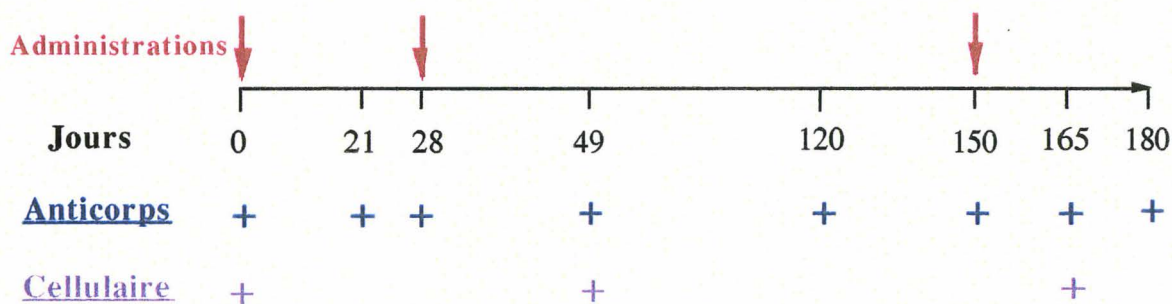
L'étude a été réalisée sur 3 groupes de volontaires sains répartis ainsi:

- 8 sujets recevant uniquement l'adjuvant (Alun) - sujets Placebo
- 8 sujets recevant la préparation vaccinale Sh28GST à une dose de 100 µg par administration et par individu
- 8 sujets recevant la préparation vaccinale Sh28GST à une dose de 300 µg par administration et par individu

L'administration de la préparation vaccinale ou du placebo a été réalisée par voie sous-cutanée (région deltoïdienne; 0,5 ml/injection).

Dans ce chapitre, aucune donnée concernant les paramètres cliniques et biologiques ne seront présentés. Ces résultats ont été "gelés" avant la levée des codes et sont actuellement en cours d'analyse statistique. Cependant, aucune réaction néfaste n'a été observée chez les sujets, ayant reçu le placebo ou la préparation vaccinale.

Les administrations et les jours de prélèvements sanguins pour l'étude d'immunogénicité sont présentés sur le schéma ci-dessous pour le groupe vacciné (100 µg x 3) et le groupe placebo (Alun x 3) :



Le protocole initial prévoyait uniquement deux administrations. Suite à l'observation d'une absence complète de réactions secondaires, la décision de réaliser une troisième injection de Sh28GST pour la dose de 100 µg a été prise. Dans ce groupe, 6 sujets ont participé au protocole jusqu'à son terme (J180). Une troisième administration de la solution d'alun a également été effectuée chez 7 sujets du groupe Placebo.

Une troisième administration n'a pas été réalisée chez les sujets ayant reçu la Sh28GST à la dose de 300 µg et la fin des prélèvements se situait donc à J120. Pour ce groupe, les résultats d'immunogénicité ne seront pas présentés ici car deux administrations à une dose de 300 µg ont induit une réponse immune spécifique (anticorps et cellulaire) similaire à celle observée avec deux administrations de la dose 100 µg.

VI.2) Réponse humorale spécifique induite après administrations:

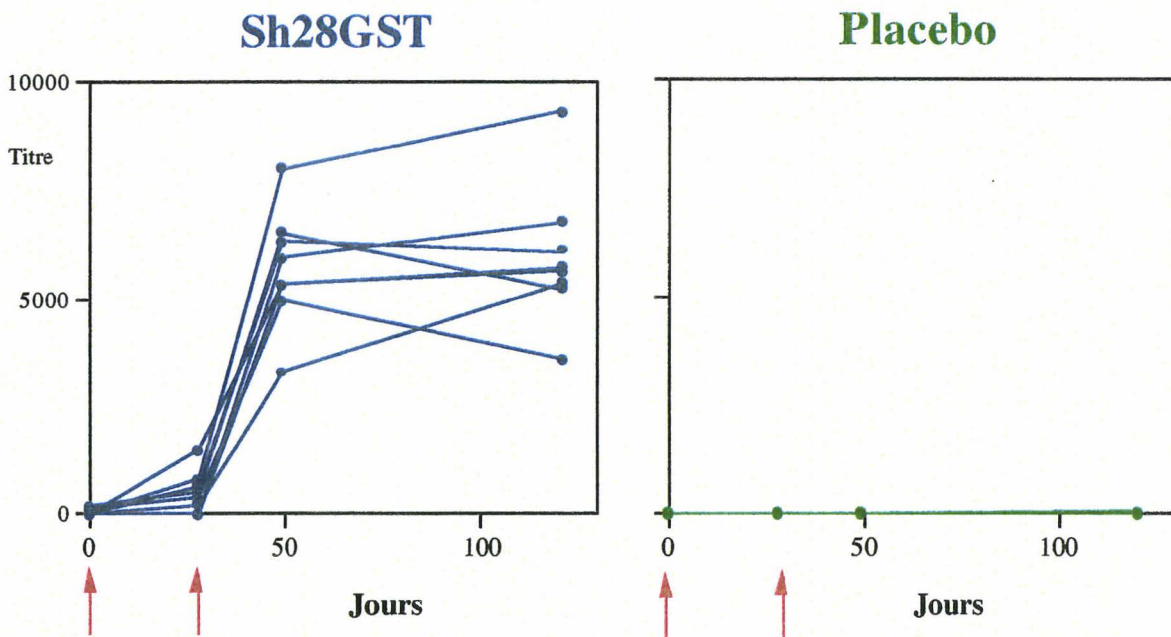
VI.2.1) Résultats après deux administrations :

La réponse isotypique a été évaluée sur les deux groupes suivants :

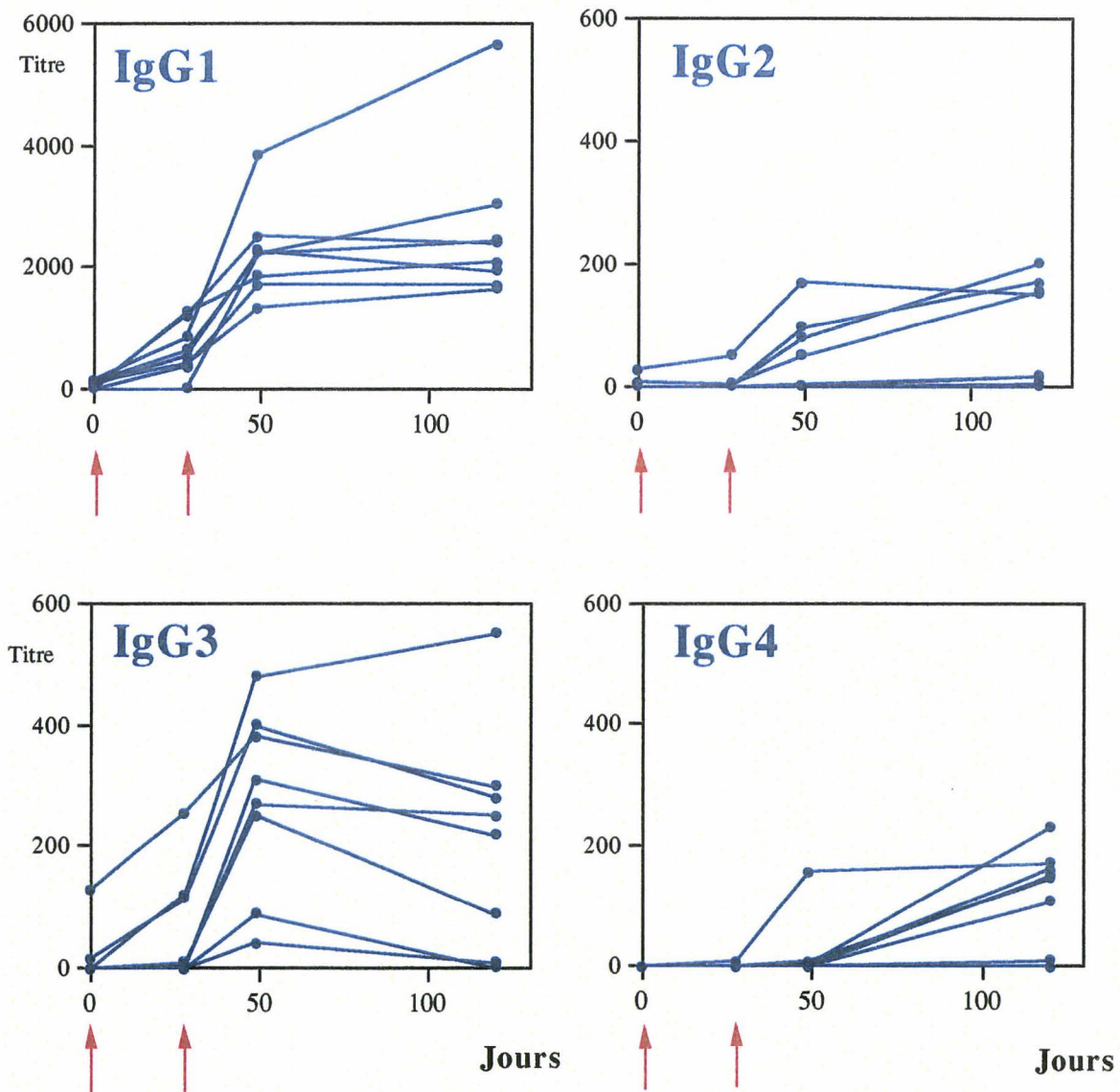
- groupe Sh28GST: deux administrations - dose 100 µg de rSh28GST + Alun
- groupe Placebo : deux administrations - Alun seul

Le dosage de la réponse IgG anti-Sh28GST et des différents isotypes a été réalisé par ELISA (Annexe X) et est représenté par le titre en anticorps pour chaque sujet. Les tests statistiques comparant les moyennes entre chaque jours ont été évaluées par le test de Mann-Withney (données appariées).

Fig. VI.1 : Réponse IgG anti-Sh28GST après deux administrations



Une seule administration de la Sh28GST a induit une faible mais significative production d'IgG spécifique ($P < 0,05$ - J0/J28). Une forte augmentation de la réponse IgG anti-Sh28GST est observée 21 jours (J49) après la seconde injection (J28) chez les 8 patients immunisés ($P < 0,05$ - J28/J49). La réponse immune induite est relativement homogène entre tous les patients et reste stable plus de deux mois de J49 à J120. En revanche, aucune présence d'IgG spécifique n'a été détectée dans le groupe Placebo.

Fig. VI.2 : Réponse isotypique anti-Sh28GST (groupe Sh28GST)

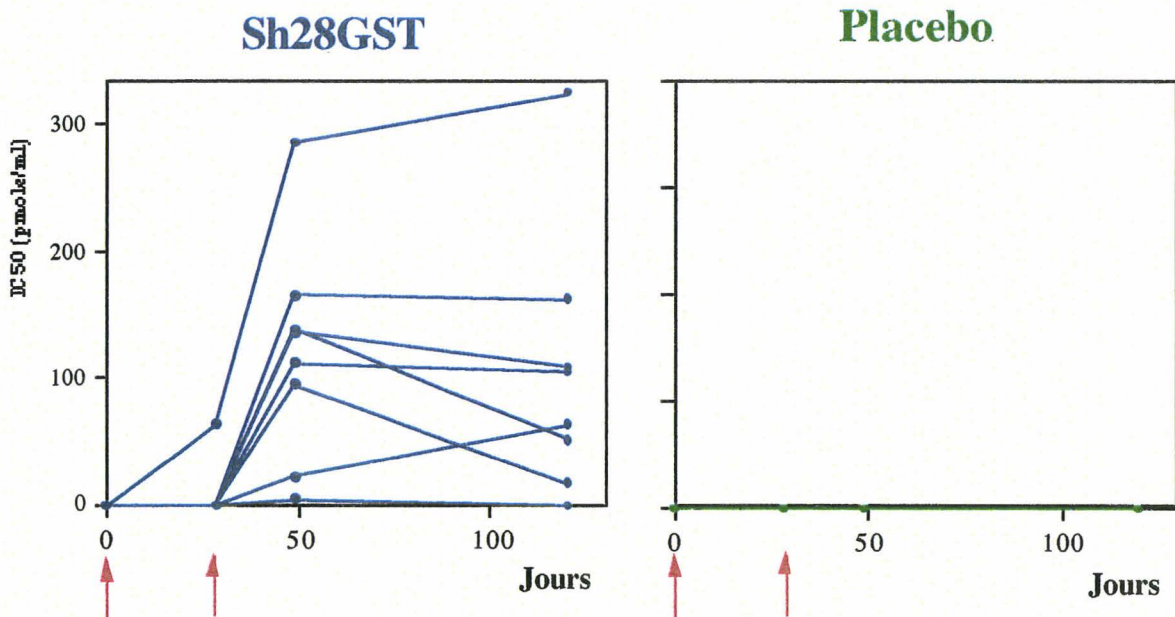
Bien que les 4 sous-classes soient induites après deux administrations, leur intensité respective et la cinétique de leur apparition ne sont pas identiques. En effet, les titres en anticorps pour l'isotype IgG1 sont plus élevés (échelle à 6000) par rapport aux autres isotypes (échelle à 600). Cette réponse IgG1 est homogène chez tous les sujets à J49 et ne semble pas évoluer jusqu'à J120 (excepté pour 1 sujet). L'induction d'une réponse IgG3 anti-Sh28GST est également observée à J49, chez les 8 individus vaccinés ($P < 0,05$). Cette réponse isotypique apparaît hétérogène et la présence de ces anticorps décroît entre J49 et J120 ($P < 0,05$). Il est à noter qu'une seule administration de la Sh28GST induit une réponse IgG1 significative chez 7 sujets sur 8 ($P < 0,05$) et IgG3 chez 3 sujets. En revanche, les titres des IgG2 et IgG4 sont peu élevés et ces deux isotypes ne sont pas induits chez tous les patients (4/8 pour IgG2; 6/8 pour IgG4). De plus, la réponse IgG4 n'apparaît qu'à J120 (excepté un seul sujet à J49). Le dosage des IgA sera présenté ultérieurement.

Aucune production de l'isotype IgE n'a pu être observée. Dans le groupe Placebo, aucune présence d'anticorps spécifique n'a été détectée et ceci, quelque soit l'isotype.

L'inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST a été évaluée en présence de chaque sérum des sujets du groupe vacciné ou placebo (Annexe XI). L'inhibition est calculée en pourcentage selon la formule : $100 - (Y \times 100 / Z)$. Pour le même sujet: Y représente l'activité enzymatique de la Sh28GST en présence du sérum du sujet après immunisation (J28 à J120) et Z, l'activité de la Sh28GST en présence du sérum à J0.

Ces tests d'inhibition sont réalisés en utilisant différentes concentrations de Sh28GST (2 à 20 µg/ml) ce qui permet d'exprimer les résultats par une IC50 (pmole/ml). L'IC50 correspond à la quantité de Sh28GST dont l'activité enzymatique est inhibée à 50% pour 1 ml de sérum. Cette technique permet un calcul plus fiable puisque les résultats obtenus sont dose-dépendants. Les résultats individuels sont présentés pour le groupe ayant reçu la dose de 100 µg et le groupe placebo.

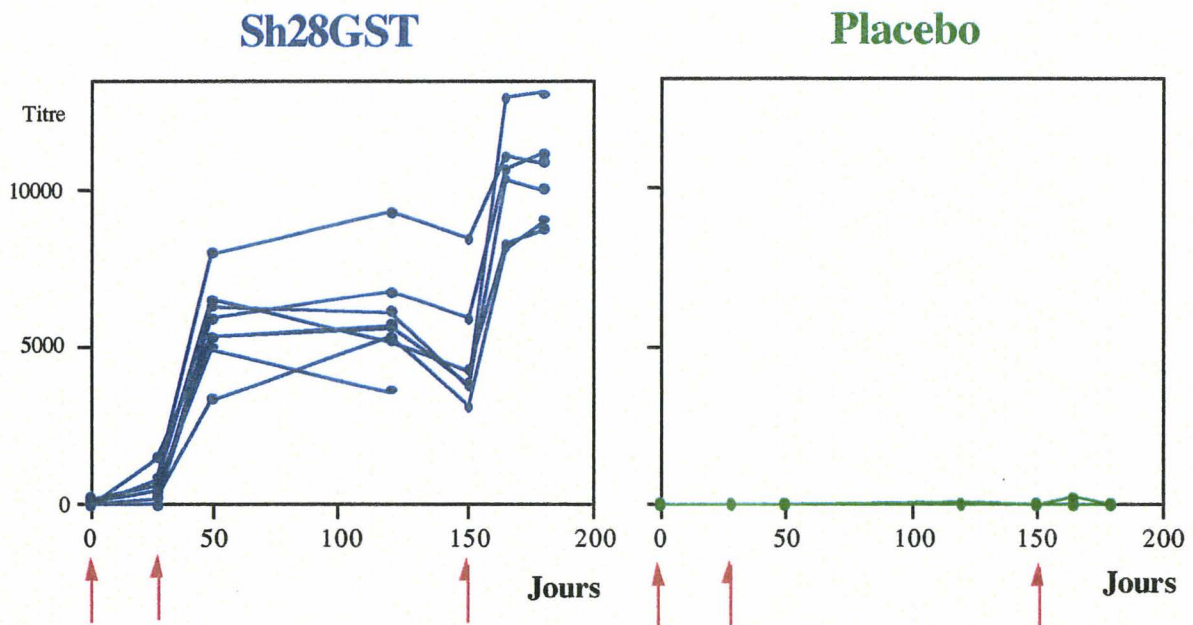
Fig. VI.3 : Inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST



Seul un sujet vacciné présente une inhibition significative après une seule administration (J28) qui augmente après la seconde injection. Une inhibition de l'activité GST n'est seulement détectée qu'à la suite de la seconde administration (J49) chez les 7 autres patients vaccinés ($P < 0,05$ - J0/J49). Deux mois après cette seconde administration (J120), l'inhibition est observée chez 7 patients indiquant que la capacité fonctionnelle des anticorps spécifiques semble rester stable au cours de cette période. En revanche, aucune inhibition de la Sh28GST n'est observée dans le groupe Placebo.

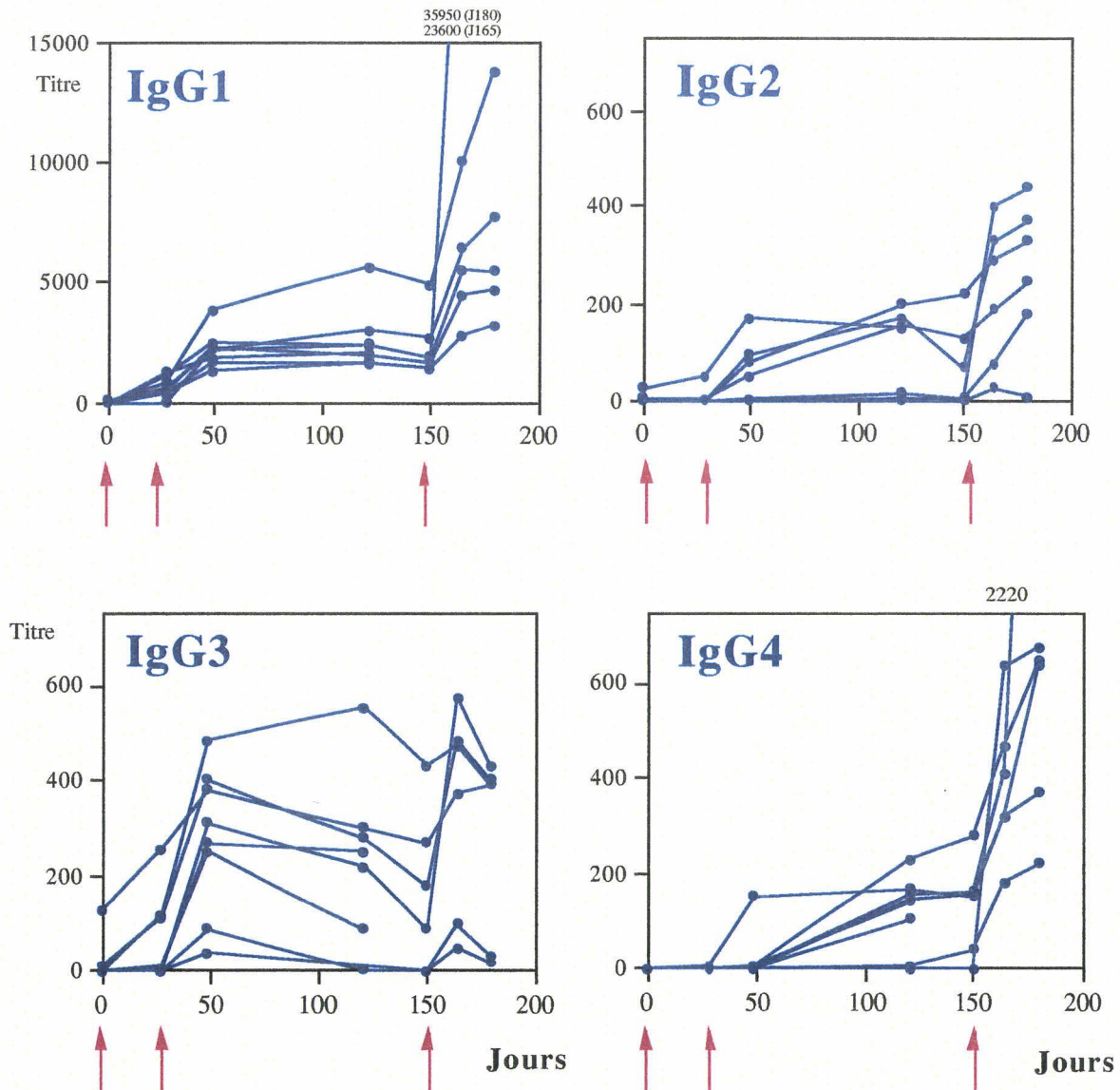
VI.2.2) Effet d'une troisième administration :

La préparation vaccinale (dose 100 µg de rSh28GST + Alun) ou l'alun seul a été administré à J150 pour 6 sujets du groupe Sh28GST ou 7 sujets du groupe placebo.

Fig. VI.4 : Réponse IgG anti-Sh28GST

La troisième administration de la Sh28GST induit une augmentation importante de la réponse IgG spécifique chez 5 sujets ($P < 0,05$ - J150/J165). Pour le sujet qui présentait le plus fort niveau d'anticorps à J150, l'augmentation existe mais est moins marquée.

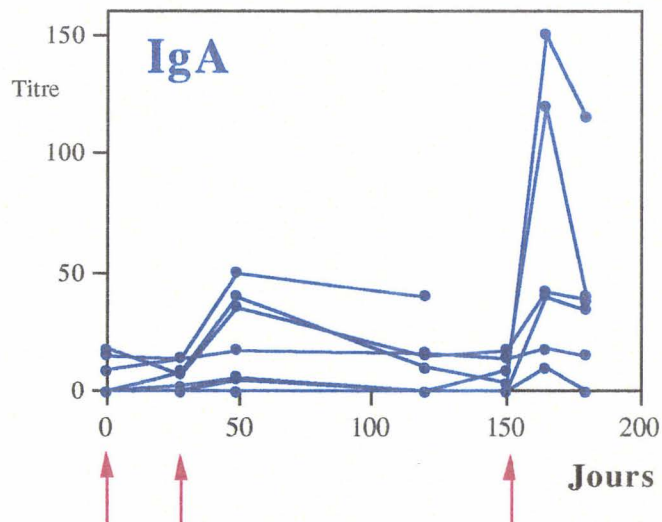
De J165 à J180 (dernier prélèvement du protocole), les titres d'IgG spécifiques se stabilisent.

Fig. VI.5 : Réponse isotypique anti-Sh28GST - groupe Sh28GST

De fortes augmentations des réponses IgG1, IgG2 et IgG4 sont observées chez les 6 sujets, ayant reçu la troisième administration ($P < 0,05$ - J150/J165). La réponse IgG1 est nettement majoritaire d'un point de vue quantitatif. Pour cet isotype, deux patients présentent un niveau de réponse particulièrement très élevé à J180. Une augmentation des réponses IgG2 et IgG4 est observée à J180, mais les titres sont très inférieurs à ceux observés pour les IgG1.

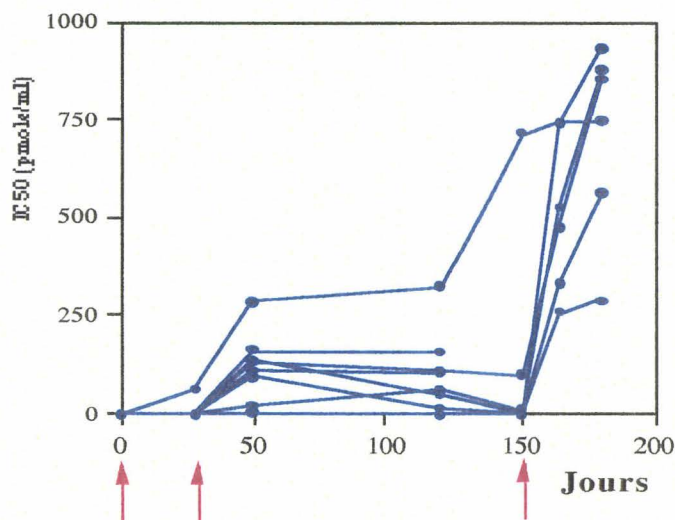
La troisième administration induit une augmentation significative des réponses IgG3 anti-Sh28GST ($P < 0,05$ - J150/J165), mais d'une manière hétérogène (très faible pour 3 sujets mais relativement nette pour les 3 autres). Ceci confirme la diversité des réponses IgG3 déjà observée après deux administrations.

Aucune production des différents isotypes n'est observée de J150 à J180 dans le groupe placebo. Aucune production d'IgE n'a été mise en évidence après la troisième administration de la Sh28GST.

Fig. VI.6 : Réponse IgA anti-Sh28GST après trois administrations

Comparativement aux isotypes IgG, la réponse IgA induite après deux ou trois administrations est faible en intensité (titre < 160). Sa présence est détectée à J49 chez 3 sujets ($P < 0,05$ - J0/J49) et elle augmente à J165 chez 4 sujets ($P < 0,05$ - J150/J165). Cette augmentation est particulièrement marquée pour 2 sujets (titre > 100).

Aucune présence d'IgA spécifique n'a été détecté dans le groupe placebo.

Fig. VI.7 : Inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST

Une forte augmentation de l'inhibition de l'activité GST est observée 15 jours après la troisième administration pour 5 sujets ($P < 0,05$ - J150/J165). Elle augmente encore entre J165 et J180 ($P < 0,05$). Cependant, la troisième injection n'a pas d'effet chez le sujet présentant la plus forte inhibition à J150. Si chez 4 sujets, l'inhibition enzymatique n'était plus détectée à J150, une forte IC50 était de nouveau observée à J165, après la dernière administration.

L'ensemble de ces résultats démontre l'immunogénicité de la préparation vaccinale et la capacité des anticorps induits à neutraliser l'activité enzymatique de la Sh28GST.

Cette propriété fonctionnelle des anticorps est détectée chez tous les sujets immunisés dès la seconde administration. L'effet d'une troisième administration provoque non seulement la forte augmentation des sous-classes IgG mais également l'apparition de l'isotype IgA, l'ensemble étant associé à une forte inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST à J165 et J180.

Nous avons alors recherché si le profil de la réponse isotypique anti-Sh28GST observé pouvait être associé à la production de cytokines particulières après stimulation *in vitro* des cellules mononuclées du sang par la Sh28GST.

VI.3) Réponse cellulaire spécifique induite après administrations:

La réponse cellulaire a été évaluée après mise en culture du sang des sujets prélevés à J0, J49 et J165 (voir Annexe XII).

Après numération de la formule sanguine (résultat transmis par le CIC), le même nombre de cellules mononuclées (lymphocytes + monocytes) pour chaque échantillon a été mis en culture en présence de trois concentrations de Sh28GST (3, 10 et 30 µg/ml). Le BCG et la Concanavalline A (ConA) ont été utilisés comme témoins positifs de l'expérience. Le dosage des cytokines a été effectué dans les surnageants de culture après 3 jours (J3) et 5 jours (J5) de stimulation antigénique.

VI.3.1) Lymphoprolifération après stimulation par la Sh28GST :

Après 3 jours de stimulation avec la Sh28GST, aucune lymphoprolifération spécifique n'a été mise en évidence à J0, J49 et J165, et ceci quelque soit la concentration utilisée. En revanche, la présence du BCG et particulièrement celle de la ConA ont induit une forte stimulation de la prolifération cellulaire chez l'ensemble des sujets (non montré).

VI.3.2) Production des cytokines spécifique de la Sh28GST:

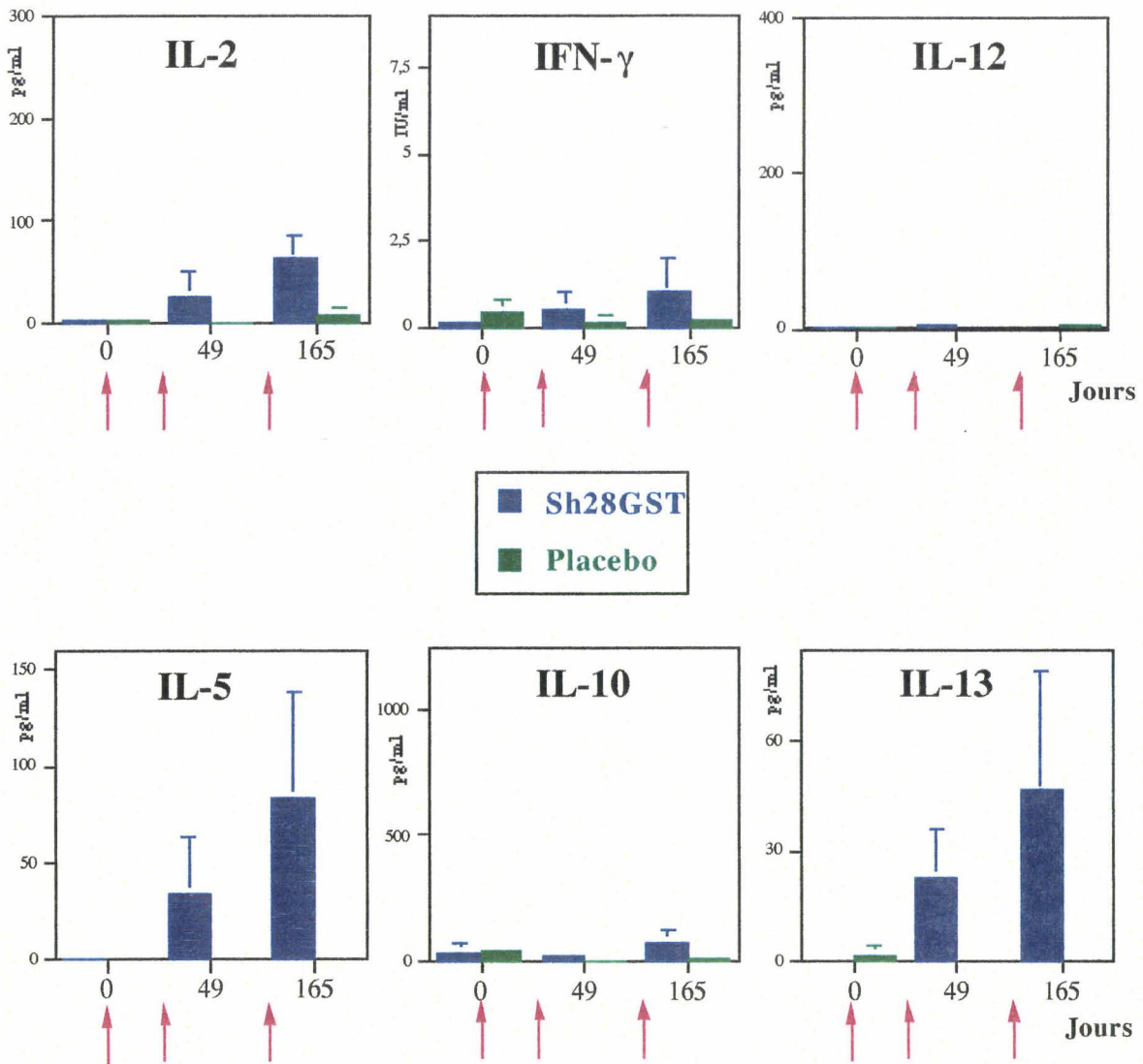
La présence de cytokines appartenant à des profils immunitaires différents a été évaluée:

- Cytokines de type Th1 : IL-2, IFN γ et IL-12
- Cytokines de type Th2 : IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13
- Autres cytokines: TGF β

Nous ne présenterons ici que les résultats obtenus après 3 jours de culture (J3) en présence de 10 µg/ml de Sh28GST. En effet, les données obtenues après 5 jours de cultures et/ou en

présence de 30 µg/ml de Sh28GST sont comparables. Seule la présence de 3 µg/ml de Sh28GST en culture (J3 et J5) a induit de plus faible production de cytokines (non montré). Le dosage des cytokines dans les surnageants a été réalisé en utilisant les kits Immunotech (Marseille, France). Après soustraction des valeurs détectées en l'absence d'antigène (= milieu seul avec cellules), les résultats sont exprimés en pg/ml ou en IU/ml (IFN γ) et sont présentés en moyenne arithmétique pour chaque groupe (6 sujets pour le groupe Sh28GST et 7 sujets placebo).

Fig. VI.8 : Productions des cytokines spécifique à la Sh28GST



Aucune production d'IL-4, de TGF β (non montrés) et d'IL-12 a été mise en évidence après stimulation par la Sh28GST. La très faible présence d'IL-10 à J165 dans le groupe Sh28GST n'est pas différente de celle observée à J0 (NS).

Une très faible sécrétion d'IL-2 est observée à J49 mais n'est détectée que chez un seul sujet immunisé (NS - J0/J49). Après la troisième administration de la préparation vaccinale, la

sécrétion de cette cytokine augmente et est observée chez 4 sujets sur 6 ($P < 0,05$ - J49/J165 et J0/J165). Tandis qu'aucune production significative d'IFN γ n'est détectée à J49, la présence de cette cytokine semble augmenter à J165 (seulement chez 3 sujets immunisés) mais la différence avec J0 ou J49 n'est pas significative.

Contrairement au groupe placebo, une production d'IL-5 et d'IL-13 spécifique est détectée après deux administrations de Sh28GST ($P < 0,05$ - J0/J49). La troisième administration induit une augmentation de la production de ces 2 cytokines, chez les 4 sujets qui présentaient déjà à J49 une sécrétion significative de ces 2 cytokines ($P < 0,05$ - J49/J165). Pour les 2 autres sujets du groupe Sh28GST, la présence de ces interleukines n'a pas été mise en évidence à J49 et J165.

L'ensemble de ces résultats montre que le profil immunitaire induit par l'administration de la Sh28GST serait de type Th2 associé à une importante production d'IL-5 et d'IL-13, concomitante avec l'absence ou la très faible présence des cytokines de type Th1. La production de ces cytokines Th2 est observée dès J49 et augmente fortement 15 jours après la troisième administration.

VI.4) Reconnaissance de la Sh28GST native et des GST des différentes espèces de schistosomes par les anticorps induits après immunisation:

Dans ce chapitre, des résultats préliminaires seront présentés concernant la capacité des anticorps anti-Sh28GST à reconnaître:

- la Sh28GST présente dans les vers de schistosome
- les 28GST de *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. bovis*

Cette étude a été réalisée par l'évaluation de l'activité enzymatique GST en présence des sérums des sujets vaccinés ou placebo. Le dosage des anticorps spécifiques n'a pas encore été effectué.

VI.4.1) Inhibition de l'activité enzymatique GST de vers adultes:

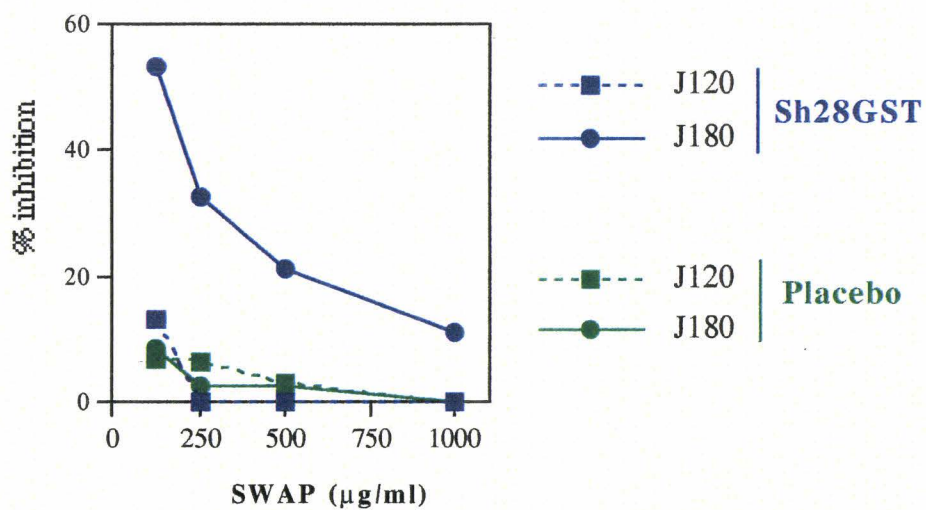
Les tests d'inhibition, présentés précédemment, avaient été réalisés en présence de la même protéine Sh28GST recombinante utilisée dans la préparation vaccinale.

Nous avons voulu savoir si les anticorps anti-Sh28GST induits après immunisation avaient également la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de la GST native présente chez les parasites adultes. Les sérums des sujets du groupe vacciné ou du groupe Placebo ont été

regroupés sous forme de "pool" et ont été incubés *in vitro* en présence de différentes concentrations d'antigènes totaux parasitaires (SWAP). Les résultats sont présentés en % d'inhibition calculé pour chaque pool de sérum selon la formule: $100 - (Y \times 100 / Z)$. Y représente l'activité enzymatique GST dans le SWAP en présence du pool de sérum après administrations (J120 à J180) et Z, l'activité GST dans le SWAP en présence du sérum à J0.

La valeur IC50 n'ayant pas pu être calculée, les % d'inhibition sont exprimés en fonction de différentes concentrations de SWAP (125 à 1000 µg/ml). Il est à noter que cette expérience a été réalisé sur le SWAP provenant de l'espèce *S. mansoni*, seule espèce disponible dans notre laboratoire.

Fig. VI.9 : Inhibition de l'activité enzymatique GST présente dans le SWAP



Aucune inhibition significative de l'activité enzymatique n'a été observé en présence des sérums du groupe placebo et du groupe ayant reçu deux administrations de la Sh28GST (J120). En revanche, une forte inhibition de l'activité GST est observée après la troisième administration de la préparation vaccinale (J180), et ceci pour la plus faible concentration de SWAP (125 µg/ml). Ce pourcentage d'inhibition chute logiquement en fonction d'une concentration croissante de SWAP mais reste supérieur à celui observé pour le groupe placebo ou à J120 pour le groupe ayant reçu deux doses de Sh28GST.

Ces résultats montrent que les anticorps induits après une troisième administration de Sh28GST ont la capacité d'inhiber l'activité enzymatique des GST provenant des vers adultes. Ceci suggère que les anticorps spécifiques ont la propriété de reconnaître la 28GST native présent chez le parasite.

L'activité GST mesurée dans cette expérience n'est probablement pas du à la seule présence de la 28GST et nous pouvons imaginer la participation d'autres GST parasitaires comme celle de 26 kDa (Liu *et al.*, 1995). Un pourcentage d'inhibition plus important aurait pu ainsi être

observé si nous avons incubé les sérums des sujets immunisés en présence de la 28GST purifiée à partir de vers adultes.

Nous avons également évalué directement par dosage ELISA la reconnaissance de la 28GST native présente dans le SWAP provenant de *S. mansoni*. Une forte réponse IgG (H+L) et IgG1 a été mise en évidence dès J49 et augmente à J180 chez les sujets immunisés (non montré). Le profil de cette réponse anticorps est donc similaire à celui observé vis-vis de la Sh28GST recombinante confirmant que les anticorps induits après administration de la préparation vaccinale ont la capacité de reconnaître la 28GST native.

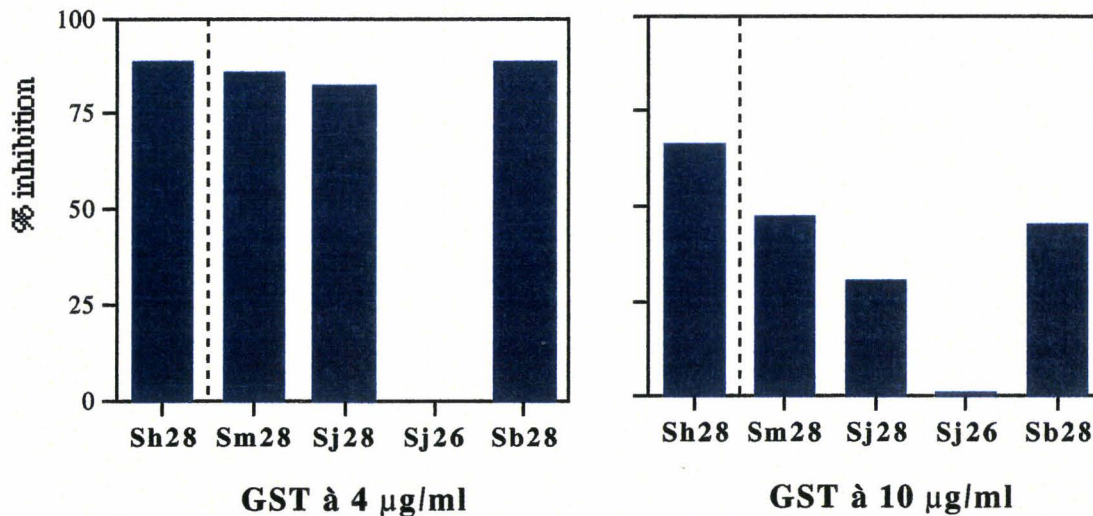
VI.4.2) Inhibition de l'activité enzymatique des différentes 28GST de schistosomes:

Les protéines 28GST clonées à partir des différentes espèces de schistosomes présentent une forte homologie de séquence entre elles (Trottein *et al.*, 1992). De nombreuses expériences chez l'animal ont montré de plus que toutes ces GST seraient des candidats vaccinaux prometteurs contre les schistosomiasis humaines (Sh28GST, Sm28GST, Sj28GST) ou bovine (Sb28GST).

Nous avons donc recherché si les anticorps induits après administrations avec la Sh28GST avaient la capacité de reconnaître ces différentes GST et d'inhiber leur activité enzymatique. Cet effet a également été évalué vis-à-vis de la Sj26GST (aimablement fournie avec la Sj28GST par le Prof. M. Taylor, School of Tropical Medicine, Londres, U.K.).

Les résultats présentés sont préliminaires car le test *in vitro* d'activité enzymatique n'a été réalisé qu'en présence du sérum d'un seul sujet immunisé (prélèvement à J0 et J180). Nous avons fait ce choix car la plus forte inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST avait été observé chez ce sujet et à J180 (voir Fig. VI.7). Les résultats sont exprimés en % d'inhibition calculés par rapport à la valeur d'activité enzymatique observée à J0 (Annexe XI) et sont présentés pour une concentration en GST de 4 µg/ml et de 10 µg/ml. La Sh28GST est utilisée comme témoin positif.

Fig. VI.10 : Inhibition enzymatique des différentes GST de schistosomes par le sérum d'un sujet immunisé



En présence d'une concentration en GST de 4 µg/ml, nous observons une inhibition de l'activité enzymatique qui est élevée et identique quelque soit la 28GST. Par contre, à la concentration de 10 µg/ml, le pourcentage d'inhibition de l'activité GST est différent selon la 28GST utilisée pour le test. En effet, l'inhibition apparaît plus faible pour la Sm28GST et la Sb28GST comparativement à la Sh28GST. Ceci est encore plus marqué avec la Sj28GST.

Aucune inhibition de l'activité enzymatique de la Sj26GST n'a été détectée quelque soit sa concentration.

Ces résultats indiquent que les anticorps induits chez ce sujet après trois administrations de Sh28GST ont la capacité d'inhiber l'activité enzymatique des 28GST provenant des différentes espèces de schistosomes. L'intensité d'inhibition semble cependant dépendre de l'origine de la 28GST. En effet, la plus forte inhibition est observée avec la Sh28GST tandis que la plus faible est détectée avec la Sj28GST. Une valeur intermédiaire est mesurée pour la Sm28GST et la Sb28GST.

Les administrations de la Sh28GST chez ce sujet serait donc capable d'induire des anticorps spécifiques, capables de reconnaître différentes 28GST. En revanche, aucun effet n'a été observé vis-à-vis de la Sj26GST, ce qui souligne l'importante spécificité de la réponse immune vis-à-vis des GST de 28 kDa.

Les expériences d'inhibition de l'activité enzymatique de ces différentes GST pour les autres sujets et la caractérisation isotypique par ELISA seront réalisées ultérieurement.

VI.5) Résumé de discussion: Profil et fonctionnalité de la réponse immune induite après administration de la Sh28GST

Nous avons montré que l'administration de la Sh28GST chez l'homme induit une réponse anticorps spécifique capable d'inhiber l'activité enzymatique de la Sh28GST chez tous les sujets vaccinés. La production spécifique des cytokines indique que cette réponse immune induite peut être associée à un profil de type Th2.

Bien qu'une forte réponse immune anti-Sh28GST soit induite, une tolérance parfaite a été observée d'un point de vue clinique, après deux ou trois administrations. Ce résultat confirme les expériences de toxicologie réalisée chez le chien, le lapin et le rat chez qui les doses de Sh28GST administrées étaient 2 à 50 fois supérieures à celle utilisée chez l'homme (Introduction, chap. IV.4.5). Dans cette étude pré-clinique, la réponse anticorps dirigée contre une GST placentaire humaine et une GST hépatique de rat avait été évaluée. Une absence totale de reconnaissance croisée était constatée chez les animaux immunisés, malgré une forte réponse IgG anti-Sh28GST.

Au cours de cet essai clinique de Phase I, la reconnaissance par les IgG(H+L) et IgG1 générés d'une GST humaine majoritaire, la GST π , a été évaluée. Aucune reconnaissance croisée n'a été observée après deux ou trois administrations et ceci chez tous les volontaires immunisés (J120 et J180).

VI.5.1) Profil de la réponse immune induite:

Une seule administration de la Sh28GST est capable d'induire une réponse IgG anti-Sh28GST, détectable à J28 chez 7 sujets sur 8, et caractérisée par une réponse IgG1 majoritaire.

La réponse immune spécifique est fortement augmentée après deux administrations et présente les caractéristiques suivantes:

- les réponses IgG et IgG1 spécifiques sont homogènes chez tous les sujets du groupe Sh28GST
- l'isotype IgG1 est prédominant
- cette réponse IgG1 reste stable pendant plus de 2 mois, entre J49 et J120
- une réponse IgG3 est significativement observée chez tous les sujets à J49, mais elle est hétérogène dans son amplitude selon les individus
- une faible réponse IgG2 et IgG4 est observée à J120 pour 50% des sujets
- une très faible réponse IgA apparaît chez 3 sujets à J49
- aucune présence d'IgE n'a été détectée.

Effet d'une troisième administration :

Le protocole initial de cet essai clinique ne prévoyait que deux administrations et devait se terminer à J120. Après avoir constaté la parfaite tolérance chez l'ensemble des sujets, la décision d'effectuer une troisième administration a été prise

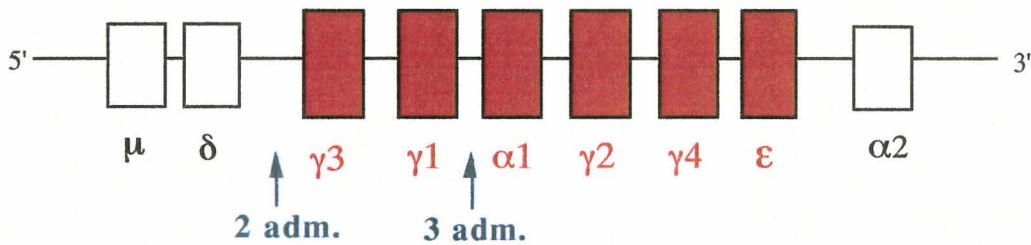
Une innocuité parfaite a été obtenue et l'effet d'une nouvelle administration de la Sh28GST a apporter des renseignements complémentaires à l'étude de l'immunogénicité. En effet, nous avons pu évaluer, d'une part, l'effet d'une restimulation de la réponse immune anti-Sh28GST, 3 mois après son induction. D'autre part, cet effet pourrait être proche de celui que nous pourrions rencontrer après une administration chez des individus infectés, population présentant naturellement une réponse immune spécifique à la Sh28GST.

L'effet de la troisième administration de la préparation vaccinale peut se résumer ainsi:

- forte augmentation de l'isotype IgG1 majoritaire
- légère augmentation des réponses IgG3 et IgG2
- importante induction de l'isotype IgG4
- nette apparition d'une réponse IgA chez 2 sujets
- pas de détection de l'isotype IgE

A la vue de l'ensemble des résultats, la cinétique d'apparition des différentes réponses isotypiques semble dépendre du nombre d'administration. En effet, une seule administration est capable d'induire les réponses IgG1 et IgG3 chez quelques sujets. Ces deux réponses isotypiques sont fortement augmentées après la deuxième injection (J49). En revanche, la troisième administration induit la nette apparition des réponses IgG4 et IgG2 tandis que son effet sur l'isotype IgG3 semble plus faible. Enfin, même si la réponse IgA est faible comparativement aux réponses isotypiques de type IgG, son intensité maximale est détectée à J165 pour 2 sujets.

La cinétique d'apparition de ces isotypes est sans aucun doute liée à la maturation de la réponse anticorps spécifique. En effet, l'évolution de la réponse immune vers la production d'un isotype particulier dépend du réarrangement des gènes codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines. Le locus des gènes codant pour la chaîne lourde des Ig humaines est représenté sur le schéma suivant (les gènes codant pour les isotypes étudiés sont indiqués en rouge) :



Au cours du déclenchement d'une réponse immune, les premiers gènes réarrangés sont les gènes μ et δ codant respectivement pour les isotypes IgM et IgD. L'évaluation de ces 2 réponses isotypiques n'a pas été réalisée au cours de notre étude.

Nous pouvons imaginer que l'effet de deux administrations de la Sh28GST pourrait se traduire par un réarrangement génétique rapide de la chaîne lourde aboutissant à l'expression préférentielle des gènes $\gamma 3$ et $\gamma 1$, codant respectivement pour les isotypes IgG3 et IgG1. Suite à une nouvelle stimulation de cellules B spécifiques à la Sh28GST après la troisième administration, une commutation isotypique vers l'expression des gènes $\alpha 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 4$ a généré la production des IgA1, IgG2 et IgG4.

Aucune production de l'isotype IgE n'a été mise en évidence jusqu'à J180. Comme nous pouvons le voir sur ce schéma, le gène ϵ codant pour la chaîne lourde des IgE est présent en position 3' après le gène $\gamma 4$. Ainsi, il n'est pas exclu que la commutation isotypique vers la production des IgE n'a pas encore eu lieu à J180. Nous pouvons penser que l'évaluation de cette réponse isotypique à des temps plus tardif (>J200) ou suite à une quatrième administration aurait pu mettre en évidence la production spécifique de cet isotype.

Une autre hypothèse pourrait également expliquer l'absence de détection d'IgE spécifiques. Il a été montré, dans le sérum d'individus infectés par *S. mansoni*, que la reconnaissance d'antigènes parasitaires (SWAP) par les IgE était inhibée par la présence d'une forte réponse IgG (Rihet *et al.*, 1992). En effet, ces auteurs démontrent que la réponse IgE spécifique peut-être détectée après une immuno-purification préalable de cet isotype sur colonne. De plus, il a été constaté que cette compétition semblait dépendre de l'isotype IgG4 alors que la présence d'IgG1, IgG2, IgG3 ou IgM spécifiques n'interférait pas dans le dosage des IgE anti-SWAP. Dans notre étude, la forte réponse IgG4 anti-Sh28GST observée après une troisième administration pourrait ainsi expliquer l'absence de détection des IgE spécifiques. Les dosages des IgE spécifiques après immunoprécipitation a également montré l'absence de détection de cet isotype.

Il est largement décrit dans la littérature que les mécanismes de commutation isotypique sont dépendants de la stimulation des lymphocytes B par certaines cytokines immunorégulatrices

(Garraud *et al.*, 1996). Nous avons alors analysé le profil de production des cytokines après stimulation *in vitro* des cellules mononuclées des sujets par la Sh28GST.

Profil de la production des cytokines spécifique de la Sh28GST:

Notre objectif était de déterminer si le profil de la réponse isotypique pouvait être associé à celui de la production de cytokines de type Th1 ou Th2.

Dans notre étude, une production spécifique d'IL-5 et d'IL-13 est détectée après deux administrations et augmentent fortement après la troisième. En revanche, aucune sécrétion spécifique d'IFN γ et d'IL-12 n'a été mise en évidence. La sécrétion spécifique d'IL-2 est significative mais faible à J165. Cette réponse cellulaire spécifique est caractéristique d'un profil de type Th2 ce qui est confirmé par la présence majoritaire de l'isotype IgG1 (Romagnani *et al.*, 1994). L'alun utilisé comme adjuvant de la Sh28GST jouerait sans aucun doute un rôle important dans l'orientation de la réponse immune vers ce profil de type Th2 (Gupta *et al.*, 1995).

L'IL-13 est capable d'induire non seulement la prolifération des lymphocytes B humains *in vitro* (Defrance *et al.*, 1994) mais également leur différenciation en cellules productrices d'IgG (Cocks *et al.*, 1993). De nombreuses études montrent que cette cytokine induit préférentiellement la commutation isotypique vers la production d'IgG4 et d'IgE et partage ainsi une grande similarité d'action avec l'IL-4 (Zurawski *et al.*, 1994).

Après trois administrations de Sh28GST, la forte production spécifique d'IL-13 est associée à la présence d'une réponse IgG4 anti-Sh28GST. Le rôle de l'IL-13 sur une production d'IgE anti-Sh28GST n'est pas à écarter dans notre étude. En effet, soit cet isotype n'a pas pu être détectée à J180 du à la compétition de reconnaissance par les IgG4, soit cet isotype apparaît plus tardivement, comme nous l'avons indiqué précédemment.

De façon étonnante, aucune sécrétion d'IL-4 n'a pu être détectée après stimulation *in vitro* par la Sh28GST alors que cette cytokine induit la commutation isotypique vers la production des IgG1, IgG3 et IgG4 (Fujieda *et al.*, 1995). Dans notre étude, l'intervention de cette cytokine apparaît évidente mais plusieurs raisons pourraient expliquer le fait que nous n'avons pas pu la détecter.

(1) L'IL-4 est une cytokine sécrétée par des cellules Th, au niveau de la rate et des ganglions et semble agir très localement au niveau de ces organes (de Waal Malefyt *et al.*, 1995). Sa détection à un niveau périphérique, après stimulation *in vitro* des cellules immunitaires du sang, pourrait par conséquent s'avérer difficile d'un point de vue quantitatif. D'une manière générale, il est à noter que le rôle de cette cytokine sur la production d'isotypes particuliers a été notamment montré chez la souris, après culture de splénocytes (Mosmann *et al.*, 1998) et, chez l'homme, après stimulation *in vitro* de cellules B en présence d'IL-4 recombinante (Fujieda *et*

al., 1995). Chez des patients infectés par *S. mansoni*, la présence de cette cytokine a été mise en évidence au niveau sérique mais uniquement après purification de cellules T puis obtention de clones Th spécifiques d'antigènes parasitaires (Couissinier-Paris *et al.*, 1995). Cette technique aurait pu être réalisée mais elle nous apparaissait extrêmement difficile à mettre en place au cours d'un essai clinique.

(2) La sécrétion *in vitro* d'IL-4 par les cellules CD4⁺ semble très transitoire dans le temps et son action est immédiate contrairement à l'IL-13 qui est produite pendant une longue période (de Waal Malefyt *et al.*, 1995). A l'inverse de la production d'IL-13 détectée, l'évaluation de la production d'IL-4 à J49 et J165 pourrait être ainsi trop tardive. En effet, de fortes réponses IgG1 et IgG4 étaient déjà apparues à cette date.

Cette même explication pourrait être apportée pour l'absence de production d'IL-10 et de TGFβ après stimulation *in vitro* par la Sh28GST. Il a été montré que l'IL-10 induit la commutation isotypique de cellules B humaines vers la sécrétion des IgG1 et IgG3 (Brière *et al.*, 1994) et intervient, en synergie avec le TGFβ, dans l'induction de la production des IgA (Defrance *et al.*, 1992). L'IL-10 joue probablement un rôle important dans l'orientation de la réponse anticorps anti-Sh28GST observée et sa présence aurait dû être détectée avant J49 ou J165.

Néanmoins, il a été démontré que l'IL-13 était capable d'inhiber *in vitro* non seulement la production de cytokines pro-inflammatoires mais également celle de l'IL-10 par des monocytes humains (de Waal Malefyt *et al.*, 1993). Après stimulation *in vitro* par la Sh28GST, la forte sécrétion d'IL-13 pourrait ainsi jouer ce rôle inhibiteur empêchant la détection de l'IL-10.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sur la production de cytokines *in vitro* ne semblent pas démontrer une chronologie parfaite dans l'induction des différentes réponses isotypiques anti-Sh28GST. Par contre, les réponses anticorps et cellulaires ne sont pas contradictoires et sont nettement caractérisées par une orientation de type Th2 qui associe la production majoritaire d'IgG1 *in vivo* et la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 *in vitro*.

L'induction d'une réponse de type Th2 suite à l'administration de la Sh28GST chez des sujets sains nous apparaît extrêmement encourageante. En effet, de nombreuses études immuno-épidémiologiques suggèrent que ce profil immunitaire est associé à une protection contre les schistosomiasis humaines. Ceci a été montré pour la réponse immune dirigée contre les antigènes totaux parasitaires (Dunne *et al.*, 1995) mais également vis-à-vis de l'antigène 28GST spécifique (Capron *et al.*, 1998).

VI.5.2) Capacité fonctionnelle de la réponse immune induite:

Au cours de l'essai clinique, cet effet a été évalué par:

- l'étude de l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST
- l'étude de la reconnaissance de la protéine 28GST "native"

- Inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST:

Suite à deux administrations de la préparation vaccinale, une inhibition significative était observée à J49 chez tous les sujets, et restait détectable pendant plus de 2 mois chez 7 sujets sur 8. Une troisième injection résultait en une forte augmentation de cette inhibition chez 5 sujets sur 6.

Dans l'ensemble, l'inhibition de l'activité GST semble suivre l'intensité de la réponse immune spécifique observée, ceci étant particulièrement visible vis-à-vis de la réponse IgG1. Nous avons voulu déterminer si une réponse isotypique particulière pouvait être impliquée dans ce phénomène. Pour cela, un des moyens était de calculer pour chaque date de prélèvements les coefficients de corrélation entre le titre de chaque réponse isotypique et la valeur en IC50 de l'inhibition de la Sh28GST (tests de Kendall et Spearman). Seule la corrélation entre la réponse IgG3 anti-Sh28GST et l'inhibition de la GST était significative à J49 ($P < 0,05$). Ce résultat significatif est surprenant compte tenu de la forte hétérogénéité de cette réponse isotypique observée à cette date et du nombre réduit d'individus. Néanmoins, ce résultat semble confirmer ce que nous avons précédemment observé chez les hommes infectés par *S. mansoni* où seul la réponse IgG3 spécifique semblait intervenir dans l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST (Remoué *et al*, 2000).

A la vue de ce résultat, l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST ne serait pas proportionnelle à l'intensité d'une réponse isotypique particulière mais pourrait être engendrée par la présence d'un seul isotype présentant une forte capacité neutralisante. De plus, l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST augmente significativement entre J165 et J180 alors que l'ensemble des réponses isotypiques ne semble pas suivre cet effet. Ce mécanisme d'inhibition pourrait être lié dans ce cas à une augmentation de l'affinité d'un isotype pour la Sh28GST.

Nous pouvons imaginer que la capacité fonctionnelle de la réponse anticorps dépendrait à la fois du type d'isotype induit, mais également de leur affinité et de leur reconnaissance épitopique. En effet, il a été démontré que les peptides N et C terminaux (aa. 10-43 et 190-211, respectivement) étaient impliqués dans le site enzymatique des 28GST (Capron *et al.*, 1998). Après immunisation chez l'animal, la réponse anticorps plus spécifiquement dirigée contre ces épitopes

est en effet capable d'inhiber l'activité enzymatique des 28GST (Xu et al., 1991). Les différentes réponses isotypiques dirigées contre ces deux peptides, ainsi que leur affinité respective, seront évaluées prochainement.

- Reconnaissance de la 28GST native:

L'évaluation de la réponse immune a été présentée vis-à-vis de la reconnaissance de la Sh28GST recombinante. Une des questions fondamentales était de savoir si les anticorps spécifiques induits après administration de la Sh28GST avaient la capacité de reconnaître la 28GST présente dans les vers adultes de schistosome. Après incubation des sérums en présence de SWAP, une reconnaissance par les IgG(H+L) et IgG1 a été détectée et est comparable à celle observée vis-à-vis de la Sh28GST recombinante (non montré).

Non seulement la réponse immune induite est capable de reconnaître la 28GST présente dans le vers mais elle présentait également la capacité fonctionnelle d'inhiber l'activité enzymatique GST. Ces résultats apparaissent encourageants avant la mise en place des essais cliniques de Phase II chez des individus infectés.

- Inhibition de l'activité enzymatique des GST des différentes espèces de schistosomes:

Les résultats présentés dans ce chapitre sont préliminaires car l'évaluation de l'inhibition enzymatique des différentes 28GST a été réalisée en présence du sérum à J180 d'un seul sujet immunisé.

Néanmoins, nous montrons que les anticorps induits après administration par la Sh28GST ont la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST, la Sj28GST et la Sb28GST. Ainsi, les anticorps spécifiques à la Sh28GST présentent la propriété de reconnaître les différentes 28GST qui sont décrites pour être des candidats vaccinaux prometteurs vis-à-vis de leur espèce de schistosome respective (Introduction, Chap. IV.4.4).

Après administration de la Sh28GST, Sm28GST ou Sb28GST, il a été démontré chez l'animal que l'inhibition de leur activité enzymatique médiée par les anticorps était associée à un effet anti-fécondité (Boulanger *et al.*, 1999; Capron *et al.*, 1998; Grzych *et al.*, 1998). De plus, l'immunisation par la Sm28GST est capable de conférer une protection chez des singes infectés par *S. haematobium* (Boulanger *et al.*, 1995). Un tel effet hétérologue a également été observé suite à l'administration de la Sb28GST à du bétail naturellement infecté par *S. mattheei* (De Bont *et al.*, 1997).

A notre connaissance, cet effet inhibiteur n'a cependant pas été décrit pour la Sj28GST, mais il a été montré que l'immunisation de porcs avec la Sj26GST induit une réduction de la fécondité

des vers de l'espèce *S. japonicum* (Liu *et al.*, 1995). Dans notre étude, nous montrons donc que des anticorps spécifiques à la Sh28GST sont capables d'inhiber l'activité de la Sj28GST. En revanche, aucune inhibition de la Sj26GST n'a été détectée. Nos résultats semblent indiquer la forte spécificité de la réponse immune induite après l'administration de la Sh28GST qui est capable de reconnaître uniquement les GST parasite de 28 kDa. Cette spécificité peut être comparée avec les résultats observés vis-à-vis des GST de mammifères où aucune réaction croisée n'a été mise en évidence au cours des études de toxicologie chez l'animal et vis-à-vis de la GST π humaine après administration chez l'homme.

Les résultats observés avec la concentration en 28GST la plus importante (10 μ g/ml) semblent indiquer que l'intensité de l'inhibition enzymatique dépend de la GST étudiée. En effet, le pourcentage d'inhibition est le plus important pour la Sh28GST alors qu'il est plus faible pour la Sm28GST et la Sb28GST. Cette variation peut être expliquée par la différence d'homologie de séquence en acides aminés qui existe entre la Sh28GST et les autres 28GST: 97% avec la Sb28GST, 90% avec la Sm28GST (Trottein *et al.*, 1992). Alors que les acides aminés des séquences 10-43 et 190-211 sont identiques entre la Sh28GST et la Sb28GST, deux résidus sont différents pour chacun des 2 peptides entre la Sh28GST et la Sm28GST.

Cette différence est encore plus marquée avec la Sj28GST qui présente la plus faible homologie (77%) avec la Sh28GST. En particulier, de nombreux acides aminés sont différents dans les séquences N et C terminales de ces deux protéines (Henkle *et al.*, 1990). Comme on peut s'y attendre, le pourcentage d'inhibition de la Sj28GST est le plus faible comparativement aux autres 28GST.

Malgré cette variabilité, l'immunisation par la Sh28GST chez l'homme est capable d'induire des anticorps spécifiques présentant la capacité fonctionnelle d'inhiber différentes 28GST. Ainsi, l'administration de cette préparation vaccinale pourrait être envisagée contre les 3 types de schistosomiasis majeures chez l'homme (*S. haematobium*, *S. mansoni* et *S. japonicum*) et vis-à-vis d'une schistosomiose prédominante chez le bovin (*S. mattheei*). Compte tenu du coût important que représente la mise en place et la fabrication d'une protéine recombinante selon les normes GMP (Good Manufacturing Practices), cette stratégie pourrait s'avérer d'un grand intérêt économique et pratique.

Les résultats observés au cours de cet essai clinique de Phase Ia sont tout à fait prometteur, tant d'un point de vue de l'innocuité que de l'immunogénicité, et nous ont permis d'envisager la réalisation des Phases II chez des individus infectés.

***Discussion générale
et perspectives***

I) Immunité anti-schistosome au cours de l'infection humaine : particularité de la réponse immune spécifique aux 28GST?

Au début des années 1930, les travaux de Fisher sur l'infection humaine à *S. intercalatum* au Congo ont donné lieu à la naissance d'une nouvelle discipline biomédicale : l'immuno-épidémiologie (Fisher, 1934). Le but principal des études immuno-épidémiologiques reste le même : comprendre l'évolution des réponses immunes de l'hôte vis-à-vis d'agents infectieux afin d'élaborer et d'adapter des thérapies plus efficaces. Elles permettent de connaître l'importance des mécanismes effecteurs anti-infectieux et peuvent guider, confirmer ou infirmer les données immunologiques acquises lors des expérimentations animales.

Les résultats obtenus chez des individus infectés représentent une base de travail, une orientation de recherche pour des études d'immunologie plus fondamentale, nécessitant bien souvent l'expérimentation animale. Les interactions et la complémentarité entre la recherche épidémiologique sur le "terrain" et la recherche fondamentale à la "pailleasse" ne peuvent être que bénéfiques pour comprendre l'immunité de l'hôte vis-à-vis d'un pathogène.

Un des atouts mais également une des difficultés de l'immuno-épidémiologie est d'analyser les résultats non pas individu par individu mais à l'échelle d'une population. L'immunité anti-infectieuse est donc ainsi évaluée en fonction de différents facteurs pouvant influencer la régulation de la réponse immune : l'intensité d'infection, l'âge, le sexe, la résistance ou la susceptibilité à l'infection, les problèmes de nutrition, les prédispositions génétiques, les facteurs environnementaux...

Dans le cas de l'infection par les espèces majeures de schistosomes, de nombreuses études ont été réalisées dans différents foyers d'infection en Afrique (*S. haematobium* et *S. mansoni*), en Amérique du Sud (*S. mansoni*) ou en Asie (*S. japonicum*). Dans la plupart des cas, l'objectif de ces études était d'évaluer les caractéristiques de la réponse immune de type protectrice. Une des premières caractéristiques importantes est que l'intensité d'infection est maximale chez les enfants puis diminue en fonction de l'âge. Cette observation suggère l'existence d'une résistance à l'infection chez les adultes. En effet, la réponse immune spécifique aux antigènes de schistosome s'acquiert avec l'âge et semble devenir protectrice chez les adultes.

Les études concernant l'évolution de la réponse immune après chimiothérapie anti-bilharzienne (praziquantel) ont confirmé l'acquisition d'une telle immunité protectrice au cours de l'infection. En effet, l'existence de populations dites résistantes ou susceptibles à la réinfection est observée quelques mois après le traitement. La comparaison des réponses immunes spécifiques entre ces deux populations permet de caractériser le profil d'une réponse immune protectrice.

Une relation étroite entre les réponses immunes de type Th2 et une résistance à la (re)infection a été observée dans de nombreux foyers d'infection à *S. mansoni* ou à *S. haematobium* (Dunne *et al.*, 1995; Harn, 1997). Les réponses IgE anti-parasitaires semblent prépondérantes dans ce phénomène et joueraient un rôle important dans l'acquisition d'une réponse immune protectrice. La grande majorité des études immuno-épidémiologiques évalue les réponses immunes de l'hôte vis-à-vis de l'ensemble des antigènes parasitaires (SWAP et SEA). Mais nous pouvons nous demander si la réponse immune dirigée contre un antigène spécifique présente la même régulation et si son évolution est similaire au cours de l'infection humaine.

L'expérience considérable acquise par notre laboratoire avec l'antigène 28GST a abouti à la mise en place d'essais cliniques. Cette protéine, produite sous forme recombinante, représente aujourd'hui un des candidats vaccinaux les plus prometteurs. Suite aux nombreux résultats de protection obtenus après l'administration des 28GST chez l'animal (Capron *et al.*, 1998), il était nécessaire de continuer la caractérisation de l'immunité spécifique à cet antigène chez des individus infectés et d'évaluer son rôle dans l'acquisition d'une réponse immune anti-bilharzienne.

I.1) Réponses anti-28GST et anti-Ag totaux : évolution différente au cours de l'infection?

I.1.1) Réponse immune anti-28GST et profil Th2:

Dans notre étude, plusieurs caractéristiques de la réponse immune anti-Sh28GST ont été mises en évidence :

- Les réponses IgG3 et IgA sont majoritaires chez les adultes et sont sexe-dépendantes
- Aucune évolution de la réponse IgE n'a été observée en fonction de l'âge
- Une très faible réponse IgG4 a été détectée
- Le traitement par le PZQ (suivi d'une réinfection) induit uniquement la régulation des réponses IgG3 et IgA

Cependant, dans de nombreux foyers d'infection, une forte régulation des réponses IgE et IgG4 dirigées contre les antigènes parasitaires totaux (SWAP, SEA) est observée en fonction de l'âge des individus. En effet, la réponse IgE augmente avec l'âge alors que l'effet inverse est observée pour l'isotype IgG4. Cette régulation isotypique age-dépendante a été observée dans l'infection à *S. mansoni* ou *S. haematobium* et dans des foyers récents ou anciens (Hagan *et al.*, 1991; van Dam *et al.*, 1996). De plus, l'acquisition d'une résistance à la réinfection, après le traitement au PZQ, est associée à la présence d'une réponse IgE alors que la réponse IgG4 anti-parasitaire est prépondérante chez les individus susceptibles (Hagan *et al.*, 1991).

Une telle variation de ces deux réponses isotypiques n'est pas observée dans l'immunité dirigée contre la Sh28GST.

D'une manière générale, la production des isotypes IgE et IgG4 est associée à un profil immunitaire de type Th2. L'orientation de la réponse cellulaire spécifique aux antigènes parasitaires totaux vers un profil de type Th2 (présence d'IL-4 et d'IL-5) est importante au cours de l'infection bilharzienne et semble être associée à la résistance à l'infection (Pritchard et al., 1997). L'existence de ce profil n'a pas été observé vis-à-vis de la Sh28GST et seule la production spécifique d'IFN γ , de TNF α , d'IL-6, de TGF β et d'IL-10 a été mise en évidence.

En effet, nous avons montré l'existence de deux profils immunitaires distincts si nous analysons les résultats en fonction du sexe des individus infectés. Nous avons observé que la forte réponse IgG3 anti-Sh28GST, détectée chez les hommes, était associée à la sécrétion spécifique de l'IFN γ et d'IL-10 alors que la présence majoritaire des IgA chez les femmes serait liée à une production de TGF β et d'IL-10.

L'existence de ces deux profils particuliers de production de cytokines a été précédemment décrit au niveau de sous-populations de lymphocytes T. Ainsi, chez des patients infectés chroniquement par la bactérie *Borrelia burgdorferi*, agent étiologique de la maladie de Lyme, une nouvelle population de lymphocytes T, produisant à la fois de l'IFN γ et de l'IL-10, a été décrite (Pohl-Koppe *et al.*, 1998). De plus, l'IgG3 est un isotype majeur chez les patients infectés par cette borreliose alors que les réponses isotypiques de type Th2 (IgG4 et IgE) sont absentes (Widhe *et al.*, 1998).

Concernant le second profil immunitaire, il a été montré qu'une sous-population de lymphocytes T, nommé Th3, était capable de produire majoritairement du TGF β et des taux variables d'IL-10, après l'administration orale de la Myelin Basic protein (MBP) chez des patients atteints de scléroses en plaques (Fukaura *et al.*, 1996). Ce profil de production des cytokines a été associé, dans de nombreux cas, à la production des IgA (Weiner *et al.*, 1997).

Ces deux profils immunitaires semblent proches de ceux que nous avons observé en fonction du sexe des patients infectés. La réponse immune spécifique à la Sh28GST, acquise au cours de l'infection, ne semble donc pas être associée à un profil de type Th2. De plus, l'effet d'un traitement par le PZQ est connu pour réguler positivement la réponse immune dirigée vis-à-vis des antigènes parasitaires totaux vers un profil de type Th2. Dans notre étude, l'influence du PZQ semble particulièrement augmenter la réponse IgA anti-Sh28GST et nous pouvons suggérer que ce phénomène est associé à une régulation de la réponse immune de type Th3.

La participation de ce profil immunitaire dans l'acquisition d'une résistance à la (re)infection au cours de l'infection chronique par les schistosomes devrait être prise en compte lors des futures études immuno-épidémiologiques.

I.1.2) Immunité anti-parasitaire en fonction du sexe:

Nous avons montré, au cours de l'infection par *S. haematobium* ou par *S. mansoni*, que la réponse immune spécifique aux 28GST était sexe-dépendante. La réponse IgG3 est prépondérante chez les hommes adultes alors que la réponse IgA est plus importante chez les femmes. De plus, cette variabilité se retrouve dans la capacité fonctionnelle des anticorps spécifiques à inhiber l'activité enzymatique de la 28GST. En effet, l'isotype IgG3 intervient dans ce phénomène inhibiteur chez les hommes tandis que cet effet est observé avec les IgA chez les femmes.

Nos résultats indiquent cependant que cette différence sexe-dépendante n'est pas retrouvée pour la réponse immune dirigée contre l'ensemble des antigènes parasitaires (SEA). Dans d'autres foyers d'infection, seule une variation de la réponse IgG1 et IgE anti-Ag totaux a précédemment été observée en fonction du sexe des individus infectés. Chez une population infectée par *S. mansoni* au Kenya, ces deux réponses isotypiques étaient significativement plus élevées chez les hommes que chez les femmes (Webster *et al.*, 1997) alors que l'effet inverse était observé dans une population infectée par *S. haematobium* (Mutapi *et al.*, 1997). Dans ces deux cas, les auteurs suggèrent que la variabilité sexe-dépendante est attribuée à une différence d'intensité d'infection entre les hommes et les femmes. Or, dans notre étude concernant la population infectée par *S. haematobium*, l'intensité d'infection était similaire entre les deux sexes. Il semble ainsi relativement logique qu'aucune différence en fonction du sexe n'ait été observée pour la réponse immune dirigée contre les Ag parasitaires totaux.

De plus, les réponses IgG1 anti-SWAP et anti-SEA évoluent en fonction de l'âge des individus et cet isotype est majoritaire parmi les sous-classes d'IgG (Boctor *et al.*, 1990) tandis que la réponse IgG1 spécifique à la Sh28GST semble très faible et ne varie pas en fonction de l'âge des individus infectés par *S. haematobium*. Au contraire dans notre étude, nous montrons que l'isotype IgG3 est majoritaire.

La régulation des réponses immunes spécifiques des 28GST ne semble donc pas suivre celle observée contre l'ensemble des antigènes parasitaires. Or, les nombreuses études immuno-épidémiologiques sur la schistosomiase ont permis d'estimer les caractéristiques du "profil protecteur", acquis au cours de l'infection. Mais, cette évaluation a été élaborée à partir d'observations immunologiques réalisées vis-à-vis des antigènes SWAP et SEA. Notre étude soulève donc le problème suivant : les caractéristiques de la réponse immune protectrice ne peuvent pas être estimées uniquement à partir d'études réalisées vis-à-vis de l'ensemble des antigènes parasitaires. En effet, l'utilisation du SWAP ou du SEA comme antigène vaccinal est

évidemment à exclure pour deux raisons principales. Premièrement, l'administration de ces antigènes totaux chez l'animal n'a jamais montré une efficacité vaccinale. Deuxièmement, leur production ne présentera jamais les avantages de celle d'une protéine recombinante qui sont nécessaires à la fabrication d'un vaccin (normes GMP, production d'un lot homogène et en grande quantité).

La connaissance, chez les individus infectés, de la réponse immune dirigée contre un antigène spécifique et potentiellement vaccinal semble ainsi prépondérante dans l'objectif de toutes stratégies thérapeutiques ou préventives contre la bilharziose.

I.2) Antigène spécifique : particularités de la 28GST?

Les réponses immunes anti-Sh28GST et anti-Sm28GST acquises naturellement au cours de l'infection par *S. haematobium* ou *S. mansoni* présentent les mêmes caractéristiques en fonction du sexe des individus infectés. D'une manière plus générale, nous pouvons nous demander si la régulation de l'immunité vis-à-vis de cet antigène est particulière à cette protéine ou si la réponse immune spécifique à d'autres protéines peut être comparable.

Dans la population infectée par *S. mansoni*, nous avons évalué les réponses IgG3 et IgA dirigées contre la KLH, protéine partageant des épitopes communs avec un antigène spécifique de *S. mansoni*, la GP38 (Grzych *et al.*, 1987). Aucune différence n'a été observée non seulement en fonction du sexe mais également en fonction de l'intensité d'infection, contrairement à ce que nous avons mis en évidence pour la réponse immune anti-Sm28GST (Remoué *et al.*, 2000). Ce résultat suggère que la régulation de l'immunité spécifique en fonction du sexe est particulière à l'antigène 28GST.

Malheureusement, nous n'avons pas eu l'opportunité d'évaluer les réponses immunes dirigées contre d'autres antigènes spécifiques des schistosomes. Une collaboration avec le Dr. David Williams (Université de l'Illinois, USA) est cependant en cours grâce au Dr R. Pierce de notre laboratoire et concerne l'étude de la réponse immune vis-à-vis d'une thioredoxin peroxidase (Tpx), récemment clonée chez *S. mansoni* (Kwatia *et al.*, soumis). La réponse humorale spécifique sera prochainement évaluée en fonction des différents paramètres étudiés vis-à-vis de la Sm28GST.

Dans la littérature, la reconnaissance d'autres antigènes spécifiques a été étudiée au cours de l'infection humaine et trois exemples peuvent être mis en relation avec nos résultats :

(1) Il a été montré que la paramyosin de *S. Japonicum* (Sj97) était majoritairement reconnue par les isotypes IgE et IgA, chez des patients infectés aux Philippines (Hernandez *et al.*, 1999).

(2) Une forte réponse IgG spécifique à un antigène de surface de *S. mansoni* (SmW68) a été détectée chez des individus infectés en Egypte, mais aucune différence n'a été observée en fonction de l'âge et du sexe (Hing *et al.*, 1989). De plus, cette réponse isotypique était similaire entre des individus faiblement et fortement infectés.

(3) Webster *et al.* (1998) ont démontré que la réponse isotypique dirigée contre une protéine de 22.6 kDa du parasite *S. mansoni* (Sm22.6) est majoritairement de type IgE. Cette étude a été réalisée dans la même population où nous avons évalué la réponse anti-Sm28GST (village de Guidakhar), ce qui permet de comparer directement nos différents résultats. Dans leur étude, l'acquisition de la réponse IgE anti-Sm22.6 semble jouer seule un rôle dans la résistance à la réinfection, contrairement aux réponses isotypiques IgG3 et IgA (Webster *et al.*, 1996).

Ces quelques exemples indiquent que la régulation de la réponse immune spécifique à d'autres Ag ne semble pas présenter les mêmes caractéristiques que celle dirigée vis-à-vis de la 28GST. Si nous voulions clairement démontrer que la régulation de l'immunité spécifique est variable selon l'antigène étudié, il serait intéressant d'évaluer les réponses immunes contre différentes protéines chez la même population et en fonction des mêmes paramètres (âge, sexe, réinfection...). Une telle étude avait été initiée par l'OMS, dans un foyer d'infection à *S. mansoni* en Egypte, en utilisant les cinq candidats vaccinaux les plus prometteurs : Sm97, Irv-5, TPI, Sm23 et Sm28GST (Bergquist *et al.*, 1998). Aucun résultat n'a été publié à ce jour.

Perspectives :

La régulation de la réponse immune anti-28GST est donc propre à cet antigène suggérant que la 28GST pourrait jouer un rôle dans l'orientation de sa réponse immune spécifique.

Cette protéine présente la particularité d'être une enzyme, capable de catalyser la réaction de conjugaison du glutathion (GSH) sur un substrat. La 28GST, une fois captée par une APC (cellule présentant l'antigène), se retrouve dans le cytoplasme et pourrait exercer son activité enzymatique dans la cellule hôte. Ceci aboutirait à la déléation du GSH endogène. La GST parasitaire aurait alors un rôle similaire à celui des GST normalement présentes dans les cellules de mammifères. Or, il a été démontré que la quantité de GSH disponible dans des APC intervenait dans la régulation du profil immunitaire et une déplétion de GSH orienterait notamment la réponse immune vers un type Th2 (Peterson *et al.*, 1998).

L'activité enzymatique de la 28GST interviendrait ainsi dans la régulation du GSH endogène des APC et pourrait moduler la production des cytokines. Cet effet serait évalué *in vitro* non seulement dans les cellules mononuclées d'individus sains mais également dans les cellules prélevées chez des individus infectés. La stimulation *in vitro* par la Sh28GST serait effectuée en

présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques des GST permettant de comparer le profil de production des cytokines.

Une deuxième stratégie serait d'évaluer les réponses immunes spécifiques d'une protéine de schistosome possédant une autre activité enzymatique, telle que la glutathione peroxidase (Gpx) de *S. mansoni* qui a été clonée et caractérisée dans notre laboratoire (Roche *et al.*, 1994) ou encore la Tpx précédemment citée. L'analyse du profil isotypique dans les sérums, et la régulation de la production des cytokines après stimulation *in vitro* des cellules mononuclées, pourraient être réalisées chez une population infectée.

Ces études apporteraient de nombreuses informations non seulement sur le rôle de l'antigène dans l'orientation immunitaire mais principalement sur l'influence de l'activité enzymatique de ces protéines dans l'induction et/ou la régulation des réponses immunes spécifiques.

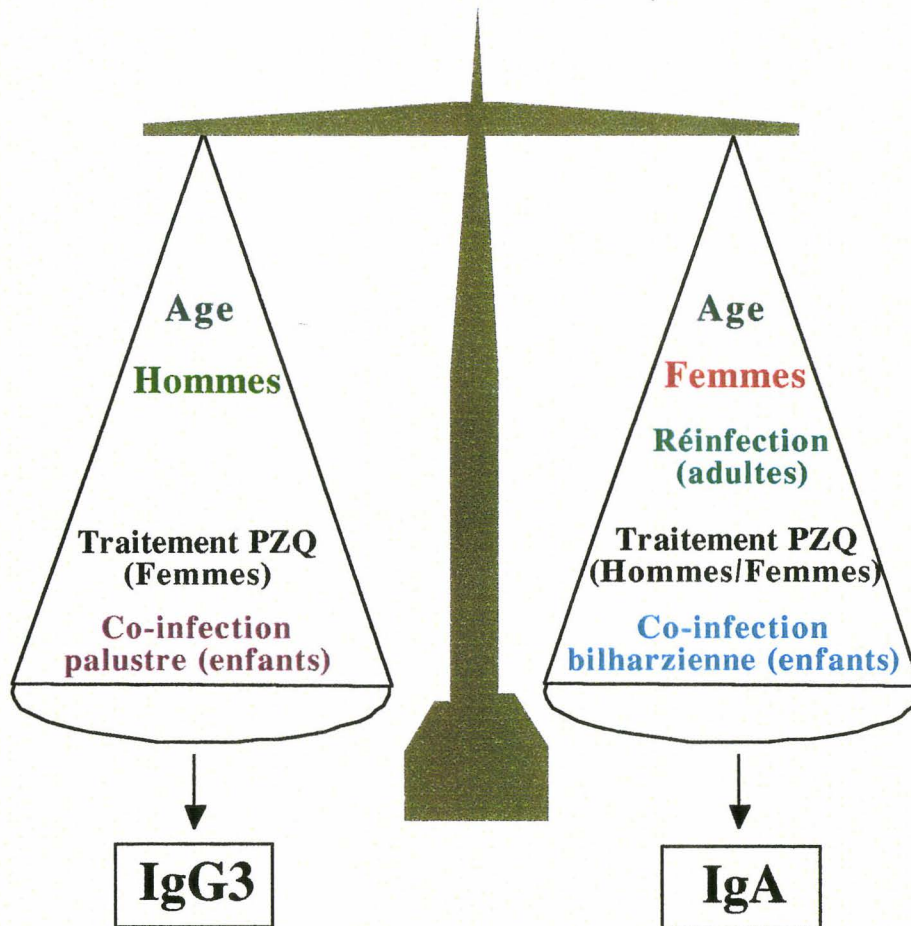
II) Maturation de la réponse immune anti-28GST

II.2) Au cours de l'infection

II.2.1) Balance IgG3/IgA

L'évaluation de la réponse immune au cours de l'infection humaine nous a démontré la régulation particulière des IgG3 et IgA spécifiques aux 28GST. L'influence des différents paramètres infectieux ou physiologiques sur cette régulation est résumé sur le schéma ci-dessous:

Paramètres intervenant sur la régulation isotypique IgG3/IgA



les deux types de réponses isotypiques étaient majoritaires chez les adultes comparativement aux enfants indiquant que l'immunité spécifique à la Sh28GST semblait s'acquérir avec l'âge. L'influence d'une co-infection palustre ou bilharzienne chez les enfants (*S. mansoni* ou *S. haematobium*) semble accélérer cette régulation normalement age-dépendante. Mais, l'effet sur la balance isotypique n'est pas identique selon la nature de la co-infection. La co-infection

bilharzienne (Sm + Sh) oriente vers l'isotype IgA tandis que celle par *P. falciparum* régule la réponse IgG3.

Le pic des réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST est observé chez l'adulte, chez qui l'intensité d'infection par *S. haematobium* est la plus faible. Ces deux isotypes pourraient ainsi intervenir dans une résistance naturelle à l'infection. Ce rôle semble confirmé par l'étude la réponse immune anti-Sm28GST chez des individus infectés par *S. mansoni*. En effet, seule ces deux réponses isotypiques étaient positivement corrélées à l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST et cette corrélation était uniquement détectée chez les individus présentant une faible intensité d'infection. Nous n'avons pas prouvé le rôle directe des IgG3 et IgA dans une "protection" acquise naturellement avec l'âge. Mais compte tenu des nombreux résultats observés chez l'animal ou chez l'homme, qui montrent une association entre l'inhibition de l'activité 28GST et un effet anti-fécondité (Capron, 1998), nos résultats suggèrent que ces deux isotypes pourraient jouer un rôle prépondérant dans l'immunité protectrice contre les schistosomiasis.

De plus, nous montrons que la régulation des réponses IgG3 et IgA anti-28GST avant chimiothérapie dépend du sexe des individus infectés. Par contre, le traitement par le PZQ n'a pas induit la même stimulation de la réponse immune spécifique selon le sexe des adultes. En effet, une augmentation de l'isotype IgG3 a été observé uniquement chez les femmes alors qu'une stimulation de la réponse IgA était détectée chez les hommes. L'influence du PZQ semblait donc "neutraliser" l'effet du sexe.

Cependant, 5 semaines après le traitement, nous avons également observé une augmentation de la réponse IgA anti-Sh28GST chez les femmes. De plus, l'effet d'une réinfection parasitaire chez l'adulte (observée entre 5 semaines et 6 mois après le traitement) semble réguler la réponse immune spécifique en faveur de l'isotype IgA, mais cette fois-ci pour les deux sexes. A la vue de ces résultats, nous pouvons imaginer qu'une fois la réponse IgA est "installée" (femmes avant PZQ ou hommes après PZQ), une nouvelle stimulation (PZQ chez les femmes ou réinfection pour les deux sexes) induirait systématiquement la maturation de l'immunité spécifique vers l'isotype IgA dirigé vis-à-vis de la Sh28GST.

II.2.2) Maturation de la réponse immune spécifique : vers l'isotype IgA?

D'une manière générale, la réponse IgA est souvent associée aux infections chroniques telles que la schistosomiase, ou d'autres infections helminthiques comme la strongyloïdiosis (Atkins *et al.*, 1997) et l'onchocercose (Salinas *et al.*, 1996). L'évaluation de cette réponse isotypique

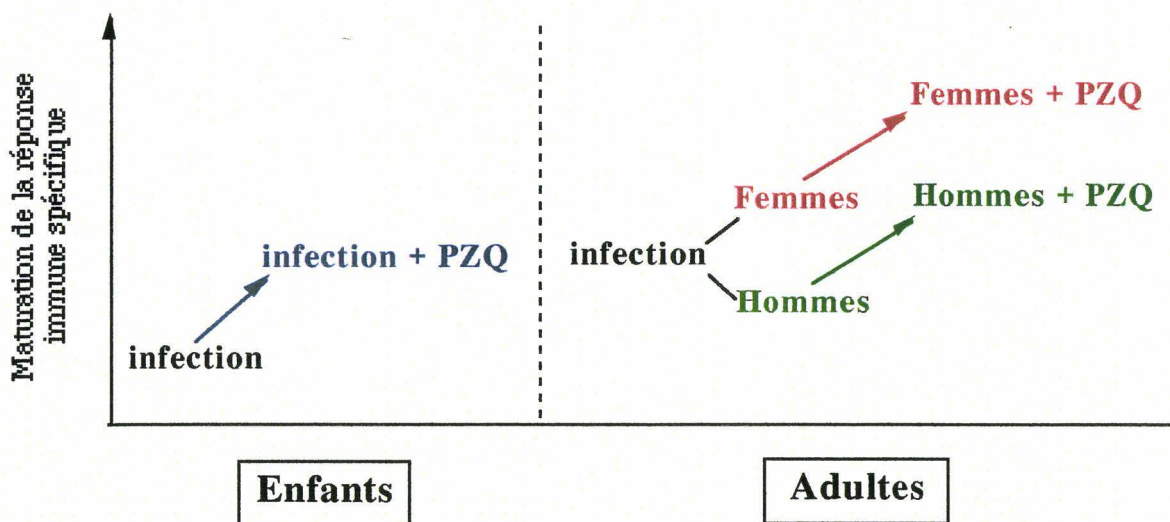
pourrait représenter une valeur diagnostic de la chronicité, comme ce fut décrit dans l'infection à *Yersinia enterocolitica* (Larren *et al.*, 1985).

Dans notre étude, nous avons suggéré que le profil immunitaire associant la production de TGF β et d'IL-10 et la présence de l'isotype IgA pourrait être une des caractéristiques de la maturation de la réponse immune spécifique à la Sh28GST. En effet, le TGF β et l'IL-10 interviennent dans l'induction de l'isotype IgA (Defrance *et al.*, 1992) et ces deux cytokines sont capables d'induire la génération de lymphocytes T présentant un phénotype de cellules mémoires et "matures" (Genestier *et al.*, 1999; Gerosa *et al.*, 1996).

La réponse IgA spécifique pourrait donc bien être caractéristique de la forte maturation de la réponse immune spécifique à la Sh28GST.

Le traitement par le PZQ peut être considéré comme une nouvelle stimulation de l'immunité spécifique et nous avons montré son influence sur la régulation de l'isotype IgA. Si nous suggérons que l'augmentation de la réponse IgA correspond à une maturation de la réponse immune anti-Sh28GST, nos résultats peuvent être résumés par le schéma suivant:

Effet du traitement sur la maturation de la réponse immune spécifique



Chez les enfants infectés par *S. haematobium*, une très faible réponse immune spécifique a été observée avant traitement, ce qui pourrait être représentatif d'une maturation "de base". L'effet d'une stimulation par le traitement (mais également par une co-infection bilharzienne) induirait la maturation de l'immunité spécifique vers une production d'IgA similaire à celle observée naturellement chez les adultes infectés. Chez ces adultes, nous pouvons suggérer que les femmes présentent une maturation de l'immunité spécifique plus importante que chez les hommes. L'association entre la réponse IgA et la maturation est également confirmée par les résultats obtenus après le traitement au PZQ chez les hommes où le niveau des IgA est devenu similaire à celui observé avant chimiothérapie chez les femmes.

L'ensemble de ces données suggèrent donc qu'une stimulation de la réponse immune anti-Sh28GST induit sa maturation vers l'isotype IgA.

L'effet du traitement suivi d'une période de réinfection chez les femmes a induit une augmentation de la réponse IgA, mais particulièrement dirigée contre le peptide 190-211. Ce phénomène n'était pas retrouvé dans la population masculine. Chez les femmes, la maturation de la réponse immune spécifique semble donc s'orienter non pas vers la réponse IgA dirigée contre la protéine entière mais plus spécifiquement vers cet épitope. Ainsi, nous pouvons imaginer que plus la réponse immune spécifique présente un profil "mature", plus son orientation sera en faveur d'une production d'IgA spécifique de l'épitope 190-211.

Chez les femmes infectées par *S. mansoni*, l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST était particulièrement associée à une forte réponse IgA spécifique du peptide 190-211. L'isotype IgA semble donc présenter une forte affinité envers cet épitope N terminal. Ce résultat suggère également que l'inhibition de l'activité enzymatique GST représenterait une des caractéristiques de la maturation de la réponse immune spécifique. Ceci semble être confirmé par les résultats d'inhibition de la Sh28GST que nous avons observés après le traitement au PZQ d'adultes infectés par *S. haematobium*. En effet, ce traitement induisait un renforcement de l'inhibition de l'activité enzymatique. La période de réinfection résultait également en son augmentation. Ce phénomène était plus marquée chez les femmes que chez les hommes suggérant, une fois de plus, la forte participation des IgA spécifiques au peptide 190-211 dans la neutralisation enzymatique.

La maturation de la réponse immune spécifique à la 28GST pourrait être caractérisée par la réponse IgA, probablement spécifique de l'épitope 190-211, capable d'inhiber l'activité enzymatique GST. Ce phénomène de maturation ici suggéré au cours de l'infection pourrait être associé à une résistance à la réinfection. Nous pouvons nous demander si il peut être induit après administration de la Sh28GST afin de générer un effet protecteur de la vaccination.

II.2) Après administration de la Sh28GST

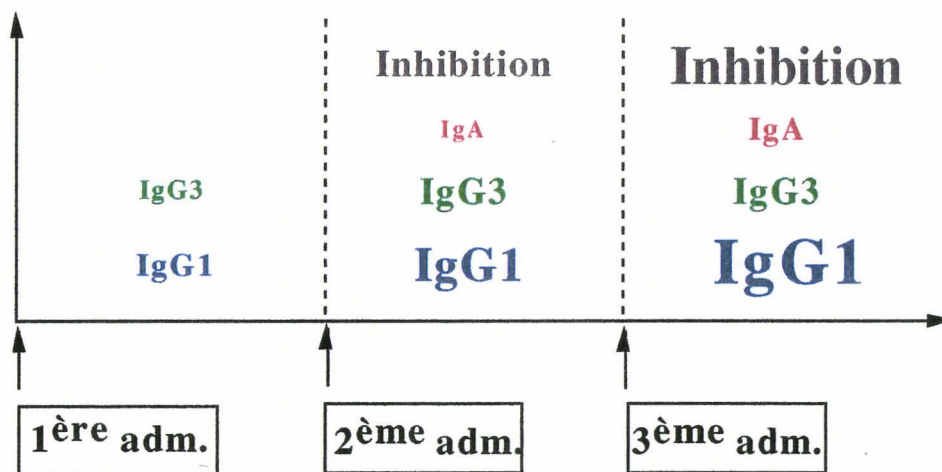
II.2.1) Profil de la réponse immune spécifique : essai clinique de phase I

Trois doses de la préparation vaccinale (rSh28GST + Alun) ont été administrées chez des volontaires sains (hommes âgés de 18 à 30 ans). Chacunes d'entre-elles ont induit une

stimulation de la réponse immune spécifique caractérisée par la production des différentes classes isotypiques, excepté les IgE.

Si l'isotype IgG1 est l'isotype majoritairement induit, nous focaliserons notre attention sur l'évolution des réponses IgG3 et IgA suite aux trois administrations, à la vue de nos précédents résultats. La fonctionnalité de la réponse immune engendrée est caractérisée par le niveau d'inhibition de l'activité enzymatique. Les résultats sont résumés sur le schéma suivant:

Evolution des réponses isotypiques anti-Sh28GST après administration:



Une seule administration de Sh28GST était capable d'induire de faibles réponses IgG1 et IgG3 spécifiques qui augmentent fortement suite à la seconde injection. Deux mois après celle-ci, une troisième injection induit une augmentation de l'isotype IgG1 tandis que la réponse IgG3 ne semblait pas varier. En fonction des administrations, l'intensité de l'inhibition enzymatique de la Sh28GST semble suivre celle de la réponse IgG1, ce que nous n'avons jamais observé au cours de l'infection dans les populations humaines.

Néanmoins, des similarités entre la réponse immune acquise au cours de l'infection et celle induite après immunisation peuvent être relevées. Tout d'abord, seule la réponse IgG3 anti-Sh28GST induite après deux administrations peut être statistiquement corrélée avec l'inhibition de l'activité enzymatique ($P < 0,05$). Il faut noter que cet essai clinique a été réalisé chez des hommes âgés de 18 à 30 ans. Ce résultat semble indiquer que les IgG3, induits après immunisation, présentent une fonction neutralisante de la 28GST comme nous l'avons observé chez les hommes infectés par *S. mansoni*.

Une seconde similarité concerne l'apparition d'une réponse IgA après immunisation par la Sh28GST. Non seulement, nous avons mis en évidence que deux administrations sont capables d'induire l'isotype IgA mais nous montrons également que cette réponse isotypique augmente après la troisième injection. La maturation de la réponse immune spécifique induite après

immunisation serait également caractérisée par l'augmentation de cet isotype. L'effet de la troisième injection de la préparation vaccinale chez des individus sains pourrait donc se comparer à celui observé après le traitement des hommes infectés. Dans ces deux cas, une stimulation de l'immunité anti-Sh28GST induit une maturation vers la production de l'isotype IgA.

Mais, nous pouvons nous demander si l'induction de la réponse IgA spécifique ne serait pas plus élevée si la Sh28GST était administrée chez des femmes adultes. Les résultats immunologiques observés au cours d'essais cliniques peuvent orienter les futures stratégies vaccinales contre différents pathogènes. La notion qu'une réponse immune spécifique peut être sexe-dépendante devrait ainsi être prise en considération lors des interventions immunothérapeutiques..

II.2.2) Administrations du candidat vaccinal chez les individus infectés

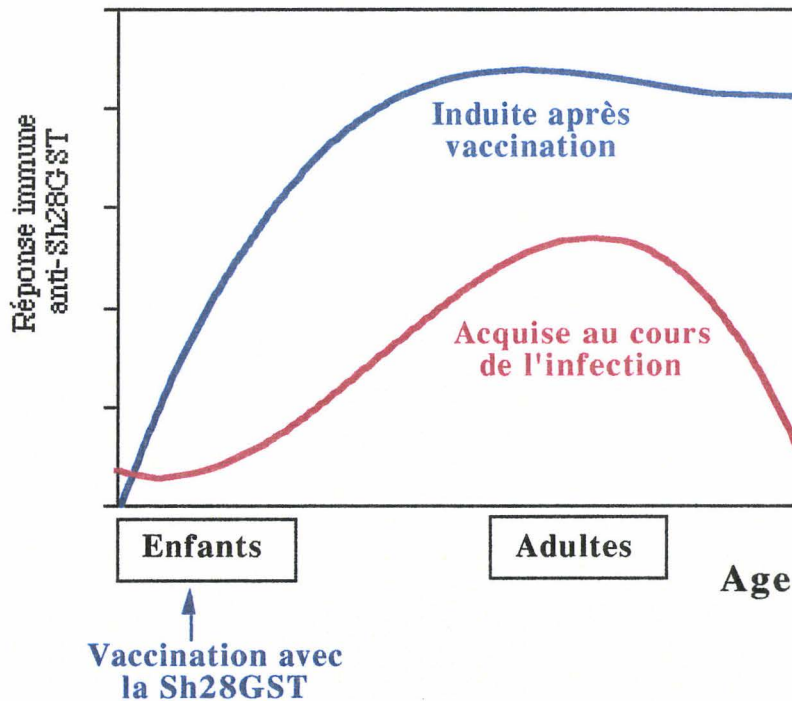
A la vue de l'ensemble de nos résultats, pouvons nous émettre des hypothèses sur les résultats des futurs essais cliniques chez des individus infectés?

La population cible des essais cliniques de phases II et III sera des enfants infectés. Or, nous avons montré qu'un traitement par le PZQ dans cette population était capable d'induire l'augmentation des réponses IgG3 et IgA anti-Sh28GST (sans aucune différence selon le sexe des enfants). Ce résultat indique que la réponse immune spécifique chez les jeunes individus peut être stimulée et s'oriente vers une réponse isotypique identique à celle que nous observons chez les adultes.

Nous avons également démontré le rôle particulier de ces 2 isotypes sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST. A la vue des nombreuses données chez l'animal (Capron *et al.*, 1998) et chez l'homme (Grzych *et al.*, 1993), la capacité des anticorps anti-28GST à inhiber la fonction enzymatique des 28GST semble crucial dans la protection contre la schistosomiase, en induisant particulièrement un effet anti-fécondité des vers.

La comparaison des réponses immunes obtenues chez des individus infectés et au cours de l'essai clinique de phase I semblent indiquer que notre stratégie vaccinale serait efficace contre la schistosomiase. Le principal objectif serait alors d'induire chez l'enfant infecté une forte réponse immune spécifique à la Sh28GST capable d'inhiber l'activité enzymatique de cette protéine. L'administration de la préparation vaccinale permettrait donc d'accélérer et d'orienter le développement de la réponse immune acquise naturellement avec l'âge. Cette notion peut être représentée par le schéma suivant:

Réponse anti-Sh28GST en fonction de l'âge des individus infectés



Nous pouvons nous demander quelles seront les caractéristiques de la maturation de la réponse immunitaire spécifique après l'administration de la Sh28GST chez les enfants infectés. En particulier, il est probable que la cinétique d'apparition des différents isotypes soit différente de celle observée chez les volontaires sains en phase I. La réponse IgG1 pourrait apparaître rapidement chez des enfants présentant déjà une réponse anti-Sh28GST acquise avec l'infection mais ne serait que très transitoire dans le temps.

En effet, la maturation de cette réponse immunitaire sera probablement accélérée chez ces enfants infectés et il ne serait pas étonnant de détecter précocement de fortes réponses IgG3 et IgA. L'exposition au parasite est pratiquement quotidienne dans la plupart des foyers d'infection et pourrait ainsi agir comme une stimulation continue de l'immunité anti-Sh28GST préalablement orientée par la vaccination. À la vue de nos résultats obtenus chez l'adulte, ce phénomène aboutirait à une maturation en faveur d'une forte réponse IgA capable d'inhiber l'activité enzymatique de la Sh28GST. Au cours des années qui suivent la vaccination, l'affinité de la réponse IgA pourrait être augmentée par les nombreuses réinfections.

Au cours des phases II chez l'enfant, l'immunisation par la Sh28GST sera systématiquement associée au traitement par le PZQ ce qui pourrait largement augmenter l'induction de la réponse IgA spécifique mais aussi l'orienter vers la reconnaissance de l'épitope 190-211. La synergie entre la vaccination et le traitement serait ainsi tout à fait adéquate pour induire une maturité de la réponse immunitaire présentant un profil protecteur, capable d'induire un important effet anti-fécondité du parasite.

La stratégie néanmoins se doit d'être définie. Le PZQ doit-il être administré avant ou après l'immunisation par la Sh28GST? Le démarrage du protocole de vaccination par le traitement pourrait notamment niveler les réponses immunes de chaque individu (fortes variations individuelles) permettant à la vaccination d'induire une réponse homogène. La vaccination suivie par la chimiothérapie induirait probablement un affinement de la réponse immunitaire spécifique, comme nous pouvons le suggérer d'après nos études. Nous ne pouvons pas imaginer, à l'heure actuelle, laquelle de ces deux stratégies sera la plus efficace pour induire une protection. C'est pour cela que les deux protocoles seront réalisés au cours des phases II et seuls les résultats de cet essai clinique permettront de choisir la meilleure stratégie pour déterminer la stratégie à adopter pour les phases III.

Perspectives :

Vaccin par voie orale?

En plus des résultats encourageants pour les futurs essais cliniques chez les individus infectés, nos études semblent confirmer tout le bien fondé du développement d'une stratégie de vaccination non invasive par voie muqueuse. Depuis de nombreuses années, notre groupe de recherche a montré qu'une seule administration par cette voie de la Sm28GST, encapsulée dans des vecteurs synthétiques (microsphères et liposomes), était capable d'induire une réponse IgA locale et systémique (Ivanoff *et al.*, 1996; Baras *et al.*, 1999). Récemment, Benoît Baras a montré qu'une seule administration orale de microsphères, contenant la Sh28GST, induisait une réponse anti-Sh28GST systémique grâce à une libération prolongée de l'antigène.

Une stratégie de vaccination par voie orale serait sans aucune doute déterminant pour les pays en voie de développement, en raison de son adaptabilité aux conditions du terrain et la non-utilisation d'aiguilles diminuant le risque de contamination. Dans le cas de la schistosomiase, la stimulation de la réponse IgA anti-28GST semble essentielle pour induire un effet anti-fécondité aboutissant à une réduction de la pathologie. La voie muqueuse favorisant ce type de réponse systémique semble donc tout indiquée. Pour ces raisons, un essai clinique de phase I (Sh28GST) est envisagé par voie orale en utilisant les microsphères qui présentent les avantages d'être totalement appropriées à la vaccination chez l'homme (innocuité totale) et d'être véritablement adaptée aux conditions difficiles du terrain.

Vaccination préventive?

La population cible des essais cliniques de phase II seront les enfants âgés de 6 à 10 ans. A cet âge, les individus sont déjà infectés depuis quelques années et la vaccination par la Sh28GST n'est donc pas préventive de l'infection mais immuno-thérapeutique en prévenant la pathologie. Tous nos résultats chez les enfants sont issus d'une population d'âge égal ou supérieure à 7 ans. Or, nous ne savons pas à quel âge a lieu les premières expositions au parasite et à quel âge les enfants développent une réponse immune spécifique à la Sh28GST. L'évaluation de ces paramètres permettrait une meilleure compréhension de l'évolution de l'immunité spécifique chez les très jeunes (de 1 à 6 ans) dans l'objectif de développer une vaccination préventive contre l'infection bilharzienne.

De plus, nous pourrions également caractériser le type de réponse immune spécifique transmise de la mère au nourrisson. En effet, nous pouvons imaginer qu'une immunité anti-Sh28GST peut-être transférée *in utero* comme cela a été montré vis-à-vis des antigènes parasitaires totaux. En effet, les cellules B purifiées à partir de sang de cordon de nourrisson né d'une mère infectée sont spécifiques d'antigènes de schistosomes et sont capables d'être restimulés *in vitro* induisant une production d'anticorps spécifiques (King *et al.*, 1998). Nous pouvons également suggérer que l'antigène Sh28GST, circulant dans le sang de la mère, pourrait traverser la barrière placentaire et ainsi induire la mise en place de cellules mémoires spécifiques à la Sh28GST chez le nourrisson. En parallèle, une mère infectée pourrait être capable de transférer ses anticorps spécifiques à son enfant au cours des premiers mois de la vie, suite à l'allaitement. En effet, il a été montré que des IgG de la mère pouvaient être retrouvées chez l'enfant, 6 à 12 mois après la naissance (Carlier *et al.*, 1995).

Le manque possible de maturité du système immunitaire du nourrisson et la présence des anticorps d'origine maternelle pourraient agir ensemble pour limiter l'apparition de la réponse immune vaccinale et réduire ainsi l'efficacité d'une vaccination dans les premiers mois après la naissance. En effet, il est généralement recommandé de ne pas vacciner contre certaines infections (rougeole) avant la disparition des anticorps maternelles chez le nourrisson (Albrecht *et al.*, 1977). Ainsi, la connaissance à la fois de la qualité de la réponse immune spécifique pouvant être transférée par la mère infectée et de l'âge moyen des premières infections (apparition de l'immunité spécifique) apporteraient de nombreuses informations afin d'estimer l'âge idéal d'une vaccination préventive contre la schistosomiase.

Ces perspectives font parties d'un plus vaste projet soumis, pour financement, à la Direction Générale de la Recherche (programme INCO-DEV) de la Communauté Européenne et intitulé : "Perinatal immunity to a vaccinal candidate in human schistosomiasis". La mise en place de ces études à St-Louis du Sénégal devrait débuter au cours de cette année 2000.

III) Orientation de la réponse immune spécifique : influence des hormones sexuelles

Nous avons montré que la réponse immune spécifique à la Sh28GST dépendait du sexe des individus infectés par *S. haematobium* alors que l'intensité d'infection était similaire entre les hommes et les femmes. Il semble donc que des médiateurs non-immunologiques telles que les stéroïdes sexuelles pourraient intervenir dans la régulation de l'immunité spécifique. Nos résultats soulèvent de nombreuses questions d'immunologie fondamentale concernant le rôle des hormones dans l'immunité spécifique.

De plus, nous avons montré que l'injection *in vivo* d'estradiol, chez des souris préalablement immunisées par la Sh28GST, induisait l'orientation de la réponse immune spécifique vers une production d'IgA. Une dérégulation hormonale est ainsi capable d'orienter une réponse immune spécifique préalablement induite par une immunisation. Cette influence par les hormones semble similaire à celle que nous observons chez les adultes infectés qui développent une réponse immune anti-Sh28GST au cours de l'infection parasitaire.

Les hormones sexuelles provoquent une régulation immunitaire en orientant la production de cytokines par des lymphocytes de type "mature" (Fox *et al.*, 1991). Ceci souligne l'intervention du réseau des cytokines dans la régulation médiée par les hormones mais suggère principalement que l'effet des stéroïdes serait plus marqué sur des cellules immunitaires de type "mémoire". Ainsi, il ne semble pas étonnant d'observer une régulation de la réponse immune anti-Sh28GST par l'estradiol chez des souris préalablement immunisées, et de mettre en évidence une réponse immune sexe-dépendante chez des adultes chroniquement infectés.

III.1) Influence des hormones sur la production des cytokines:

La présence sexe-dépendante des anticorps IgG3 et IgA anti-Sh28GST peut être attribuée à une régulation des cytokines impliquées directement dans la production de ces isotypes.

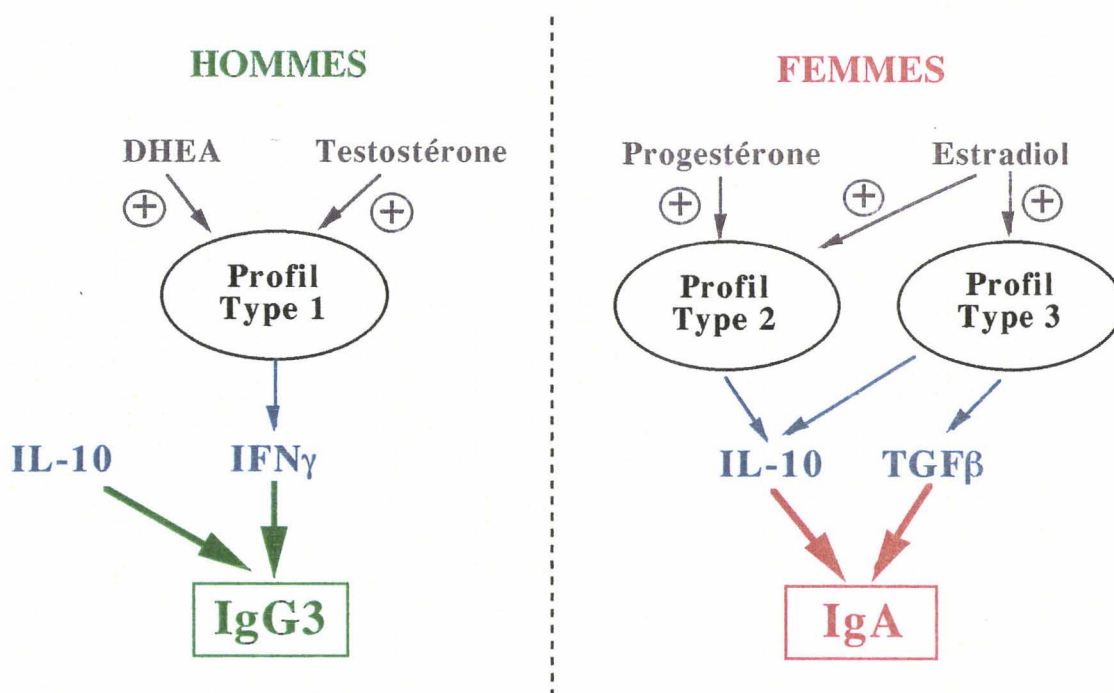
Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I de la partie "Résultats", les nombreuses données de la littérature nous suggèrent que chacune des hormones sexuelles pourrait réguler différemment le profil de la réponse immune spécifique. Cette hypothèse s'appuie notamment sur les exemples suivants:

- La Dehydroepiandrosterone (DHEA) augmente la synthèse d'IL-2 et d'IFN γ par des cellules Th (Daynes *et al.*, 1990).

- Le taux sérique de DHEA est plus important chez les hommes que chez les femmes (Young *et al.*, 1999) et cet androgène semble influencer uniquement la fonction des cellules T des hommes (Shelat *et al.*, 1998).
- La testostérone induit une réponse de type Th1 (lymphocytes T CD4+/IFN γ +) dans un modèle d'infection virale (myocardite) (Huber *et al.*, 1999).
- La progestérone favorise le développement de lymphocytes Th2 à partir de clones initialement Th1 (Piccinni *et al.*, 1995).
- L'estradiol induit la production dose-dépendante d'IL-10 par des clones de cellules T humaines (Gilmore *et al.*, 1997).
- L'estradiol augmente la production d'ARNm et la sécrétion du TGF β chez la femme (Ashcroft *et al.*, 1997).

Ces données, combinées à nos résultats, permettent d'élaborer une hypothèse concernant l'effet des hormones sexuelles sur la réponse immune anti-Sh28GST:

Orientation de la réponse immune anti-Sh28GST en fonction du sexe:



Chez les hommes, nous pouvons imaginer que seule la régulation positive de la testostérone sur la production d'IFN γ ne suffirait pas à induire la production de l'isotype IgG3. L'IL-10, cytokine induisant la commutation isotypique des lymphocytes B humains vers la production des IgG3 (Brière *et al.*, 1994a), pourrait représenter un second signal dans l'induction de cet isotype chez l'homme. Ainsi, deux signaux distincts pourraient intervenir : l'IL-10 induirait l'ARNm des IgG3 et l'IFN γ stimulerait la production et/ou la sécrétion de cet isotype.

L'effet d'une synergie entre deux cytokines est relativement bien établi dans l'induction de l'isotype IgA (DeFrance *et al.*, 1992). En effet, le TGF β est capable d'augmenter la fréquence de cellules IgA⁺ agissant alors sur la commutation isotypique (van Vlasselaer *et al.*, 1992) tandis que l'IL-10 favorise la sécrétion de cet isotype par les lymphocytes B (Brière *et al.*, 1994b). La régulation par les deux hormones sexuelles féminines semble ici différente selon la cytokine. En effet, nous pouvons imaginer que la progestérone et l'estradiol pourrait augmenter la production d'IL-10 en influençant la mise en place d'un profil Th2 mais que seule l'estradiol serait capable d'orienter la réponse immune vers un profil de type Th3, caractérisé par la production majoritaire de TGF β .

Ainsi, l'IL-10 semble donc jouer un rôle clef dans la régulation de la réponse immune anti-Sh28GST dans les deux sexes. Seul, le second signal par une cytokine distincte entre les deux sexes pourrait être sous la dépendance d'une régulation hormonale.

Perspectives :

Effet des hormones stéroïdes sur la réponse immune anti-Sh28GST acquise au cours de l'infection

Une forte régulation hormonale est observée au cours de la grossesse et les taux sériques de progestérone et d'estradiol sont très variable au cours de cette période.

L'évaluation *in vivo* de la réponse immune spécifique (anticorps et cytokines) pourrait être réalisée chez des femmes enceintes et infectées par *S. haematobium*. Les données obtenues à différents mois de la grossesse seraient comparées à celles observées chez des femmes infectées du même âge, mais non enceinte. Ces perspectives sont inclus dans un projet soumis au programme INCO-DEV de la Communauté Européenne et intitulé : "Perinatal immunity to a vaccinal candidate in human schistosomiasis" (Précédemment décrit dans le Chap. II.2.2).

Chez ces femmes et chez des hommes infectés dans le même foyer, nous pourrions évaluer l'effet des hormones sexuelles sur la régulation de la réponse immune spécifique. Pour cela, les cellules mononuclées des individus seraient restimulées *in vitro* par la Sh28GST en présence de différentes concentrations d'hormones sexuelles (testostérone, progestérone, estradiol). Les différentes combinaisons de stéroïdes pourront être utilisées *in vitro* afin de déterminer le profil de production de cytokines par les lymphocytes T (ARNm, sécrétion dans les surnageants) et d'anticorps par les cellules B (ELISPOT). Les résultats seraient comparés à ceux observés après

stimulation de cellules provenant d'individus sains permettant d'évaluer l'effet des hormones sur des cellules mémoires (individus infectés) ou sur des cellules naïves (individus sains).

Effet d'une dérégulation hormonale chez des souris immunisées avec la Sh28GST

Une étude plus importante ferait suite aux résultats préliminaires observés après l'injection d'estradiol chez des souris préalablement immunisées par la Sh28GST (Chapitre II.3). Des souris mâles ou femelles seraient castrées et/ou recevraient une administration de testostérone, d'estradiol ou de progestérone (concentrations physiologiques). Cette dérégulation hormonale, réalisée après la mise en place de la réponse immune spécifique (immunisation par la Sh28GST) permettra d'évaluer l'influence de ces stéroïdes sur l'orientation de la réponse spécifique. A l'inverse, les hormones pourraient être administrées avant toute immunisation permettant d'analyser le développement de la réponse anti-Sh28GST chez des souris dérégulées hormonalement.

L'effet particulier d'une hormone sur la production d'ARNm et/ou la sécrétion de cytokines serait évalué sur les cellules spléniques et spécifiques de la Sh28GST (restimulation *in vitro* par la Sh28GST). Cette étude répondrait à de nombreuses questions concernant l'activation d'un profil Th particulier par un seul type d'hormone, comme nous l'avons précédemment suggéré. Nous pouvons également imaginer que les hormones sexuelles sont capables d'orienter une réponse immune spécifique en régulant directement l'expression de molécules co-stimulatrices à la surface des APC (molécules du CMH de Classe I ou II, B7.1, B7.2, CD40) ou des lymphocytes T (CD28, CD40 Ligand).

Une stratégie complémentaire évaluerait, dans ces mêmes expériences chez la souris, l'influence des hormones sexuelles sur la mise en place d'une mémoire spécifique à la Sh28GST. La formation et le maintien de cellules B mémoires dépendent d'une stimulation antigénique particulière, qui a lieu dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. Leur nombre et leur volume reflètent en effet l'intensité et l'efficacité de la stimulation Ag (analysable par histomorphométrie). Le rôle des cellules folliculaires dendritiques (FDC) au niveau du centre germinatif semble important dans la mise en place d'une réponse immunitaire de type mémoire (Heinen, 1997). Ces cellules permettent en effet la rétention des complexes immuns Ag-Ac pour les exposer aux cellules B présentes dans le centre germinatif. Cette rétention semble intervenir dans la sélection clonale, la maturation et la commutation isotypique, paramètres impliqués dans l'apparition de cellules B mémoires. En effet, seuls les clones B présentant une forte affinité pour l'antigène sont sélectionnés et peuvent être stimulés. En revanche, les cellules B de faible affinité sont détruites par apoptose (Heinen, 1997).

L'objectif serait donc d'évaluer une relation entre le statut hormonal et le développement du centre germinatif. Nous pouvons ainsi nous demander si les hormones ne peuvent pas jouer un rôle sur la rétention d'antigènes dans les FDC et quelles sont les stéroïdes susceptibles d'influencer les réactions du centre germinatif, après stimulation antigénique par la Sh28GST.

Il a été suggéré que la perte fonctionnelle des centres germinatifs induirait la diminution des réponses immunes observées avec l'âge (Zeng *et al.*, 1997). Chez les personnes âgées, la dérégulation du système endocrinien semble être associée à l'inefficacité du système immunitaire à répondre à toute stimulation antigénique. Ce phénomène est constaté en fonction de l'âge mais il n'est pas exclu qu'il pourrait également dépendre du sexe des individus (Lamberts *et al.*, 1997; Miller, 1996).

Nous pourrions ainsi suggérer que les hormones sexuelles jouent un rôle non seulement dans l'orientation de la réponse immune spécifique mais également dans la maturation, l'affinité de l'immunité spécifique et dans la mise en place d'une mémoire immunitaire.

Ces perspectives d'immunologie fondamentale restent applicables au modèle antigénique de la Sh28GST et ces études seraient mises en place dans le cadre d'une collaboration avec le Dr W. Zorzi et le Prof. E. Heinen (Laboratoire d'Histologie, Université de Liège, Belgique). Elles ont donné lieu à l'écriture d'un projet intitulé : "Age- and Gender-dependent dysregulation of specific immune response : attempt of functional restoration by sexual steroid hormones".

III.2) Liaison entre les hormones sexuelles et la Sh28GST : rôle dans l'orientation de la réponse immune spécifique?

Mécanisme d'action des hormones:

L'influence des hormones sexuelles sur la régulation de la production des cytokines intervient à un niveau transcriptionnelle.

- effet direct : l'estradiol induit la production d'ARNm du TGF β (Ashcroft *et al.*, 1997)
- effet indirect : la progestérone favorise la production du facteur I κ B α qui peut se lier au facteur de transcription NF- κ B présent dans le cytoplasme de la cellule. Cette liaison provoque la rétention cytoplasmique de NF- κ B empêchant l'induction de l'ARNm codant pour le TNF α (Miller *et al.*, 1998).

Malgré la récente découverte d'un récepteur aux oestrogènes à la surface de cellules non-immunitaires (Collins *et al.*, 1999) ou de monocytes humains (Stefano *et al.*, 1999), le

mécanisme d'action des hormones dans une cellule est généralement lié à la présence d'un récepteur nucléaire spécifique de chaque stéroïde (Cutolo *et al.*, 1995). Ce mécanisme est applicable à l'ensemble des stéroïdes et est identique pour l'estradiol, la progestérone et la testostérone:

- les stéroïdes (sous forme libre) diffuse passivement à travers les membranes cellulaires (plasmique et nucléaire)
- dans le noyau: formation d'un complexe de haute affinité avec leur récepteur spécifique
- cette liaison du stéroïde "active" le récepteur nucléaire qui change de conformation
- le complexe "activé" est capable de se lier à des séquences spécifiques du DNA : les Steroids Response Elements (SRE)
- les SRE agissent comme de véritables facteurs de transcription, capables de réguler la production d'ARNm (en particulier ARNm codant pour une cytokine).

La présence de récepteurs spécifiques aux stéroïdes a été mise en évidence dans le noyau de nombreux types de cellules immunitaires (Escheverria *et al.*, 1994). En particulier, l'existence de ces récepteurs a été vérifiée dans des thymocytes et des lymphocytes de type CD4+ ou CD8+ (Cutolo *et al.*, 1995; Kammer *et al.*, 1998, Clerici *et al.*, 1991). La présence d'un récepteur aux oestrogènes a également été mise en évidence dans des cellules présentant l'antigène (APC), telles que des macrophages ou des lymphocytes B (Kammer *et al.*, 1998).

L'influence des hormones sexuelles sur l'orientation d'une réponse immune spécifique serait donc liée à l'activation de leur récepteurs respectifs au sein du noyau de la cellule immunitaire. Nous pouvons imaginer que cet effet, particulièrement décrit au niveau de lymphocytes T, pourrait également jouer un rôle dans la production de cytokines par les APC. Une APC possède non seulement la propriété de présenter l'antigène à la cellule T mais elle peut également orienter le profil immunitaire en sécrétant des cytokines immuno-régulatrices.

III.2.1) Influence des hormones sexuelles : rôle de la Sh28GST?

L'influence des hormones sexuelles sur l'orientation de la réponse immune dépend étroitement de la concentration de ces stéroïdes à l'intérieure de la cellule immunitaire (Fox *et al.*, 1991). La diffusion passive à travers la membrane plasmique est communément admise pour être le phénomène majeur du passage des stéroïdes dans le cytoplasme cellulaire.

Or, nous avons démontré dans le chapitre II que l'estradiol, la progestérone et la testostérone étaient capables de se lier directement à la protéine Sh28GST. De plus, une forte affinité de liaison était observée entre la testostérone et l'antigène en utilisant la technique BIACORE ($K_d = 5,7 \times 10^{-7}$). Une GST parasitaire est donc capable de lier des stéroïdes sexuelles de son hôte

comme il l'a été démontré vis-à-vis de GST de mammifères, protéines fortement exprimées dans le cytoplasme de différentes cellules (Listowsky *et al.*, 1988).

En effet, les GST de mammifères ont la propriété de se lier avec une forte affinité aux stéroïdes et ainsi d'influencer le transport, le métabolisme et l'action de ces hormones (Homma *et al.*, 1985). L'effet des hormones dépend de la concentration de ces GST dans le cytoplasme et il a été suggéré que les GST partageaient des homologies de séquences avec les récepteurs aux stéroïdes (Listowsky *et al.*, 1988). Ainsi, l'hypothèse que les GST puissent être des récepteurs intracellulaire aux stéroïdes est très plausible. De plus, ces enzymes sont plus abondantes dans une cellule que les récepteurs spécifiques aux stéroïdes et deux mécanismes d'action de ces GST ont été suggérés:

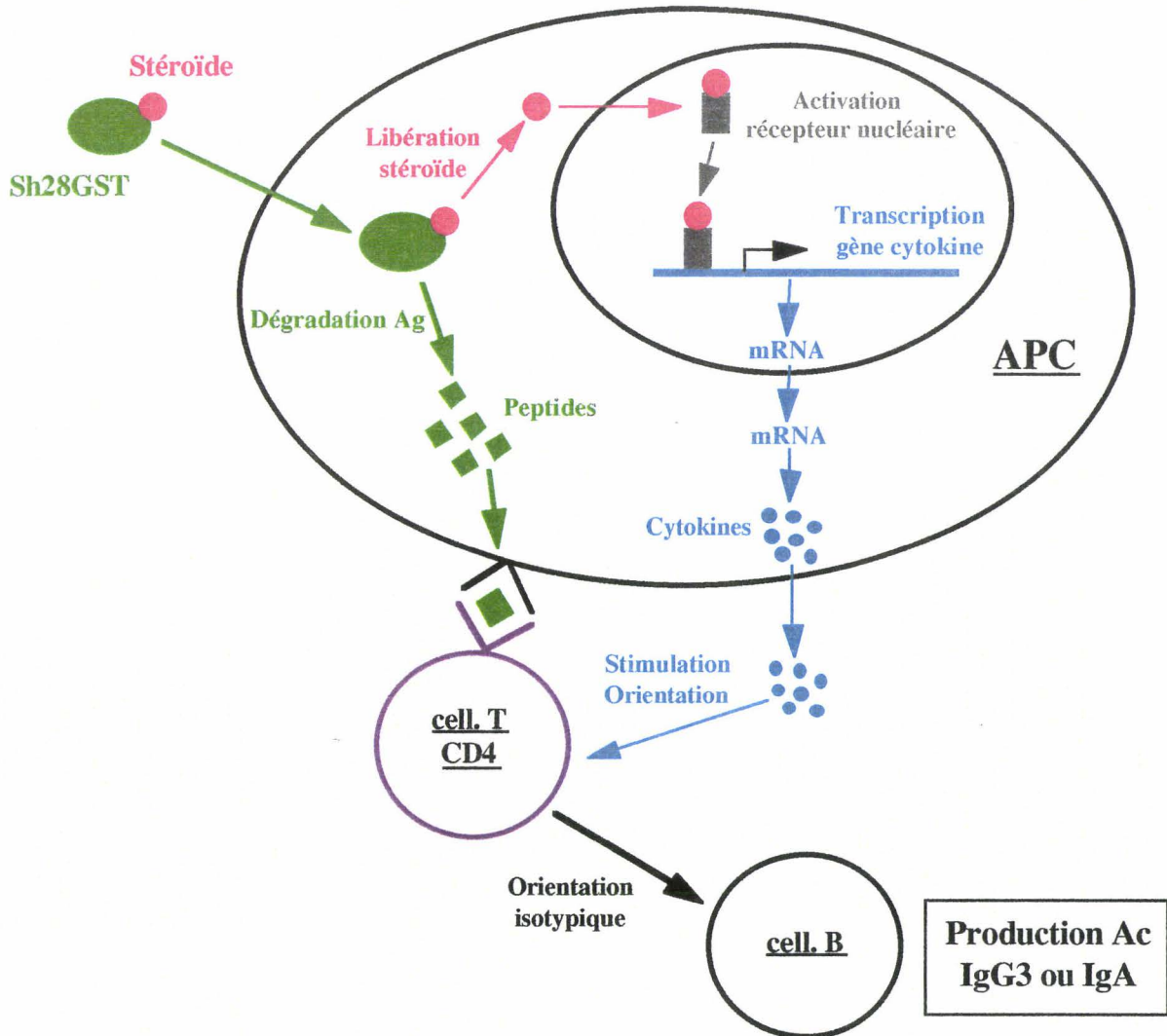
(1) Les GST, après liaison intra-cytoplasmique avec les stéroïdes, pourraient transférer l'hormone du cytoplasme vers son récepteur de haute affinité dans le noyau. Les GST faciliteraient ainsi l'accessibilité des hormones à leur récepteur nucléaire respectif.

(2) Si un stéroïde est en excès dans le cytoplasme ou si le récepteur spécifique est faiblement exprimé dans le noyau, les GST serviraient de "réservoir à hormones" cytoplasmique.

Nous avons montré que la Sh28GST partage la propriété, commune avec les GST de mammifères, de lier les hormones sexuelles. Nous pouvons ainsi supposer que cet antigène, une fois capté par les APC, permet une plus grande accessibilité des stéroïdes à leur récepteur nucléaire. L'influence des hormones sexuelles pourrait alors s'exercer sur les APC capables de présenter les épitopes de la Sh28GST aux lymphocytes CD4+ spécifiques.

Nous pouvons imaginer que le mécanisme d'action suivant participe à la régulation de la réponse immune spécifique observée en fonction du sexe des individus infectés:

Rôle de la liaison entre la Sh28GST et les hormones sexuelles dans l'orientation de la réponse immunitaire spécifique



La capture du complexe Sh28GST-stéroïde par les APC aboutirait à deux phénomènes distincts:

- la dégradation normale de l'antigène dans l'endo-lysosome puis la présentation de peptides par les molécules du CMH de Classe II aux cellules T CD4+
- la rupture de la liaison Sh28GST-stéroïde dans l'endosome puis la diffusion passive de l'hormone à travers les membranes intracellulaires jusqu'au noyau.

Une fois le stéroïde dans le noyau et après liaison avec son récepteur spécifique, ce dernier est activé et induit la transcription de gène codant pour des cytokines immuno-régulatrices. Les APC peuvent alors sécréter des cytokines particulières capables de stimuler les lymphocytes T CD4+ et notamment d'orienter leur profil immunitaire (Th1, Th2 ou Th3). Le profil des cytokines sécrétées par ces lymphocytes Th permettra de réguler la commutation isotypique des cellules B et/ou la production d'isotypes définis.

Nous pouvons imaginer que les cytokines produites par les APC seront différentes selon le type d'hormone liée à la Sh28GST. En effet, la testostérone pourrait induire la production de cytokine de type-1 (IFN γ , IL-12, IL-2) par les APC et ainsi orienter la réponse immune vers un profil Th1. La sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes Th1 stimulerait les cellules B spécifiques en faveur d'une production d'IgG3, comme nous l'avons décrit précédemment.

Chez les femmes, la présence d'estradiol dans le noyau, "facilitée" par sa liaison à l'antigène, induirait la sécrétion d'IL-10 et de TGF β par les APC qui serait en faveur de la mise en place d'un profil de type Th3 associé à une production de l'isotype IgA. Le rôle de la progestérone sur l'orientation vers un profil Th2 favoriserait également la production des IgA par l'intermédiaire de l'IL-10.

Ces hypothèses s'appuient sur des données bibliographiques indiquant que des stéroïdes ont la propriété de réguler la production de cytokines immuno-régulatrices (IL-10, IL-12) par les APC, telles que les cellules dendritiques humaines (de Jong *et al.*, 1999; Piemonti *et al.*, 1999). Il a également été démontré que la testostérone, l'estradiol et la progestérone ont de nombreux effets biologiques sur des APC (prolifération, présentation, migration...) suggérant l'existence ubiquitaire de récepteur nucléaire aux stéroïdes dans ces cellules immunitaires (Wira *et al.*, 1995; Koyama *et al.*, 1989; Kammer *et al.*, 1998).

De plus, les APC telles que les macrophages ou les lymphocytes B sont capables de produire de l'IFN γ , de l'IL-2, de l'IL-10 et du TGF β (Pistoia *et al.*, 1997). A l'heure actuelle, les cellules dendritiques (DC) semblent représenter les APC les plus efficaces non seulement dans la présentation de l'antigène mais également dans la stimulation des lymphocytes T CD4+. Elles pourraient jouer un rôle clef dans l'orientation de la réponse anti-Sh28GST observée. Les DC sont la source principale d'IL-12 et une étude récente a montré qu'une certaine population de DC, nommé DC1 était également capable de produire de l'IFN γ et de l'IL-2 (Rissoan *et al.*, 1999). L'expression des ARNm (de Saint-Vis *et al.*, 1998) et la production d'IL-10 et de TGF β par les DC ont également été démontrées chez l'homme (Rissoan *et al.*, 1999; Letterio *et al.*, 1998).

Dans notre étude, nous avons montré que la réponse immune spécifique à la 28GST était sexe-dépendante et nous avons ainsi suggéré l'influence des hormones sexuelles sur son orientation. Or, nous n'avons pas retrouvé un tel phénomène vis-à-vis d'un autre antigène spécifique, la KLH, et aucune étude concernant d'autres antigènes spécifiques de schistosome n'a démontré un tel effet du sexe sur la réponse immune.

La liaison entre les hormones sexuelles et la 28GST pourrait donc être un processus clef dans l'orientation de la réponse immune spécifique. La 28GST interviendrait directement dans ce

phénomène en "facilitant" ou en "accompagnant" l'accès des stéroïdes aux cellules immunitaires spécifiques de l'antigène.

III.2.2) Orientation de la réponse épitopique par les hormones?

Nous avons démontré une liaison spécifique entre la testostérone et le peptide 24-43 dérivé de la séquence primaire de la Sh28GST ($K_d=7,4 \times 10^{-6}$). En revanche, aucune liaison n'avait été observée entre cette hormone et les peptides 115-131 et 190-211. L'estradiol était capable de se lier aux deux peptides N et C terminaux de la protéine et ne présentait aucune spécificité pour le 115-131.

Ces résultats suggèrent que les différents stéroïdes ne présentaient pas la même spécificité de liaison à la Sh28GST mais surtout, que les hormones sexuelles étaient capables de se lier à des peptides particuliers de la Sh28GST.

Ces stéroïdes peuvent probablement se lier à d'autres séquences d'acides aminés de la protéine non identifiées dans notre étude. Néanmoins, les hormones sexuelles peuvent se fixer à des épitopes spécifiques de la Sh28GST et nous pouvons nous demander si cette liaison ne pourrait pas interférer dans la reconnaissance d'un épitope par le système immunitaire.

Ainsi le stéroïde, fixé à un épitope présenté par les molécules de Classe II du CMH à la surface des APC, pourrait interférer avec la reconnaissance du récepteur spécifique présent sur les lymphocytes T (TCR). Ce phénomène pourrait également se produire dans la reconnaissance spécifique entre une cellule B et un lymphocyte T. Dans ces deux cas, la conséquence serait la même: les hormones liées à l'épitope neutraliseraient la reconnaissance immunitaire limitant fortement la stimulation de l'immunité spécifique à cet épitope.

La liaison épitope-stéroïde pourrait intervenir à un autre niveau dans le processus de la présentation et de la reconnaissance immunitaire. En effet, il a été démontré que des molécules, telles que des peptides synthétisés d'une manière aléatoire (heptapeptide ou Copolymer 1), étaient capables de se fixer aux protéines de Classe II du CMH en lieu et place de l'épitope spécifique (Falcioni *et al.*, 1999; Fridkis-Hareli *et al.*, 1994). Ces peptides synthétiques agissent donc par compétition et neutralisent le processus de présentation des molécules du CMH à la surface des APC. Cette compétition aboutit à une inhibition de la réponse T spécifique de l'épitope et l'utilisation de ces molécules inhibitrices semble représenter un traitement prometteur contre les maladies autoimmunitaires. Le Poly Ethylène Glycol (PEG) présente également la propriété de se fixer aux molécules du CMH et ainsi d'inhiber la reconnaissance CMH-TCR (Bouvier *et al.*, 1996). Ce dernier résultat suggère donc qu'un composé non-peptidique pourrait ainsi neutraliser la présentation d'un épitope aux lymphocytes T et ainsi inhiber l'initiation d'une réponse immune spécifique.

Contrairement au mécanisme d'action "positif" de la liaison Sh28GST-stéroïde sur l'orientation de la réponse immune spécifique par les hormones, la fixation des hormones sexuelles sur un épitope particulier serait dans ce cas précis "néfaste" au développement d'une réponse immune spécifique de cet épitope. Cette fois-ci, les hormones n'interviendraient plus dans l'orientation de la réponse immune spécifique grâce à leur action par les cytokines mais réguleraient la mise en place des réponses épitopiques. Nous pouvons imaginer que cette neutralisation hormone-dépendante pourrait favoriser la mise en place d'une réponse immune dirigée contre un autre épitope que celui engagé dans la liaison avec le stéroïde.

La fixation d'une hormone sexuelle particulière pourrait donc jouer un rôle dans la balance entre les différentes réponses épitopiques.

Perspectives:

L'influence de la liaison entre la Sh28GST et les hormones sexuelles serait évaluée dans un modèle de restimulation *in vitro* de cellules spléniques et ganglionnaires de souris saines (cellules naïves) ou de souris préalablement immunisées par la Sh28GST (cellules mémoires). Le complexe antigène/stéroïde, préalablement formé, pourrait être mis en contact des cellules et la production de cytokines serait alors analysée (ARNm, sécrétion dans les surnageants, phénotypage des cellules produisant les cytokines). Ce profil immunitaire serait comparé à celui observé après une stimulation par la Sh28GST suivie ou précédée par l'incubation des cellules avec le stéroïde.

Le suivi intracellulaire du complexe Sh28GST/stéroïde au sein d'une cellule immunitaire puis du devenir de chaque molécule pourraient être étudiée en histologie ou en microscopie électronique. Cette étude serait réalisée sur différents types d'APC (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B) afin de déterminer si ce complexe est capable d'intervenir de la même manière quelque soit le type cellulaire.

Au cours des expériences de restimulation *in vitro*, l'utilisation d'autres GST parasite ou d'autres antigènes spécifiques ne présentant pas la capacité de lier les hormones permettrait de déterminer le rôle spécifique de la 28GST dans l'orientation d'une réponse immune par les hormones.

En plus de l'influence des hormones dans l'orientation de la production de cytokines, les stéroïdes pourraient intervenir sur la régulation de l'immunité par leur liaison à un peptide particulier neutralisant une réponse épitopique spécifique. Or, il est connu que l'estradiol et la progestérone peuvent réguler la présentation antigénique en influençant l'expression des

molécules du CMH de Classe II à la surface des APC (Wira *et al.*, 1995). Mais, le rôle des hormones dans la reconnaissance immunitaire pourrait se faire à un autre niveau. L'engagement du TCR des lymphocytes représente un mécanisme essentiel dans l'induction d'une réponse immune spécifique et l'absence de reconnaissance entre ces deux partenaires pourrait être la conséquence d'une liaison entre un épitope et le stéroïde. Les hormones sexuelles auraient ainsi la capacité d'intervenir dans l'orientation des réponses épitopiques.

Ces mécanismes de régulation immunitaire par les hormones pourraient être liés à la particularité de la 28GST. Néanmoins, il est reconnu que la nature de l'antigène influence la régulation de la réponse immune. Il n'est pas exclu que de nombreux antigènes présentent la propriété de se lier aux stéroïdes et de participer ainsi activement dans l'orientation de leur propre réponse immunitaire.

Conclusion générale

Depuis la découverte des antigènes 28GST des différentes espèces de schistosomes, les nombreuses expériences dans les modèles animaux ont montré que ces protéines enzymatiques représentaient à ce jour les candidats vaccinaux les plus prometteurs contre la schistosomiase.

Les résultats concernant l'évaluation de la réponse immune spécifique à la Sm28GST dans les populations infectées par *S. mansoni* au Kenya (Auriault *et al.*, 1990, Grzych *et al.*, 1993) sont venus renforcer les données expérimentales. Elles indiquaient en effet que la réponse anticorps spécifique pouvait jouer un rôle important dans l'acquisition naturelle d'une résistance à la réinfection.

Le travail de cette thèse confirme l'existence et suggère le rôle protecteur de la réponse immune spécifique à cet antigène vaccinal mais cette fois-ci au cours de l'infection humaine par *S. haematobium*. Non seulement la réponse immune dirigée contre la Sh28GST participe à l'acquisition d'une résistance naturelle à l'infection observée chez les adultes mais l'évaluation de l'immunité anti-Sh28GST dans les populations infectées nous a permis de découvrir de nouvelles propriétés immunorégulatrices spécifiques de cet antigène.

Nos études immuno-épidémiologiques concernant les protéines 28GST (Sm28GST et Sh28GST) sont à la base de la découverte de nouveaux mécanismes de régulation de la réponse immune spécifique.

Par exemple, l'orientation de la réponse anti-28GST semble dépendre de la nature de la co-infection parasitaire (bilharziose ou paludisme). Il n'est alors pas exclu qu'un tel phénomène puisse être observé vis-à-vis d'autres antigènes de schistosomes ou de *Plasmodium falciparum*. En particulier, de nombreuses équipes de recherche travaillent sur l'élaboration d'un vaccin contre le paludisme ou contre d'autres infections parasitaires. L'influence de co-infections sur la réponse immune spécifique à un antigène vaccinal pourrait donc être prise en considération non seulement dans les études sur la régulation de l'immunité anti-infectieuse mais également dans le développement et/ou l'évaluation des vaccins contre les parasitoses.

L'évaluation de la réponse immune anti-28GST en fonction du sexe des individus infectés a abouti probablement aux résultats les plus intéressants de notre travail. En effet, l'étude de la réponse immune sexe-dépendante nous a permis de mettre en évidence l'existence de profils immunitaires particuliers caractérisés par la présence *in vivo* d'isotypes spécifiques et la production *in vitro* des cytokines associées. Notamment, l'existence d'un profil de type Th3 pouvait être suggérée pour la première fois au cours d'une infection et était probablement liée à la chronicité de l'infection bilharzienne. A la vue d'une régulation sexe-dépendante de la réponse immune spécifique à la Sh28GST et à la Sm28GST au cours de l'infection par *S. haematobium* et par *S. mansoni* respectivement, nos résultats pourraient être à la base de nombreux projets de recherche concernant l'influence des hormones sexuelles sur la régulation de la réponse immune spécifique.

De plus, l'effet d'une stimulation de cette réponse sexe-dépendante, stimulation provoquée dans notre cas par le traitement au PZQ, a montré des mécanismes originaux d'immunorégulation. Cette nouvelle stimulation induit une régulation isotypique vers la production d'IgA chez les hommes tandis que chez les femmes une régulation épitopique de la réponse IgA spécifique est observée. Cette différence dépend probablement du degré de maturation de la réponse immune acquise avant le traitement qui est différent en fonction du sexe des individus infectés. Ce résultat observé avec notre antigène modèle met en évidence, d'une manière plus large, certaines propriétés importantes de la régulation immunitaire spécifique. Après stimulation, cette régulation peut être caractérisée non seulement par la variation de la réponse isotypique mais également par le changement de la réponse épitopique.

L'orientation de la réponse immune anti-28GST en fonction du sexe des individus semble être spécifique à l'antigène Sh28GST car aucune réponse sexe-dépendante n'a été observée vis-à-vis d'autres antigènes parasitaires (SEA, KLH). L'enzyme 28GST pourrait ainsi jouer un rôle majeur dans la régulation de sa propre réponse immune. D'une manière intéressante, nous avons mis en évidence que la Sh28GST présentait la propriété de se lier spécifiquement aux hormones sexuelles. Cette liaison pourrait faciliter et/ou orienter l'accès de ces stéroïdes aux cellules immunitaires spécifiques de l'antigène ce qui favoriserait l'influence des hormones sexuelles sur la réponse immune anti-Sh28GST. D'une manière plus générale, une liaison entre un antigène et un stéroïde (hormone sexuelle, glucocorticoïde, ...) pourrait se révéler prépondérante dans la régulation d'une réponse immune spécifique par les hormones. Cette notion pourrait être également prise en considération dans le développement de stratégies vaccinales contre des infections bactériennes et parasitaires.

Une seconde propriété de la liaison entre une GST parasite et les hormones sexuelles concerne la relation hôte-parasite. En effet, le système hormonal de l'hôte joue un rôle non négligeable dans le développement et le métabolisme des parasites. L'action connue des hormones sexuelles sur le métabolisme du schistosome pourrait être par conséquent liée aux propriétés de la Sh28GST. Cette protéine serait capable de transporter les stéroïdes au sein même du parasite facilitant ainsi l'action de ces hormones. De plus, nous avons montré notamment que la testostérone était capable d'inhiber l'activité enzymatique de la Sh28GST. En réduisant les capacités de détoxification du schistosome et sa fécondité, cette neutralisation pourrait jouer un rôle clef dans le développement du schistosome au sein de son hôte définitif.

L'ensemble de ce travail ouvre donc une nouvelle voie de recherche dans la relation hôte-parasite non seulement pour les schistosomes mais également pour d'autres parasitoses.

Enfin, nos résultats immuno-épidémiologiques observés au cours de l'infection par *S. haematobium* et par *S. mansoni* confirment le choix de l'antigène 28GST comme candidat vaccinal contre les schistosomiasis. En effet, l'acquisition de la réponse immune spécifique

avec l'âge pourrait être associée à une résistance naturelle à l'infection. Ce phénomène semble être plus particulièrement lié aux réponses isotypiques IgG3 et IgA capables de neutraliser l'activité enzymatique GST. Dans les essais cliniques de Phase 1a, l'administration de la préparation vaccinale BILHVAX induit une importante immunogénicité caractérisée en particulier par la forte inhibition de l'activité enzymatique de la Sh28GST. D'une manière intéressante, la production de l'isotype IgG3 après deux administrations et l'apparition des IgA spécifiques après la troisième pourraient également intervenir dans l'inhibition enzymatique. Ces résultats similaires observés au cours de l'infection humaine et après administration chez l'homme renforcent d'une manière générale le bien fondé et l'importance des observations immuno-épidémiologiques réalisées dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre un pathogène. Dans le cas de la schistosomiase, l'ensemble de ces données confirment chez l'homme les mécanismes de protection observés après administration des 28 GST dans les modèles expérimentaux. Ces résultats sont tout à fait encourageant dans la perspective des futurs essais cliniques de Phase 2. La totalité des résultats observés depuis la découverte de la 28GST par le Prof. A. CAPRON et son équipe fait donc de cet antigène le candidat le mieux caractérisé et le plus prometteur pour aboutir à une vaccination efficace contre les schistosomiasis.

Bibliographie

- Abdalah, A. "Bacteriological flora in urinary schistosomiasis." *J. Egypt. Med. Assoc.* 1946. **29**: 33-35.
- Abdalla, K. F., S. M. Abdel-Aziz, A. F. Fakahany, *et al.* "Effect of praziquantel on sex hormone levels in murine *Schistosoma mansoni*." *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 1994. **24**: 627-632.
- Abe, T., J. T. Forbes and D. G. Colley "Natural killer cell activity during murine schistosomiasis." *J. Parasitol.* 1983. **69**: 1001-1005.
- Abel, L., F. Demenais, A. Prata, *et al.* "Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*." *Am. J. Hum. Gen.* 1991. **48**: 959-970.
- Agnew, A., A. J. Fulford, M. T. Mwanje, *et al.* "Age-dependent reduction of schistosome fecundity in *Schistosoma haematobium* but not *Schistosoma mansoni* infections in humans." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996. **55**: 338-343.
- Ahmed, S. A. and M. Z. Gad "Diagnostic value of serum lactate dehydrogenase isoenzyme and amino acid patterns in several schistosomal and non-schistosomal disorders as compared to other biochemical parameters." *Disease markers* 1996. **13**: 19-29.
- Akdis, C. A., T. Blesken, M. Akdis, *et al.* "Rôle of interleukin 10 in specific immunotherapy." *J. Clin. Invest.* 1998. **102**(1): 98-106.
- Al Sherbiny, M. M. and A. Deelder "Application of immunodiagnostic assays: detection of antibodies and circulating antigens in human schistosomiasis and correlation with clinical findings." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999. **60**: 960-966.
- Alexander, J. and W. H. Stimson "Sex hormones and the course of parasitic infection." *Parasitol. Today* 1988. **4**: 189-193.
- Amiri, P., R. M. Locksley, T. G. Parslow, *et al.* "Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice." *Nature* 1992. **356**: 604-607.
- Andrews, P. "Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity." *Pharmac. Ther.* 1985. **29**: 119-156.
- Ansar Ahmed, S. and N. Talal "Sex hormones and the immune system. part 2. Animal data." *Baillière's Clinical Rheumatology* 1990. **4**: 13-31.
- Araneo, B. A., T. Dowell, M. Diegel, *et al.* "Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukine-4 (IL-4), IL-5, and γ -interferon, but not IL-2 by activated murine T cells." *Blood* 1991. **78**: 688-699.
- Araujo, M. I., A. R. de Jesus, O. Bacellar, *et al.* "Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis." *Eur. J. Immunol.* 1996. **26**: 1399-1403.
- Aravinda, S., B. Gopalakrishnan, C. S. Dey, *et al.* "A testicular protein important for fertility has glutathione S-transferase activity and is localized extracellularly in the seminiferous tubules." *J. Biol. Chem.* 1995. **270**: 15675-15685.
- Ashroft, G. S., J. Dodsworth, E. van Boxtel, *et al.* "Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels." *Nature Med.* 1997. **3**: 1209-1215.
- Atkins, N. S., J. F. Lindo, M. G. Lee, *et al.* "Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997. **91**: 609-613.
- Attalah, A. M., F. A. Lewis, A. Urritia-Haw, *et al.* "Natural killer cells (NK) and Antibody-Dependent Cell mediated Cytotoxicity (ADCC) components of *Schistosoma mansoni* infection." *Intern. Arch. Allerg. Immunol.* 1980. **13**: 351-354.
- Auriault, C., J. Pestel, M. Joseph, *et al.* "Interaction between macrophages and *Schistosoma mansoni* schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula." *Cell. Immunol.* 1981. **62**: 15-27.
- Auriault, C., H. Gras-Masse, I. Wolowczuk, *et al.* "Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides." *J. Immunol.* 1988. **55**: 1687-1694.
- Auriault, C., H. Gras-Masse, R. J. Pierce, *et al.* "Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides." *J. Clin. Microbiol.* 1990. **28**: 1918-1924.
- Auriault, C., I. Wolowczuk, H. Gras-Masse, *et al.* "Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST)." *Peptide Res.* 1991. **4**(1): 6-11.
- B**alloul, J. M., J. M. Grzych, R. J. Pierce, *et al.* "A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis." *J. Immunol.* 1987a. **138**: 3448-3453.
- Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, *et al.* "Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes." *Nature* 1987b. **326**: 149-153.

- Balsch, P. F. (1991). Chapter 4. Schistosomes. Development, reproduction and host relation. O. U. Press: 137-171.
- Baras, B., M. A. Benoit, L. Dupré, *et al.* "Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a *Schistosoma mansoni* antigen." *Infect. Immun.* 1999. **67**: 2643-2648.
- Baras, B., M. A. Benoit, O. Poulain-Godefroy, *et al.* "Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers." *Vaccine* 2000. **18**: 1495-1505.
- Barrabes, A., T. H. Duong, F. Reynouard, *et al.* "La parasitose expérimentale à *Schistosoma mansoni* du hamster doré. Etude de l'effet sur l'intensité du parasitisme et sur le taux d'anticorps circulants, après administration d'estradiol, de testostérone ou de progestérone." *Ann. Parasitol.* 1980. **55**: 671-677.
- Barral, A., M. Barral-Netto, E. C. Yong, *et al.* "Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. **1993**: 3442-3446.
- Barsoum, I. S., G. L. Freeman, M. Habib, *et al.* "Evaluation of natural killer activity in human schistosomiasis." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1984. **33**: 451-454.
- Basch, P. F. "Intergeneric reproductive stimulation and parthenogenesis in *Schistosoma mansoni*." *Parasitology* 1984. **89**: 369-376.
- Basch, P. F. "Why do schistosomes have separate sexes?" *Parasitol. Today* 1990. **6**: 160-163.
- Basch, P. F. (1991). Schistosome - Development, reproduction and host relations. New York, Oxford, Oxford University Press.
- Bassily, A., C. Hyams, N. El-Gohrad, *et al.* "Hepatitis B vaccination in patients infected with *Schistosoma mansoni* : duration of immunity and immunogenicity of a low dose intradermal booster." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990. **84**: 401-402.
- Baswaïd, S., B. Gharib, O. Doumbo, *et al.* "Ecdysteroids in urine of African patients infected with helminths." *Acta Tropica* 1990. **47**: 197-204.
- Becher, B., M. Blain, P. Giacomini, *et al.* "Inhibition of Th1 polarization by soluble TNF receptor is dependent on antigen-presenting cell-derived IL-12." *J. Immunol.* 1999. **162**: 684-688.
- Becker, M. M., B. H. Kalinna, G. J. Waïne, *et al.* "Gene cloning, overproduction and purification of a functionally active cytoplasmic fatty acid-binding protein (Sj-FABPc) from the human blood fluke *Schistosoma japonicum*." *Gene* 1994. **148**: 321-325.
- Benten, W. P., F. Wunderlich and H. Mossmann "testosterone-induced suppression of self-healing *Plasmodium chabaudi* malaria: an effect not mediated by androgen receptors?" *J. Endocrinol.* 1992. **135**: 407-413.
- Bergerot, I., C. Ploix, J. Petersen, *et al.* "A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. **94**: 4610-4614.
- Bergquist, N. R. and D. G. Colley "Schistosomiasis vaccines: research to development." *Parasitol. Today* 1998. **14**: 99-104.
- Bickle, Q. D., M. G. Taylor, M. J. Doenhoff, *et al.* "Immunization of mice with gamma-irradiated intramuscularly injected schistosomula of *Schistosoma mansoni*." *Parasitology* 1979. **79**: 209-222.
- Bilharz, T. "Fernere beobachtungen über das pfortader des menschen bewohnende *Distomum haematobium* und sein verhältnis zu gewissen pathologischen bildungen." *Z. Wissenschaftl. Zool.* 1852. **4**: 72-76.
- Boctor, F. N. and J. B. Peter "IgG subclasses in human chronic schistosomiasis: over-production of schistosome-specific and non-specific IgG4." *Clin. Exp. Immunol.* 1990. **82**: 574-578.
- Bonnard, P., N. Kalach, J. F. Cadranel, *et al.* "Manifestations digestives et hépatiques de la bilharziose." *Gastroenterol. Clin. Biol. sous presse*
- Bonnard, P., R. Lanuit, J. P. Dompnier, *et al.* "Critères échographiques prédictifs d'hypertension portale due à *Schistosoma mansoni* dans une zone d'endémie récente." *soumis.*
- Boulanger, D., G. D. F. Reid, R. F. Sturrock, *et al.* "Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*." *Parasite Immunol.* 1991. **13**: 473-490.
- Boulanger, D., A. Warter, F. Trottein, *et al.* "Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase clones from *S. mansoni*." *Parasite Immunol.* 1995. **17**: 361-369.
- Boulanger, D., A. Warter, B. Sellin, *et al.* "Vaccine potential of a recombinant Glutathione S-Transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge." *Vaccine* 1999. **17**: 319-326.
- Bout, D., M. Joseph, J. R. David, *et al.* "In vitro killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages." *J. Immunol.* 1981. **127**: 1-5.

- Bouvier, M. and D. C. Wiley "Antigenic peptides containing large PEG loops designed to extend out of the HLA-A2 binding site form stable complexes with class I major histocompatibility complex molecules." *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 1996. **14**: 4583-4588.
- Brière, F., J. M. Bridon, D. Chevet, *et al.* "Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA." *J. Clin. Invest.* 1994b. **94**: 97-104.
- Brière, F., C. Servet-Delprat, J. M. Bridon, *et al.* "Human Interleukin 10 induces naive surface Immunoglobulin D⁺ (sIgD⁺) B cells to secrete IgG1 and IgG3." *J. Exp. Med.* 1994a. **179**: 757-762.
- Bright, J. and S. Sriram "TGF- β inhibits IL-12-induced activation of Jak-Stat pathway in T lymphocytes." *J. Immunol.* 1998. **161**: 1772-1777.
- Brindley, P. J. and A. Sher "The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response." *J. Immunol.* 1987. **139**: 215-220.
- Brunet, L. R., D. W. Dunne and E. J. Pearce "Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* infection." *Parasitol. Today* 1998. **14**: 422-427.
- Bundy, D. A. P. "Gender-dependent patterns of infection and disease." *Parasitol. Today* 1988. **4**: 186-189.
- Bushara, H. O., M. E. N. Bashir, K. H. E. Malik, *et al.* "Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin." *Parasite Immunol.* 1993. **15**: 383-390.
- Butterworth, A. E., M. A. Vadas and D. L. Wasson "Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. induced directly by eosinophil major basic protein." *J. Immunol.* 1979. **122**: 211-229.
- Butterworth, A. E., D. W. Taylor, M. Veith, *et al.* "Studies on immune mechanisms of immunity in human schistosomiasis." *Immunol. Reviews* 1982. **61**: 5-39.
- Butterworth, A. E., R. Bensted-Smith, A. Capron, *et al.* "Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children." *Parasitology* 1987. **94**: 281-300.
- Butterworth, A. E., D. W. Dunne, A. J. C. Fulford, *et al.* "Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 antibodies block the expression of immunity." *Biochimie* 1988. **70**: 1053-1063.
- Butterworth, A. E., D. W. Dunne, A. J. C. Fulford, *et al.* "Human immunity to *Schistosoma mansoni*: observations on mechanisms, and implications for control." *Immunol. Invest.* 1992. **21**: 391-407.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, *et al.* "Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules." *Nature* 1975. **253**: 474-475.
- Capron, M., H. Bazin, M. Joseph, *et al.* "Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils." *J. Immunol.* 1981. **126**: 1764-1768.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, *et al.* "Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation." *Immunol. Reviews* 1982. **61**: 41-66.
- Capron, M., H. L. Spiegelberg, L. Prin, *et al.* "Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils." *J. Immunol.* 1984. **132**: 462-468.
- Capron, M., M. D. Kazatchkine, E. Fischer, *et al.* "Functionnal role of the α -chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes." *J. Immunol.* 1987. **139**: 2059-2066.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, *et al.* "Vaccine strategies against schistosomiasis." *Immunobiol.* 1992a. **184**: 282-294.
- Capron, A. "Immunity to schistosomes." *Curr. Opin. Immunol.* 1992c. **4**: 419-424.
- Capron, M. and A. Capron "Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis." *Science* 1994. **264**: 1876-1877.
- Capron, A., G. Riveau, J. M. Grzych, *et al.* "Development of vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1995a. **90**: 235-240.
- Capron, A. "Le langage moléculaire des parasites." *Médecine Sciences* 1995b. **11**: 431-439.
- Capron, A. "Schistosomiasis: forty years' war on the worm." *Parasitol. Today* 1998. **14**: 379-384.
- Carlier and Truyens *Parasitol. Today* 1995. **11**: 94-99.
- Cassagnou, M., Y. Dial, N. Milliard, *et al.* "Variceal bleeding in a recent focus of *Schistosoma mansoni* in Senegal: influence of ultrasonographic methods on the diagnosis and grading of periportal fibrosis." *soumis*.
- Chaine, J. P. and E. A. Malek "Urinary schistosomiasis in the sahelian region of the Senegal River Basin." *Trop. Geo. Med.* 1983. **35**: 249-256.

- Chan, M. S., B. F. Hall and D. A. P. Bundy "Modelling of potential schistosomiasis vaccination programmes." *Parasitol. Today* 1996. **12**: 457-460.
- Cheever, A. W. "A quantitative post-mortem study of schistosomiasis mansoni in man." *Americ. J. Trop. Med. Hyg.* 1968. **17**: 38-64.
- Chen, L., D. Rekosh and P. T. LoVerde "Schistosoma mansoni p48 eggshell protein gene: characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene." *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992. **52**: 39-52.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, *et al.* "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." *Science* 1994. **265**: 1237-1240.
- Chen, Y., J. Inobe, R. Marks, *et al.* "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance." *Nature* 1995. **376**: 177-180.
- Chiti, L., J. De Bont, J. Fransen, *et al.* "Natural infection with schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group in a dog in Zambia." *J. Comp. Path.* 1999. **122**: 229-233.
- Cioli, D., L. Pica-Mattoccia and S. Archer "Drug resistance in schistosomes." *Parasitol. Today* 1993. **9**: 162-166.
- Ciolo, D., L. Pica-Mattoccia and S. Asher "Drug resistance in schistosomes." *Parasitol. Today* 1993. **9**: 162-165.
- Cisse, F., S. Diallo and M. Diény "Bilan actuel de la bilharziose urinaire chez les populations riveraines du lac de Guiers." *Dakar Med.* 1983. **28**: 343-350.
- Clayton, J. D., R. M. Cripps, J. C. Sparrow, *et al.* "Interaction of troponin-H and glutathione S-transferase-2 in the indirect flight muscles of *Drosophila melanogaster*." *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 1998. **19**: 117-127.
- Clerici, E., E. Bergamasco, E. Ferrario, *et al.* "Influence of sex steroids on the antigen-specific primary antibody response *in vitro*." *J. Clin. Lab. Immunol.* 1991. **34**: 71-78.
- Cocks, B. G., R. de Waal Malefyt, J. P. Galizzi, *et al.* "IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand." *International Immunology* 1993. **1993**: 657-663.
- Collins, P. and C. Webb "Estrogen hits the surface." *Nature Medicine* 1999. **5**: 1130-1131.
- Combes, C. and P. Delattre "Principaux paramètres de l'infestation des rats (*R. rattus* et *R. norvegicus*) par *S. mansoni*." *Acta Oecologica* 1981. **2**: 63-79.
- Combes, C., B. Delay, P. Jarne, *et al.* (1992). . International cooperation in the field of genetic transformation of invertebrates and resistance to diseases, Washington.
- Comoy, E. E., A. Capron and G. Thyphronitis "In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens." *Intern. Immunol.* 1997. **9**: 523-531.
- Contigli, C., D. N. Silva-Teixeira, G. Del Prete, *et al.* "Phenotype and cytokine profile of *Schistosoma mansoni* specific T cells line and clones derived from schistosomiasis patients with distinct clinical forms." *Clinic. Immunol.* 1999. **91**: 338-344.
- Corachan, M., J. Almeda, E. Pous, *et al.* (1995). Genital schistosomiasis. Europ. Conf. Trop. Med. (Hamburg).
- Cordeiro da Silva, A., T. Lepresle, A. Capron, *et al.* "Molecular cloning of a 16-kilodalton Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*." *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992. **52**: 275-278.
- Corea, O. R., L. M. Dusse, L. R. Vian, *et al.* "Human antibody responses against schistosomal antigens. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris Lumbricoïdes* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosoma antigens." *AM. J. Trop. Med. Hyg.* 1988. **38**: 348-355.
- Cornford, E. M. and A. M. Fitzpatrick "The mechanism and rate of glucose transfer from male to female schistosomes." *Molec. Biochem. Parasitol.* 1985. **17**: 131-141.
- Couissinier-Paris, P. and A. J. Dessenin "Schistosoma-specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are TH0/2." *Eur. J. Immunol.* 1995. **25**: 2295-2302.
- Coulson, P. S. "The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine?" *Adv. Parasitol.* 1997. **39**: 271-336.
- Crabtree, J. E. and R. A. Wilson "The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*." *Parasite Immunol.* 1986. **8**: 265-285.
- Cutolo, M., A. Sulli, B. Serio, *et al.* "Estrogens, the immune response and autoimmunity." *Clin. Exp. Rheumatol.* 1995. **13**: 217-226.
- D**ay, T. A., J. L. Bennett and R. A. Pax "Praziquantel: the enigmatic antiparasitic." *Parasitol. Today* 1992. **8**: 342-344.

- Daynes, R. A., D. J. Dudley and B. A. Araneo "Regulation of murine lymphokine production *in vivo*. II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells." *Eur. J. Immunol.* 1990. **20**: 793-802.
- Daynes, R. A., B. A. Araneo, J. Hennebold, *et al.* "Steroids as regulators of the mammalian immune response." *J. Invest. Dermatol.* 1995. **105**: 14S-19S.
- De Bont, J., J. Vercruyssen, J. M. Grzych, *et al.* "Potential of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental and natural *S. mattheei* infection. I. Parasitological results." *Parasitology* 1997. **115**: 249-255.
- De Clercq, D., M. Sacko, J. Vercruyssen, *et al.* "Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine of mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* infections in Office du Niger, Mali." *Trop. Med. Intern. Health.* 1997. **2**: 680-685.
- De Clercq, D., J. Vercruyssen, M. Picquet, *et al.* "The epidemiology of a recent focus of mixed *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* infections around the "Lac de Guiers" in the Senegal River Basin, Senegal." *Trop. Med. Intern. Health.* 1999. **4**: 544-550.
- De Clercq, D., J. Vercruyssen, P. Verlé, *et al.* "Efficacy of artesunate against *Schistosoma mansoni* infections in Richard-Toll, Senegal." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000. **94**: 90-91.
- de Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, *et al.* "Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3." *J. Leukoc. Biol.* 1999. **66**: 201-204.
- de Martino, M., M. Rossi, C. Azzari, *et al.* "Low IgG3 and high IgG4 subclass levels in children with advanced human immunodeficiency virus-type 1 infection and elevated IgE levels." *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1999. **83**: 160-164.
- de Mendonça, R., H. Escriva, D. Bouton, *et al.* "Hormones and nuclear receptors in schistosome development." *Parasitol. Today* 2000. *In press*.
- de Saint-Vis, B., F. Fugier-Vivier, C. Massacrier, *et al.* "The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation." *J. Immunol.* 1998. **160**: 1666-1676.
- de Vries, J. E. and G. Zurawski "Immunoregulatory properties of IL-13: Its potential role in atopic disease." *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995. **106**: 175-179.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, *et al.* "Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." *J. Exp. Med.* 1991. **174**: 1209-1220.
- de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, *et al.* "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." *J. Exp. Med.* 1991. **174**: 915-926.
- de Waal Malefyt, R., C. G. Figdor, R. Huijbens, *et al.* "Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10." *J. Immunol.* 1993. **193**: 6370-6381.
- de Waal Malefyt, R., J. S. Abrams, S. M. Zurawski, *et al.* "Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8⁺ and CD4⁺ T_H0, T_H1 and T_H2 T cell clones and EBV-transformed B cells." *International Immunology* 1995. **7**: 1405-1416.
- Dean, D. A. "*Schistosoma mansoni*: absorption of human blood group A and B antigens by schistosomula." *J. Parasitol.* 1974. **60**: 260-263.
- Deelder, A. M. "Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989. **40**: 268-272.
- Defrance, T., B. Vanbervliet, F. Brière, *et al.* "Interleukin 10 and Transforming Growth Factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete Immunoglobulin A." *J. Exp. Med.* 1992. **175**: 671-682.
- Defrance, T., P. Carayon, G. Billian, *et al.* "Interleukin 13 is a B cell stimulating factor." *J. Exp. Med.* 1994. **179**: 135-143.
- Delegue, P., M. Picquet, D. J. Shaw, *et al.* "Morbidity induced by *Schistosoma haematobium* infections as assessed by ultrasound before and after treatment with praziquantel in recently expanded focus (Senegal River Basin)." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998. **92**: 775-783.
- Demeure, C. E., P. Rihet, L. Abel, *et al.* "Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy." *J. Infect. Dis.* 1993. **168**: 1000-1008.

- Dessein, A. J., D. Hillaire, N. E. Elwali, *et al.* "Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene." *Am. J. Hum. Genet.* 1999. **65**: 709-21.
- Doenhoff, M. J., J. Modha and J. R. Lambertucci "Anti-schistosome chemotherapy enhanced by antibodies specific for a parasite esterase." *Immunology* 1988. **65**: 507-510.
- Doenhoff, M. J., A. A. A. Sabah, C. Flechter, *et al.* "Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987. **81**: 947-951.
- Doenhoff, M. J. and L. H. Chappell "Preface: Positive interactions between anti-infection drugs and the immune response: an emerging paradigm." *Parasitol.* 1992. **105**: S1-S2.
- D'Orazio, T. J. and J. Y. Niederkorn "A novel role for TGF β and IL-10 in the induction of immune privilege." *J. Immunol.* 1998. **160**: 2089-2098.
- D'Orazio, T. J. and J. Y. Niederkorn "A novel role for TGF- β and IL-10 in the induction of immune privilege." *J. Immunol.* 1998. **160**: 2089-2098.
- Dunne, D. W., A. E. Butterworth, A. J. C. Fulford, *et al.* "Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection." *Eur. J. Immunol.* 1992. **22**: 1483-1494.
- Dunne, D. W., P. Hagan and F. G. C. Abath "Prospects for immunological control of schistosomiasis." *Lancet* 1995. **345**: 1488-1492.
- Dupré, L., O. Poulain-Godefroy, E. Ban, *et al.* "Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding 28kDa glutathione S-transferase." *Parasite Immunol.* 1997. **19**: 503-513.
- Dupré, L., M. Hervé, A. M. Schacht, *et al.* "Control of schistosomiasis pathology by combination of Sm28GST DNA immunization and praziquantel treatment." *J. Infect. Dis.* 1999. **180**: 454-463.
- Duvaux-Miret, O., G. B. Stefano, E. B. Smith, *et al.* "Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. **89**: 778-781.
- E**cheverria, O. M., A. G. Macial, A. M. Traish, *et al.* "Immuno-electron microscopic localization of estradiol receptor in cells of male and female reproductive and non-reproductive organs." *Biol. Cell* 1994. **81**: 257-265.
- Elghazali, G., H. Perlmann, A. S. Rutta, *et al.* "Elevated plasma levels of IgE in Plasmodium falciparum-primed individuals reflect and increased ratio of IL-4 to interferon-gamma-producing cells." *Clin. Exp. Immunol.* 1997. **109**: 84-89.
- Eloi-Santos, S., N. J. Olsen, R. Correa-Oliveira, *et al.* "Schistosoma mansoni: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice." *Exp. Parasitol.* 1992. **75**: 168-175.
- Eltoum, I. A., S. M. Suliaman, B. M. Ismail, *et al.* "Evaluation of eosinophiluria in the diagnosis of schistosomiasis haematobium: a field-based study." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992. **46**: 732-736.
- Ernould, J. C., K. Ba and B. Sellin "Increase of intestinal schistosomiasis after praziquantel treatment in a *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* mixed focus." *Acta Trop.* 1999. **73**: 143-152.
- Estaquier, J. and J. C. Ameisen "A role for T-helper type-1 and type-2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis." *Blood* 1997. **90**: 1618-1625.
- Estaquier, J., M. Marguerite, F. Sahuc, *et al.* "Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection." *Eur. Cytokine Netw.* 1997. **8**: 153-160.
- Evengard, B., I. Wolowczuk, M. Marguerite, *et al.* "IgG subclass-associated differences in anti-schistosomal antibody specificity." *Scand. J. Immunol.* 1994. **40**: 618-622.
- F**adok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, *et al.* "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF." *J. Clin. Invest.* 1998. **101**: 890-898.
- Falcao, P. L., L. C. Malaquias, O. A. Martins-Filho, *et al.* "Human schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation." *Parasite Immunol.* 1998. **20**: 447-454.
- Falcioni, F., K. Ito, D. Vidovic, *et al.* "Peptidomimetic compounds that inhibit antigen presentation by autoimmune disease-associated class II major histocompatibility molecules." *Nature Biotechnology* 1999. **17**: 562-567.
- Fallon, P. G., R. O. Cooper, A. J. Probert, *et al.* "Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis." *Parasitol.* 1992. **105**: S41-S48.

- Fallon, P. G. and M. J. Doenhoff "Drug-resistant schistosomiasis : resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994. **51**: 83-88.
- Fallon, P. G. and M. J. Doenhoff "Active immunization of mice with *Schistosoma mansoni* worm membrane antigens enhances efficacy of praziquantel." *Parasite Immunol.* 1995a. **17**: 261-268.
- Fallon, P. G., R. F. Sturrock, A. C. Niang, *et al.* "Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995b. **53**: 61-62.
- Fallon, P. G., R. E. Fookes and G. A. Wharton "Temporal differences in praziquantel- and oxamniquine-induced tegumental damage to adult *Schistosoma mansoni*: implications for drug-antibody synergy." *Parasitology* 1996a. **112**: 47-58.
- Fallon, P. G., L.-F. Tao, M. M. Ismail, *et al.* "Schistosome resistance to praziquantel: fact or artifact?" *Parasitol. Today* 1996b. **12**(8): 316-320.
- Farah, I., M. Nyindo, M. Suleman, *et al.* "*Schistosoma mansoni*: development and modulation of the granuloma after single or multiple exposures in the baboon (*Papio cynocephalus anubis*)." *Exp. Parasitol.* 1997. **86**: 93-101.
- Fargeas, C., Y. Chang, T. Nakajima, *et al.* "Differential effect of transforming growth factor β on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes." *Eur. J. Immunol.* 1992. **22**: 2173-2176.
- Felmeier, H., J. A. Nogueira-Queiroz and M. A. Peiwoto-Queiroz "Detection and quantification of circulating antigen in schistosomiasis by monoclonal antibody. II. The quantification of circulating antigens in human schistosomiasis *mansoni* and *haematobium*: relationships to intensity of infection and disease status." *Clin. Exp. Immunol.* 1986. **65**: 232-243.
- Feldmeier, H., I. Krantz and G. Poggense "Female genital schistosomiasis as a risk-factor for the transmission of HIV." *Int. J. STD. AIDS.* 1994. **5**: 368-372.
- Fisher, A. C. "A study of schistosomiasis in the Stantleyville district of Congo." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1934. **28**: 277-306.
- Fox, H. S., B. L. Bond and T. G. Parslow "Estrogen regulates the IFN- γ promoter." *J. Immunol.* 1991. **146**: 4362-4367.
- Fridkis-Hareli, M., D. Teitelbaum, E. Gurevich, *et al.* "Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells-specificity and promiscuity." *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 1994. **24**: 4872-4876.
- Fujieda, S., K. Zhang and A. Saxon "IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells γ subclass-specific isotype switch: switching to γ 1, γ 3, and γ 4, but not γ 2." *J. Immunol.* 1995. **155**: 2318-2328.
- Fujii, Y. *Chugai Iji Shimpo (Int. Med. J.)* 1847. **691**: 55.
- Fujinami, A. and H. Nakamura *Kyoto Igakkai Zasshi (J. Kyoto med. Ass.)* 1909. **6**: 224.
- Fukaura, H., S. C. Kent, M. J. Pietrusewicz, *et al.* "Induction of circulating Myelin Basic Protein and Proteolipid Protein-specific transforming growth factor- β 1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients." *J. Clin. Invest.* 1996. **98**: 70-77.
- Fulford, A. J. C., M. Webster, J. H. Ouma, *et al.* "Puberty and age-related changes in susceptibility to schistosome infection." *Parasitol. Today* 1998. **14**: 23-26.
- G**arraud, O. and T. B. Nutman "The role of cytokines in human B-cell differentiation into immunoglobulin-secreting cells." *Bull. Inst. Pasteur* 1996. **94**: 285-309.
- Garraud, O., A. Diouf, I. Holm, *et al.* "Secretion of parasite-specific immunoglobulin G by purified blood B lymphocytes from immune individuals after in vitro stimulation with recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1₁₉ antigen." *Immunology* 1999a. **97**: 204-210.
- Garraud, O., A. Diouf, I. Holm, *et al.* "Immune responses to *Plasmodium falciparum*-merozoite surface protein 1 (MSP1) antigen, II. Induction of parasite-specific immunoglobulin G in unsensitized human B cells after in vitro T-cell priming with MSP1₁₉." *Immunology.* 1999b. **97**: 497-505.
- Gascan, H., J. F. Gauchat, M. G. Roncarolo, *et al.* "Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones." *J. Exp. Med.* 1991. **173**: 747-750.
- Genestier, L., S. Kasibhata, T. Brunner, *et al.* "Transforming growth factor β 1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-myc." *J. Exp. Med.* 1999. **189**: 231-239.

- Gentilini, M. (1993). Bilharzioses. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 221-35.
- Gerosa, F., C. Paganin, D. Peritt, *et al.* "Interleukin-12 primes Human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon- γ and interleukin-10." *J. Exp. Med.* 1996. **183**: 2559-2569.
- Ghaffar, Y. A., S. A. Fattah, M. Kamel, *et al.* "The impact of endemic schistosomiasis on acute viral hepatitis." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991. **45**: 743-750.
- Ghaffar, Y. A., M. Kamel, M. El-Sonky, *et al.* "Response to hepatitis B vaccine in enfants born to mothers with schistosomiasis." *Lancet* 1989. **July 29**: 272.
- Giannini, A. L., E. C. Caride, V. M. Martin Braga, *et al.* "F-10 nuclear binding proteins of *Schistosoma mansoni*: structural and functional features." *Parasitology* 1995. **110**: 155-161.
- Gilmore, W., L. P. Weiner and J. Correale "Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from Multiple Sclerosis patients and normal control subjects." *J. Immunol.* 1997. **158**: 446-451.
- Gomez, E., V. Ortiz, B. Saint-Martin, *et al.* "Hormonal regulation of the secretory IgA (sIgA) system: estradiol- and progesterone-induced changes in sIgA in parotid saliva along the menstrual cycle." *Am. J. Reprod. Immunol.* 1993. **29**: 219-223.
- Goudot-Crozel, V., D. Caillol, M. Djabali, *et al.* "The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37 kDa glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." *J. Exp. Med.* 1989. **170**: 2065-2080.
- Grezel, D., M. Capron, J. M. Grzych, *et al.* "Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies." *Eur. J. Immunol.* 1993. **23**: 454-460.
- Grogan, J. L., P. G. Kremsner, A. M. Deelder, *et al.* "Elevated proliferation and interleukin-4 release from CD4+ cells after chemotherapy in human *Schistosoma haematobium* infection." *Eur. J. Immunol.* 1996a. **26**: 1365-1370.
- Grogan, J. L., P. G. Kremsner, G. J. van Dam, *et al.* "Anti-schistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults." *J. Infect. Dis.* 1996b. **173**: 1242-1247.
- Grogan, J. L., P. G. Kremsner, A. M. Deelder, *et al.* "Antigen-specific proliferation and interferon- γ and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection." *J. Infect. Dis.* 1998. **177**: 1433-1437.
- Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries, *et al.* "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells." *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 16-29.
- Groux, H., A. O'garra, M. Bigler, *et al.* "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* 1997. **389**: 737-742.
- Groux, H. and F. Powrie "Regulatory T cells and inflammatory bowel disease." *Immunol. Today.* 1999. **20**: 442-446.
- Gryseels, B. "Human resistance to *Schistosoma* infections: age or experience?" *Parasitol. Today* 1994. **10**: 380-384.
- Grzych, J. M., J. M. Capron, C. Dissous, *et al.* "Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis." *J. Immunol.* 1984. **133**: 998-1004.
- Grzych, J. M., C. Dissous, M. Capron, *et al.* "*Schistosoma mansoni* shares a protective epitope with keyhole limpet hemocyanin." *J. Exp. Med.* 1987. **165**: 865-878.
- Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever, *et al.* "Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni." *J. Immunol.* 1991. **146**: 1322-1327.
- Grzych, J. M., D. Grezel, C. B. Xu, *et al.* "IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni." *J. Immunol.* 1993. **150**: 527-635.
- Grzych, J. M., J. De Bont, J. L. Neyrinck, *et al.* "Relationship of impairment of Schistosome 28-Kilodalton Glutathione S-Transferase (GST) activity to expression of immunity to *Schistosoma mattheei* in calves vaccinated with recombinant *Schistosoma bovis* 28-Kilodalton GST." *Infect. Immun.* 1998. **66**: 1142-1148.
- Gundersen, S. G., E. F. Kjetland, G. Poggense, *et al.* "Urine strips for diagnosis of schistosomiasis haematobium in women of fertile age." *Acta Trop.* 1996. **62**: 281-287.
- Guonni, A. S., B. Lamkhioud and K. Ochiai "High affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites." *Nature* 1994. **67**: 183-186.
- Gupta, R. K. and G. R. Siber "Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects." *Vaccine* 1995. **13**: 1263-1276.
- H**abig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jacoby "Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation." *J. Biol. Chem.* 1974. **249**: 73.

- Hagan, P., U. J. Blumenthal, D. Dunn, *et al.* "Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*." *Nature* 1991. **349**: 243-245.
- Hagan, P., P. D. Ndhlovu and D. W. Dunne "Schistosome Immunology: more questions than answers." *Parasitol. Today* 1998. **14**: 407-412.
- Hamano, N., N. Terada, K. Maesako, *et al.* "Effect of female hormones on the production of IL-4 and IL-13 from peripheral blood mononuclear cells." *Acta Otolarygol.* 1998. **Suppl 537**: 27-31.
- Hambali, Z., W. Z. Ngah, S. A. Wahid, *et al.* "Effect of ovariectomy and sex hormone replacement on glutathione and glutathione-related enzyme in rat hepatocarcinogenesis." *Pathology* 1995. **27**: 30-35.
- Harn, D. A. "Identification by monoclonal antibody of a major (28kDa) surface membrane antigen of *Schistosoma mansoni*." *Mol. Biochem. Parasitol.* 1985. **16**: 345-354.
- Harn Jr, D. A. "Towards immunological interventions for schistosomiasis." *Curr. Opin. Infect. Dis.* 1997. **10**: 336-340.
- Hass, W., M. Granzer and G. G. Garcia "Host identification by *Schistosoma japonicum* cercariae." *J. Parasitol.* 1987. **73**: 568-577.
- Hatayama, I., K. Satoh and K. Sato *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. **140**: 581-588.
- Heinen, E. (1999). *Germinal centers*, Macmillan Reference Ltd.
- Henkle, K. J., K. M. Davern, M. D. Wright, *et al.* "Comparison of the cloned genes of the 26 and 28 kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*." *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990. **40**: 23-34.
- Hernandez, M. G. H., J. C. Hafalla, L. P. Acosta, *et al.* "Paramyosin is a major target of the human IgA response against *Schistosoma japonicum*." *Parasite Immunol.* 1999. **21**: 641-647.
- Hirai, H., M. Tanaka and P. LoVerde "*Schistosoma mansoni*: chromosomal localization of female-specific genes and a female-specific DNA element." *Exp. Parasitol.* 1993. **76**: 175-181.
- Hirsch, C., C. A. Almeida, B. L. Doughty, *et al.* "Characterization of *Schistosoma mansoni* 44.7/56.8 kDa egg antigens recognized by human monoclonal antibodies which induce protection against experimental infection and proliferation of peripheral blood mononuclear cells from schistosomiasis patients." *Vaccine* 1997. **15**: 948-954.
- Hirsh, C., C. S. Zouain, J. B. Alves, *et al.* "Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm." *Parasitology* 1997. **115**: 21-28.
- Ho, M., M. M. Sexton, P. Tongtawe, *et al.* "Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria." *J. Infect. Dis.* 1995. **172**: 838-845.
- Holmgren, J., C. Czerkinsky, N. Lycke, *et al.* "Strategies for induction of immune responses at mucosal surface making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier and adjuvant." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994. **50**: 42-54.
- Homma, H. and I. Listowsky "Identification of Yb-glutathione-S-transferase as a major rat liver protein labeled with dexamethasone 21-methasulfonate." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1985. **82**: 7165-7169.
- Huber, S. A., J. Kupperman and N. M. K. "Estradiol prevents and testosterone promotes Fas-dependent apoptosis in CD4+ Th2 cells by altering Bcl2 expression." *Lupus* 1999a. **8**: 384-387.
- Huber, S. A., J. Kupperman and K. Newell "Hormonal regulation of CD4+ T-cell responses in coxsackievirus B3-Induced myocarditis in mice." *J. Virol.* 1999b. **15**: 4689-4695.
- Hudson, C. E., J. E. DeHaven, B. A. Schulte, *et al.* "Exogenous 17 β -estradiol blocks alpha and mu but not pi class glutathione S-transferase immunoreactivity in epithelium of syrian hamster vas deferens." *J. Histochem. Cytochem.* 1999. **47**: 91-98.
- Inobe, J., A. J. Slavin, Y. Komagata, *et al.* "IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor - β secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis." *Eur. J. Immunol* 1998. **28**: 2780-2790.
- Ismail, M. M., S. A. Taha, A. M. Farghaly, *et al.* "Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis." *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 1994. **24**: 685-695.
- Ismail, M., A. Metwally, A. Farghaly, *et al.* "Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996. **55**: 214-218.

Isseroff, H., P. W. Sylvestre, C. L. Bessette, *et al.* "Schistosomiasis : role of endogenous opioids in supression of gonadal steroid secretion." *Comp. Biochem. Phys.* 1989. **94**: 41-45.

Ivanoff, N., N. Phillips, A. M. Schacht, *et al.* "Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm28kDa glutathione S-transferase." *Vaccine* 1996. **14**: 1123-1131.

Jacobs, W., A. Deelder, J. Bogers, *et al.* "Schistosomal granuloma modulation. III. *Schistosoma haematobium* worms accelerate *S. mansoni* soluble egg antigen-induced hepatic granuloma formation in vivo." *Parasitol. Res.* 1999. **85**: 905-909.

James, S. J. and A. Sher (1990). Cell-mediated immune response to schistosomiasis. Current topics in microbiology and immunology. Springer-Verlag, Berlin. **15**: 21-31.

James, S. L. "Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non living vaccine. III. correlation of resistance with induction of activated larvacidal macrophages." *J. Immunol.* 1986. **136**: 3872-3877.

James, S. L. and J. Glaven "Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginin-dependent production of reactive nitrogen intermediates." *J. Immunol.* 1989. **143**: 4208-42103.

Joseph, M., A. B. Tonnel, A. Capron, *et al.* "Enzyme release and superoxyde anion production by human alveolar macrophages stimulated with Immunoglobulin E." *Clin. Exp. Parasitol.* 1980. **40**: 416-422.

Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, *et al.* "A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes." *Nature* 1983. **308**: 810-812.

Kamis, A. B., R. A. Ahmad and M. Z. Badrul-Munir "Effects of estradiol on worm burden and peripheral leukocytes in *Parastrongylus malaysiensis*-infected rats." *Parasitol. Res.* 1994. **80**: 74-77.

Kammer, G. M. and G. C. Tsokos "Emerging concepts of the molecular basis for estrogen effects on T lymphocytes in systemic lupus erythematosus." *Clinical Immunology and Immunopathology* 1998. **89**: 192-195.

Kanda, N., T. Tsuchida and K. Tamaki "Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells." *Clin. Exp. Immunol.* 1996. **106**: 410-415.

Kanda, N. and K. Tamaki "Estrogen immunoglobulin production by human PBMCs." *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999. **103**: 282-288.

Kardoff, R., F. F. Stelma, A. K. Vocke, *et al.* "Ultrasonography in a senegalese community recently exposed to *Schistosoma mansoni* infection." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996. **54**: 586-590.

Katsurada, F. *Annot. Zool. Japan* 1904. **5**: 146.

Katz, N., A. Chaves and J. Pellegrino "A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni." *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1972. **14**: 397-400.

Kawano, Y., T. Noma and J. Yata "Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2." *J. Immunol.* 1994. **153**: 4948-4958.

Keira, M., J. Nishihira, T. Ishibashi, *et al.* "Identification of a molecular species in porcine ovarian lutel glutathione S-transferase and its hormonal regulation by pituitary gonadotrophins." *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. **308**: 126-132.

Khalife, J., M. Capron, A. Capron, *et al.* "Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies." *J. Exp. Med.* 1986. **164**(5): 1626-1640.

Khalife, J., D. W. Dunne, B. A. Richardson, *et al.* "Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*." *J. Immunol.* 1989. **142**: 4422-4427.

Khan, C. M. A., B. Villarreal-Ramos, R. J. Pierce, *et al.* "The construction, expression and immunogenicity of multiple tandem copies of the *S. mansoni* peptide comprising 115-131 of the P28 glutathione S-transferase, expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in live attenuated vaccine strain of *Salmonella*." *J. Immunol.* 1994a. **153**: 5634-5642.

Khan, C. M. A., B. Villarreal-Ramos, R. J. Pierce, *et al.* "Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione-S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994b. **91**: 11261-11265.

Kiang, D., N. E. El Ghazalie, A. M. Medhat, *et al.* "Identification and characterization of *Schistosoma mansoni* p17.7, a cyclophilin." *Mol. Bioch. Parasitol.* 1996. **76**: 73-82.

- King, C. H., S. E. Ibiary, M. E. Nawawi, *et al.* "Intensity of *Schistosoma mansoni* infection in a human population is inversely correlated with antibody response to SmW68, a protective parasite antigen." *J. Infect. Dis.* 1989. **160**: 686-691.
- King, C., A. Medhat, I. Malhotra, *et al.* "Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity." *J. Immunol.* 1996. **156**: 4715-4721.
- King, C. L. "B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans." *J. Immunol.* 1998. **160**: 3578-3584.
- Kitani, A. and W. Strober "Regulation of C γ subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells." *J. Immunol.* 1993. **151**: 3478-3488.
- Klein, S. A., K. S., J. M. Dobmeyer, *et al.* "Substitution of testosterone in a HIV-1 positive patient with hypogonadism and Wasting-syndrome led to a reduce rate of apoptosis." *Eur. J. Med. Res.* 1997. **2**: 30-2.
- Klotz, F., J. M. Debonne and G. Martet "La Bilharziose hépatique." *Ann. Med. Interne* 1991. **142**: 131-139.
- Knopf, P. M. "The role of host hormones in controlling survival and development of *Schistosoma mansoni*." *Pharmac. Ther.* 1982. **15**: 293-311.
- Kondo, H., M. Miura and Y. Itokawa "Antioxidant enzyme systems in skeletal muscle atrophied by immobilization." *Pflugers Arch.* 1993. **422**: 404-406.
- Kongs, A., P. Verlé, A. Dieng, *et al.* "Clinical investigation of a population recently infected with *Schistosoma mansoni* (Richard-Toll, Senegal)." *Trop. Med. Intern. Health* 1996. **1**: 191-198.
- Koshy, A., B. Al Nakib, S. Al Mufti, *et al.* "Anti-HCV-positive cirrhosis associated with schistosomiasis." *Am. J. Gastroenterol.* 1993. **88**: 1428-1431.
- Kotowick, K. and R. E. Callard "Human immunoglobulin class and IgG subclass regulation: dual action of interleukin-4." *Eur. J. Immunol.* 1993. **23**: 2250-2256.
- Koyama, Y. I., S. Nagao, K. Ohashi, *et al.* "Effect of systemic and topical application of testosterone propionate on the density of epidermal langerhans cells in the mouse." *J. Invest. Dermatol.* 1989. **92**: 86-90.
- Kremer, L., G. Riveau, A. Baulard, *et al.* "Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant bacillus Calmette-Guérin producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase." *J. Immunol.* 1996. **156**: 4309-4317.
- Kremer, L., L. Dupré, G. Riveau, *et al.* "Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin expressing Glutathione S-Transferase from *Schistosoma haematobium*." *Infect. Immun* 1998. **66**: 5669-5676.
- Kresina, T. F., Q. He, S. Degli Espoti, *et al.* "Hepatic fibrosis and gene expression changes induced by praziquantel treatment during immune modulation of *Schistosoma japonicum* infection." *Parasitology* 1993. **107**: 397-404.
- Kullberg, M. C., E. J. Pearce, S. E. Hieny, *et al.* "Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1:Th2 Cytokine responses to a non-parasitic antigen." *J. Immunol.* 1992. **148**: 3264-3270.
- Lai, Y. H. and T. R. Mosmann "Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production." *J. Immunol.* 1999. **199**: 78-87.
- Lamberts, S. W. J., A. W. van den Beld and A. J. van der Lely "The endocrinology of aging." *Science* 1997. **278**: 419-424.
- Lane, A., D. Boulanger, G. Riveau, *et al.* "Murine immune responses to *Schistosoma haematobium* and the vaccine candidate rSh28GST." *Parasite Immunol.* 1998. **20**: 359-367.
- Langley, J. G., H. C. Kariuki, A. P. Hammersley, *et al.* "Human IgG subclass responses and subclass restriction to *Schistosoma mansoni* eggs antigens." *Immunol.* 1994. **83**: 651-658.
- Lansoud-Soukate, J., J. Leonardelli, G. Torpier, *et al.* "Role de la bilharziose à *Schistosoma mansoni* dans l'hypogonadisme du mâle." *Path. Biol.* 1991. **39**: 681-685.
- Larsen, J., S. Hartzen and M. Parm "The determination of specific IgA-antibodies to *Yersinia enterocolitica* and their role in enteric infections and their complications." *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 1985. **93**: 331-339.
- Lawrence, P. O. "Hormonal effects on insects and other endoparasites in vitro." *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1991. **27A**: 487-496.
- Lee, K. W., A. Thakur, A. M. Karim, *et al.* "Immune response to *Schistosoma mansoni* phosphoglycerate kinase during natural and experimental infection: identification of a schistosoma-specific B-cell epitope." *Infect. Immun.* 1995. **63**: 4307-4311.
- Leiper, R. T. and E. L. Atkinson *Brit. Med. J.* 1915. **i**: 201.

- Letterio, J. J. and A. B. Roberts "Regulation of immune responses by TGF-beta." *Annu. Rev. Immunol.* 1998. **16**: 137-161.
- Leutscher, P., C. E. Ramarokoto, C. Reimert, *et al.* "Community-based study of genital schistosomiasis in men from Madagascar." *Lancet* 2000. **355**: 117-118.
- Listowsky, I., M. Abramovitz, H. Homma, *et al.* "Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases." *Drug Metabolism Reviews* 1988. **19**: 305-318.
- Liu, S. X., G. C. Song, Y. X. Xu, *et al.* "Anti-fecundity immunity induced in pigs vaccinated with recombinant *Schistosoma japonicum* 26 kDa glutathione-S-transferase." *Parasite Immunol.* 1995. **17**: 335-340.
- Liu, S. X., G. C. Song, Y. X. Xu, *et al.* "Immunization of mice with recombinant Sj26GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with chinese *Schistosoma japonicum*." *Vaccine* 1995. **13**: 603-607.
- Liu, J. L., J. Fontaine, A. Capron, *et al.* "Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms." *Parasitol.* 1996. **113**: 377-391.
- Loison, G., A. Vidal, A. Findeli, *et al.* "High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 1989. **5**(6): 497-507.
- Lucas, S. B. "Squamous cell carcinoma of the bladder and schistosomiasis." *East Afric. Med. J.* 1982. **59**: 345-351.
- Lukacs, N. W. and D. L. Boros "Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni." *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993. **68**: 57-63.
- M**achado, A. J., G. Gazzinelli, J. Pellegrino, *et al.* "*Schistosoma mansoni*: the role of the complement C3 activating system in the cercaricidal action of normal serum." *Exp. Parasitol.* 1975. **38**: 20-29.
- Mafe, M. A., T. von Stamm, J. Utzinger, *et al.* "Control of urinary schistosomiasis: an investigation into the effective use of questionnaires to identify high-risk communities and individuals in Niger State, Nigeria." *Trop. Med. Intern. Health* 2000. **5**: 53-63.
- Maggi, E., G. F. Del Prete, P. Parronchi, *et al.* "Role for T cells, IL-2 and IL-6 in the IL-4-dependent *in vitro* human IgE synthesis." *Immunology* 1989. **68**: 300-306.
- Malaquias, L. C., P. L. Falcao, A. M. Silveira, *et al.* "Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 peripheral blood mononuclear cell responses." *Scand. J. Immunol.* 1997. **46**: 393-398.
- Manson, P. "Report of a case of bilharzia from the West Indies." *Brit. Med. J.* 1902. **2**: 1894.
- Marguerite, M., M. C. Gallissot, M. Diagne, *et al.* "Cellular immune responses of a senegalese community recently exposed to *Schistosoma mansoni*: correlations of infection level with age and inflammatory cytokine production by soluble egg antigen-specific cells." *Trop. Med. Intern. Health* 1996. **4**: 530-543.
- Marikovsky, M., D. Arnon and Z. Fishelson "Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement." *J. Immunol.* 1988. **141**: 273-278.
- Marquet, S., L. Abel, D. Hillaire, *et al.* "Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33." *Nature Genet.* 1996. **14**: 181-184.
- Marsh, D. G., J. D. Neely, D. R. Breazeale, *et al.* "Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations." *Science* 1994. **264**: 1152-1156.
- Marth, T., W. Strober and B. L. Kelsall "High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice. Systemic neutralization of IL-12 augments TGF-beta secretion and T-cell apoptosis." *J. Immunol.* 1996. **157**: 2348-2357.
- Mathew, R. C. and D. L. Boros "Anti L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin 2 production in *Schistosoma mansoni* infection." *Infect. Immun.* 1986. **54**: 820-826.
- Mc Kean, J. R. and A. R. E. Anwar "*Schistosoma mansoni*: complement and antibody damage mediated by eosinophils and neutrophils, in killing schistosomula *in vitro*." *Exp. Parasitol.* 1981. **51**: 307-317.
- Mc Laren, D. J., J. R. Mc Kean, I. Olsson, *et al.* "Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*." *Parasite Immunol.* 1981. **3**: 359-373.
- Mc Tigue, M. A., D. R. Williams and J. A. Tainer "Crystal structure of a schistosomal drug and vaccine target: GST from *S. japonica* and its complex with the leading anti-schistosomal drug praziquantel." *J. Mol. Biol.* 1995. **246**: 21-27.

- Mei, H., H. Hirai, M. Tanaka, *et al.* "Schistosoma mansoni: cloning and characterization of a gene encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase." *Exp. Parasitol.* 1995. **80**: 250-259.
- Metwali, A., D. Elliott, A. M. Blum, *et al.* "Granuloma eosinophils enhance IL-5 production by lymphocytes from mice infected with *Schistosoma mansoni*." *J. Immunol.* 1993. **151**: 7048-7056.
- Mielcarek, N., J. Cornette, A.-M. Schacht, *et al.* "Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen." *Infect. Imm.* 1997. **65**: 544-550.
- Mielcarek, N., G. Riveau, F. Remoué, *et al.* "Homologous and heterologous protection after single intranasal administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*." *Nature Biotech.* 1998. **16**: 454-457.
- Miller, L. and J. S. Hunt "Regulation of TNF- α production in activated mouse macrophages by progesterone." *J. Immunol.* 1998. **160**: 5098-5104.
- Miller, R. A. "The aging immune system: Primer and prospectus." *Science* 1996. **273**: 70-74.
- Miller, T. E., L. A. Beausang, M. Meneghini, *et al.* (1994). Cell death and nuclear matrix proteins. Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease. C. S. H. L. Press: 357-376.
- Mohamed-Ali, Q., N. A. Elwali, A. A. Abdelhameed, *et al.* "Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infections: evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherited factors are critical in disease progression." *J. Infect. Dis.* 1999. **180**: 1298-12306.
- Monseur, J., C. Ripert and C. Raccurt "Retentissement de la bilharziose sur la santé au Shaba (Zaïre) d'après les lésions urologiques." *Bull. Soc. Path. Exot.* 1972. **65**: 822-840.
- Montenegro, S. M., P. Miranda, S. Mahanty, *et al.* "Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens." *J. Infect. Dis.* 1999. **179**: 1502-1514.
- Moore, D. L., D. I. Grove and K. S. Warren "The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantification of cell population." *J. Pathol.* 1977. **121**: 41-50.
- Moore, D. V., T. K. Yolles and H. E. Melleney "The relationship of male worms to the sexual development of female *Schistosoma mansoni*." *J. Parasitol.* 1954. **40**: 166.
- Moore, K. W., P. Vieira, D. F. Fiorentino, *et al.* "Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1." *Science* 1990. **248**: 1230-1233.
- Morrison, D. D., E. A. Vande Waa and J. L. Bennett "Effects of steroids and steroid synthesis inhibitors on fecundity of *Schistosoma mansoni* in vitro." *J. Chemic. Ecol.* 1986. **12**: 1901-1908.
- Moser, D., M. Tendler, G. Griffiths, *et al.* "A 14-kDa *S. mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins." *J. Biol. Chem.* 1991. **266**: 8447-8454.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, *et al.* "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J. Immunol.* 1986. **136**: 2348-2357.
- Mosmann, T. R. and L. R. Coffman "Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells." *Adv. Immunol.* 1989. **46**: 111.
- Mosmann, T. R. and S. Sad "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." *Immunol. Today* 1996. **17**: 138-146.
- Mountford, A. P., P. S. Coulson, R. M. Pemberton, *et al.* "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* 1992. **75**: 250-256.
- Mutapi, F., P. D. Ndhlovu, P. Hagan, *et al.* "A comparison of humoral responses to *Schistosoma haematobium* in areas with low and high levels of infection." *Parasite Immunol.* 1997. **19**: 255-263.
- Mutapi, F., P. D. Ndhlovu, P. Hagan, *et al.* "Changes in specific anti-egg antibody levels following treatment with praziquantel for *Schistosoma haematobium* infection in children." *Parasite Immunol.* 1998a. **20**: 595-600.
- Mutapi, F., P. D. Ndhlovu, P. Hagan, *et al.* "Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to *Schistosoma haematobium* infection." *J. Inf. Dis.* 1998b. **178**: 289-293.
- Mwatha, J. K., G. Kimani, T. Kamau, *et al.* "High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN γ , but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni." *J. Immunol.* 1998. **160**: 1992-1999.
- N**agata, S. "Apoptosis by death factor." *Cell* 1997. **88**: 355-365.

- Nakazawa, M., M. R. Fantappie, G. L. Freeman, *et al.* "Schistosoma mansoni: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection." *Exp. Parasitol.* 1997. **85**: 233-240.
- Naus, C. W., G. Kimani, J. H. Ouma, *et al.* "Development of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* in an immunologically naive immigrant population: influence of infection duration, infection intensity, and host age." *Infect. Immun.* 1999. **67**: 3444-3451.
- Ndhlovu, P., H. Cadman, B. J. Vennervald, *et al.* "Age-related antibody profiles in *Schistosoma haematobium* infections in a rural community in Zimbabwe." *Parasite Immunol.* 1996. **18**: 181-191.
- Nguer, C. M., T. O. Diallo, A. Diouf, *et al.* "Plasmodium falciparum- and Merozoite Surface Protein 1-specific antibody isotype balance in immune senegalese adults." *Infect. Immun.* 1997. **65**: 4873-4876.
- O'Leary, K. A. and J. W. Tracy "Schistosoma mansoni : glutathione S-transferase-catalized detoxification of dichlorvos." *Exp. Parasitol.* 1991. **72**: 355-361.
- Omer, F. M., J. A. L. Kurtzhals and E. M. Riley "Maintaining the Immunological balance in parasitic infections: a role for TGF- β ?" *Parasitol. Today* 2000. **16**: 18-23.
- Ottesen, E. A., A. M. Stanley, J. A. Gelfand, *et al.* "Immunoglobulin and complement receptors on human eosinophils and their role in cellular adherence to schistosomula." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977. **26**: 197-210.
- Pancré, V., I. Wolowczuk, S. Guerret, *et al.* "Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: role of gamma interferon." *Infect. Immun.* 1994a. **62**(9): 3723-3730.
- Pancré, V., I. Wolowczuk, M. Bossus, *et al.* "Evaluation of the effect of Sm28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis: interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide." *Molec. Immunol.* 1994b. **31**(16): 1247-1256.
- Pancré, V., H. Gras-Masse, A. Delanoye, *et al.* "Induction of cytotoxic T-cell activity by the protective antigen of *Schistosoma mansoni* Sm28GST or its derived C-terminal lipopeptide." *Scand. J. Immunol.* 1996. **44**: 485-492.
- Pearce, E. J., S. L. James, J. Dalton, *et al.* "Immunological characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non-living vaccine." *J. Immunol.* 1986. **137**: 3593-3600.
- Pearce, E. J., S. L. James, S. Hieny, *et al.* "Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a non surface parasite antigen." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988. **85**: 5678-5682.
- Pearce, E. J., P. Caspar, J. M. Grzych, *et al.* "Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*." *J. Exp. Med.* 1991. **173**: 159-166.
- Pearce, E. J. "Proselytizing with immunity." *Nature* 1993. **363**: 19-20.
- Pearce, E. J., A. W. Cheever, S. Leonard, *et al.* "Schistosoma mansoni in IL-4 deficient mice." *Intern. Immunol.* 1996. **8**: 435-444.
- Pène, J., F. Rousset, F. Brière, *et al.* "Interleukin-5 enhances interleukin-4-induced IgE production by normal human B cells." *Eur. J. Immunol.* 1988. **18**: 929-935.
- Perlmann, H., H. Helmbj, M. Hagstedt, *et al.* "IgE elevation and IgE antimalarial antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria." *Clin. Exp. Immunol.* 1994. **97**: 284-292.
- Peterson, J. D., L. A. Herzenberg, K. Vasquez, *et al.* "Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998. **95**: 3071-3076.
- Peyron, F., N. Burdin, P. Ringwald, *et al.* "High levels of circulating IL-10 in human malaria." *Clin. Exp. Immunol.* 1994. **95**: 300-303.
- Piccini, M. P., M. G. Giudizi, R. Biagiotti, *et al.* "Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones." *J. Immunol.* 1995. **155**: 128-133.
- Picquet, M., J. C. Ernould, J. Vercruyse, *et al.* "The epidemiology of human schistosomiasis in the Senegal river basin." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996. **90**: 340-346.
- Piemonti, L., P. Monti, P. Allaveno, *et al.* "Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells." *Int. Immunol.* 1999. **11**: 1519-1526.

- Pierce, R. J., J. Khalife, D. L. Williams, *et al.* "Schistosoma mansoni: characterization of sequence variants of the 28-kDa glutathione S-transferase." *Exp. Parasitol.* 1994. **79**: 81-84.
- Pistoia, V. "Production of cytokines by human B cells in health and disease." *Immunol. Today* 1997. **18**: 343-350.
- Pitchford, R. J. "A check list of definitive host exhibiting evidence of the genus *Schistosoma* acquired naturally in Africa and the Middle east." *J. Helminthology* 1977. **51**: 229-252.
- Poggensee, G., I. Kiwelu, V. Weger, *et al.* "Female genital schistosomiasis of the lower genital tract; prevalence and disease-associated morbidity in northern Tanzania." *J. Infect. Dis.* 2000. **181**.
- Pohl-Koppe, A., K. E. Balashov, A. C. Steere, *et al.* "Identification of a T cell subset capable of both IFN- γ and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi*." *J. Immunol.* 1998. **160**: 1804-1810.
- Pollner, J. H., A. Schwartz, A. Kobrine, *et al.* "Cerebral schistosomiasis caused by *Schistosoma haematobium*: case report." *Clin. Infect. Dis.* 1994. **18**: 354-357.
- Porchet, E., A. McNair, A. Caron, *et al.* "Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase." *Parasitol.* 1994. **109**: 565-572.
- Poulain-Godefroy, O., S. Gaubert, S. Lafitte, *et al.* "Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: stimulatory role of egg antigens." *Infect. Imm.* 1996. **64**: 763-768.
- Poulain-Godefroy, O., N. Mielcarek, N. Ivanoff, *et al.* "Enhancement of immunogenicity by intranasal antigen delivery using liposomes bearing the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin." *Infect. Imm.* 1998. **66**: 1764-1767.
- Powrie, F., J. Carlino, M. W. Leach, *et al.* "A critical role for transforming growth factor- β but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^{low} CD4⁺ T cells." *J. Exp. Med.* 1996. **183**: 2669-2674.
- Precious, W. Y. and J. Barrett "The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths." *Biochem. Biophys. Acta* 1989. **992**: 215-222.
- Pritchard, D. I., C. Hewitt and R. Moqbel "The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths." *Parasitology* 1997. **115**: S33-S44.
- Punnonen, J., G. G. Aversa, B. G. Cocks, *et al.* "Interleukin-13 induces interleukin-4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. **90**: 3730-3734.
- R**amalho-Pinto, F. J., R. de Rossi and S. R. Smithers "Murine Schistosomiasis mansoni: anti-schistosomula antibodies and the IgG subclasses involved in the complement- and eosinophil-mediated killing of schistosomula *in vitro*." *Parasite Immunol.* 1979. **1**(4): 295-308.
- Ramsdell, F., M. S. Seaman, R. E. Miller, *et al.* "Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death." *Intern. Immunol.* 1994. **6**: 1545-1553.
- Ratard, R. C. and G. J. Greer "A new focus of *S. haematobium/S. intercalatum* hybrid in Cameroon." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991. **45**: 332-338.
- Redman, C. A., A. Robertson, P. G. Fallon, *et al.* "Praziquantel: an urgent and exciting challenge." *Parasitol. Today* 1996. **12**: 14-20.
- Reimert, C. M., J. H. Ouma, M. T. Mwanje, *et al.* "Indirect assessment of eosinophiuria in urinary schistosomiasis using eosinophil cationic protein (ECP) and eosinophil protein X (EPX)." *Acta Trop.* 1993. **54**: 1-12.
- Reimert, C. M., H. M. Mshinda, C. F. Hatz, *et al.* "Quantitative assessment of eosiniphiluria in *Schistosoma haematobium* infections: a new marker of infection and bladder morbidity." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000. **62**.
- Remoué, F., O. Poulain-Godefroy, N. Mielcarek, *et al.* "Local transient induction of inflammatory cytokines after intranasal administration of recombinant *Bordetella pertussis*." *Microb. Pathog.* 1997. **22**: 305-313.
- Remoué, F., F. Rogerie, M. C. Gallissot, *et al.* "Gender-dependent neutralizing humoral response to *Schistosoma mansoni* 28GST antigen in infected human population." *J. Infect. Dis.* 2000. *in press*.
- Renauld-Mongenie, G., N. Mielcarek, J. Cornette, *et al.* "Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996. **93**(15): 7944-7949.
- Reynolds, S. R., C. E. Dahl and D. A. Harn "T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *S. mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase." *J. Immunol.* 1994. **152**: 193-200.

- Ribeiro-Paes, J. T. and V. Rodriguez "Sex determination and female reproductive development in the genus *Schistosoma* : a review." *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 1997. **39**: 337-344.
- Richard-Lenoble, D., M. Kombila, T. H. Duong, *et al.* "Bilharziose à *Schistosoma intercalatum*, bilharziose récente et oubliée." *Rev. Prat.* 1993. **43**(4): 432-439.
- Richards, A. L. "Tumour Necrosis Factor and associated cytokines in the host's response to malaria." *Intern. J. Parasitol.* 1997. **27**: 1251-1263.
- Rihet, P., C. E. Demeure, A. Bourgois, *et al.* "Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels." *Eur. J. Immunol.* 1991. **21**(11): 2679-2686.
- Rihet, P., C. E. Demeure, A. J. Dessen, *et al.* "Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area." *Eur. J. Immunol.* 1992. **22**: 2063-2070.
- Rioux, J. A., H. Decamps, C. Lanotte, *et al.* "Ecologie de la schistosomose en Guadeloupe." *Rev. Epidém. Santé Publ.* 1977. **25**: 483-519.
- Ripert, C. (1998). Epidémiologie des maladies parasitaires : Helminthoses. Cahan, Editions Médicales Internationales.
- Rissoan, M., V. Soumelis, N. Kadowaki, *et al.* "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." *Science* 1999. **283**: 1183-6.
- Riveau, G. J. and A. Capron (1996). Vaccination against schistosomiasis: concepts and strategies. Concepts in Vaccine Design. S. H. E. Kaufmann. Berlin, New York, Walter de Gruyter and Co.: 509-532.
- Robert, M., M. G. Lewert, Y. Blas, *et al.* "Seroepidemiology of schistosomiasis Japonica by ELISA in the Philippines." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1984. **33**: 872-881.
- Roberts, C. W., A. Satoskar and J. Alexander "Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection." *Parasite Today*. 1996. **12**(10): 382-388.
- Roberts, M., A. E. Butterworth, G. Kimani, *et al.* "Immunity after treatment of human schistosomiasis : association between cellular responses and resistance to reinfection." *Inf. Imm.* 1993. **61**: 4984-4993.
- Roche, C., D. L. Williams, J. Khalife, *et al.* "Cloning and characterization of the gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase." *Gene* 1994. **138**: 149-152.
- Roche, C., J. L. Liu, T. LePresle, *et al.* "Tissue localization and stage-specific expression on the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*." *Mol. Bioch. Parasitol.* 1996. **75**: 187-195.
- Rogerie, F., F. J. Remoué, P. Desreumaux, *et al.* "Med. Trop." *Etiologie infectieuse de la morbidité diarrhéique dans un foyer sénégalais fortement exposé à Schistosoma mansoni* 1997. **57**: 361-363.
- Romagnani, S. "Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the "natural" immune response?" *Immunol. Today* 1992. **13**: 379-381.
- Romagnani, S. "Lymphokine production by human T cells in disease states." *Annu. Rev. Immunol.* 1994. **12**: 227-257.
- Rook, G. A. W., R. Hernandez-Pando and S. L. Lightman "Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance." *Immunol. Today* 1994. **15**: 301-303.
- Rumbley, C. A., H. Sugaya, S. A. Zekavat, *et al.* "Activated eosinophils are the major source of Th2 associated cytokines in the schistosome granuloma." *J. Immunol.* 1999. **162**: 1003-1009.
- Sabah, A. A., C. Flechter, G. Webbe, *et al.* "*Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice." *Exp. Parasitol.* 1985. **60**: 348-354.
- Sabin, E. A., M. I. Araujo, E. M. Carvalho, *et al.* "Impairment of Tetanus Toxoid-specific Th1-like immune response in humans infected with *Schistosoma mansoni*." *J. Infect. Dis.* 1996. **173**: 269-272.
- Salafsky, B., Y. S. Wang, A. C. Fusco, *et al.* "The role of essential fatty acids and prostaglandins in cercarial penetration (*Schistosoma mansoni*)." *J. Parasitol.* 1984. **70**: 656-670.
- Salinas, G., K. Sinha, J. P. Cooper, *et al.* "Human isotype antibody responses to an *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase." *Parasite Immunol.* 1996. **18**: 377-386.
- Sambon, L. W. "Remarks on *Schistosomum mansoni*." *J. Trop. Med. Hyg.* 1907. **10**: 303.
- Santoro, F., B. Vandemeulebroucke and M. C. Liebart "*Schistosoma mansoni*: role in vivo of complement in primary infection in mice." *Exp. Parasitol.* 1982. **54**: 40-46.
- Satti, M. Z., P. Lind, B. J. Vennervald, *et al.* "Specific immunoglobulin measurements related to exposure and resistance to schistosoma mansoni infection in Sudanese canal cleaners." *Clin. Exp. Immunol.* 1996. **106**: 45-54.

- Schmitt, E., P. Hoehn, C. Huels, *et al.* "T helper type 1 development of naive CD4⁺ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon- γ and is inhibited by transforming growth factor- β ." *Eur. J. Immunol.* 1994. **24**: 793-798.
- Schuurs, A. H. W. M. and H. A. M. Verheul "Effects of gender and sex steroids on the immune response." *J. Steroid Biochem.* 1990. **35**: 157-172.
- Secor, W. E., H. del Corral and M. G. dos Reis "Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201." *J. Infect. Dis.* 1996. **174**: 1131-1135.
- Seder, R., T. Marth, M. C. Sieve, *et al.* "Factor involved in the differentiation of TGF- β -producing cells from naive CD4⁺T cells : IL-4 and IFN- γ have opposing effects, while TGF- β positively regulates its own production." *J. Immunol.* 1998. **160**: 5719-5728.
- Sène, M., J. M. Duplantier, B. Marchand, *et al.* "Susceptibility of rodents to infection with *S. mansoni* in Richard-Toll (Sénégal)." *Parasite* 1996. **4**: 321-326.
- Sexton, J., A. Milner, M. Panaccio, *et al.* "Glutathione S-transferase - Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep." *J. Immunol.* 1990. **145**: 3905-3910.
- Shaw, D. J., J. Vercruyse, M. Picquet, *et al.* "The effect of different treatment regimens on the epidemiology of seasonally transmitted *Schistosoma haematobium* infections in four villages in the Senegal River Basin, Senegal." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.* 1999. **1993**: 1-9.
- Shelat, G. S., F. Aird and E. Redei "Exposure to dehydroepiandrosterone in utero affects T-Cell fonction in males only." *Neuroimmunomodulation* 1997. **4**: 154-162.
- Sher, A. "Complement dependent adherence of mast cells to schistosomula." *Nature* 1976. **263**: 334-336.
- Sher, A., B. F. Hall and M. D. Vadas "Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*." *J. Exp. Med.* 1978. **148**: 46-52.
- Shoemaker, C., A. Gross, A. Gebremichael, *et al.* "cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. **89**: 1842-1846.
- Singhal, S. S., M. Saxena, S. Awasthi, *et al.* "Gender related differences in the expression and characteristics of glutathione S-transferases of human colon." *Biochim. Biophys. Acta* 1992. **1171**: 19-26.
- Skelly, P. J., W. Evan Secor, M. G. Reis, *et al.* "Failure of schistosomiasis to significantly decrease testosterone levels in brazilian men." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994.: 40-44.
- Smythies, L. E., P. Coulson and R. A. Wilson "Monoclonal antibody to IFN γ modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae." *J. Immunol.* 1992a. **149**: 3654-3658.
- Smythies, L. E., R. M. Pemberton, P. S. Coulson, *et al.* "T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*." *J. Immunol.* 1992b. **148**(5): 1512-1518.
- Snapper, C. M., T. M. McIntyre, R. Mandler, *et al.* "Induction of IgG3 secretion by Interferon γ : a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens." *J. Exp. Med.* 1992. **175**: 1367-1371.
- Snapper, C. M. and J. J. Mond "Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching." *Immunol. Today* 1993. **14**: 15-17.
- Soisson, L. M., C. P. Masterson, T. D. Tom, *et al.* "Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen." *J. Immunol.* 1992. **149**: 3612-3620.
- Sonoda, E., R. Matsumoto, Y. Hitoshi, *et al.* "Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production." *J. Exp. Med.* 1989. **170**: 1415-1420.
- Stanisz, A. M., G. Kataeva and J. Bienenstock "Hormones and local immunity." *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994. **103**: 217-222.
- Stefano, G. B., V. Prevot, J. C. Beauvillain, *et al.* "Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: Evidence for an estrogen surface receptor." *J. Immunol.* 1999. **163**: 3758-3763.
- Stelma, F. F., I. Talla, K. Polman, *et al.* "Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection in a recently exposed community in Northern Senegal." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993. **49**: 701-706.
- Stelma, F. F., I. Talla, S. Sow, *et al.* "Efficacy and side effects of praziquantel in an endemic focus of *Schistosoma mansoni*." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995. **53**: 167-170.

- Stelma, F. F., M. vd Werf, I. Talla, *et al.* "Four years' follow-up of hepatosplenic morbidity in a recently emerged focus of *Schistosoma mansoni* in northern Senegal." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997. **91**: 29-30.
- Stewart, G. R., L. Elson, E. Araujo, *et al.* "Isotype-specific characterization of antibody responses to *Onchocerca volvulus* in putatively immune individuals." *Parasite Immunol.* 1995. **17**: 371-380.
- Sunyer, F. X., H. M. Gilles and A. M. Wilson "S. *haematobium* infection in Nigeria. Bacteriological and immunological findings." *Ann. Trop. Med. Parasit.* 1965. **59**: 304-311.
- Symmers, W. "Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of ova of *Bilharzia haematobium*." *J. Pathol. Bacteriol.* 1904. **9**: 237-239.
- Szekeres-Bartho, J. (1992). Immunosuppression by progesterone in pregnancy. Boca Raton, FL., CRC Press.
- T**alla, I., A. Kongs and P. Verlé "Preliminary study of the prevalence of human schistosomiasis in Richard-Toll (the Senegal river basin)." *Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. Hyg.* 1992. **86**: 182.
- Taylor, J. B., A. Vidal, G. Torpier, *et al.* "The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*." *EMBO J.* 1988. **7**: 465-472.
- Taylor, R. R., D. B. Smith, V. J. Robinson, *et al.* "Human antibody response to *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass." *Infect. Immun.* 1995. **63**: 4382-4388.
- Taylor, R. R., S. J. Allen, B. M. Greenwood, *et al.* "IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998. **58**: 406-413.
- Tchuem Tchuente, L. A., V. R. Southgate, C. Combes, *et al.* "Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful?" *Parasitol. Today* 1996. **12**: 231-236.
- Tendler, M., M. M. Vilar, C. A. Brito, *et al.* "Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14 : potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine?" *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1995. **90**: 255-256.
- Tendler, M., C. Brito, M. Vilar, *et al.* "A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996. **93**: 269-273.
- Tetelbaum, D., R. Arnon and M. Sela "Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999. **96**: 3842-3847.
- Tiuria, R., T. Kaneyuki, Y. Horii, *et al.* "Long term survival of damaged *Nippostrongylus brasiliensis* adult worms in the testosterone indian soft-furred rat, *Millardia meltda*." *Parasite Immunol.* 1997. **19**: 455-459.
- Tokuyama, Y. and H. Tokuyama "Retinoic acid and steroid hormones regulate IgA production by LPS-stimulated murine spleen cells." *Immunopharmacol.* 1994. **28**: 145-151.
- Trottein, F., C. Godin, R. J. Pierce, *et al.* "Interspecies variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferase." *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992. **54**: 63-72.
- Tsukamoto, A., Y. Kaneko, T. Yoshida, *et al.* "2-methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen, enhances apoptosis and β -galactosidase expression in vascular endothelial cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. **248**: 9-12.
- V**an Dam, G. J., F. F. Stelma, B. Gryseels, *et al.* "Antibody response patterns against *Schistosoma mansoni* in a recently exposed community in Senegal." *J. Infect. Dis.* 1996. **173**: 1232-1241.
- Van Etten, L., P. G. Kremsner, F. W. Krijger, *et al.* "Day-to-day variation of egg output and schistosome circulating antigens in urine of *Schistosoma haematobium*-infected scholl children from gabon and follow-up after chemotherapy." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997. **57**: 337-341.
- Van Vlasselaer, P., J. Punnonen and J. E. de Vries "Transforming growth factor- β directs IgA switching in human B cells." *J. Immunol.* 1992. **148**: 2062-2067.
- Velupillai, P. and D. A. Harn "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.
- Vennervald, B. J., C. M. Reimert, J. H. Ouma, *et al.* "Morbidity markers for *Schistosoma haematobium* infection." *Trop. Geo. Med.* 1994. **46**: 239-241.

- Vercruyse, J., V. R. Southgate and D. Rollinson "The epidemiology of human and animal schistosomiasis in the Senegal River Basin." *Acta Trop.* 1985. **42**: 249-259.
- Verlé, P., F. F. Stelma, P. Desreumaux, *et al.* "Preliminary study of urinary schistosomiasis in a village in the delta of the Senegal River basin, Senegal." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.* 1994. **88**: 401-405.
- Verwaerde, C., M. Joseph, M. Capron, *et al.* "Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*." *J. Immunol.* 1987. **138**: 4441-4446.
- Viana, I. R. C., R. Correa-Oliveira, O. D. S. Carvalho, *et al.* "Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area." *Parasite Immunology* 1995. **17**: 297-304.
- Viana Da Costa, A., S. Gaubert, S. Lafitte, *et al.* "Egg-hatching inhibition in mice immunized with recombinant *Schistosoma bovis* 28 kDa glutathione S-transferase." *Parasite Immunol.* 1999. **21**: 341-350.
- Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, *et al.* "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." *Nature* 1997. **390**: 350-351.
- W**aine, G. J., M. Becker, B. Kalinna, *et al.* "Cloning and functional expression of a *Schistosoma japonicum* cDNA homologous to the enolase gene family." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993a. **195**: 1211-1217.
- Waine, G. J., M. Becker, W. Yang, *et al.* "Cloning, molecular characterization, and functional activity of *Schistosoma japonicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative vaccine candidate against schistosomiasis japonica." *Infect. Immun.* 1993b. **61**: 4716-4723.
- Waine, G. J., M. M. Becker, J. C. Scott, *et al.* "Purification of a recombinant *Schistosoma japonicum* antigen homologous to the 22-kDa membrane antigen of *S. mansoni*, a putative vaccine candidate against schistosomiasis." *Gene* 1994. **142**: 259-263.
- Walker, J., P. Crowley, D. Moreman, *et al.* "Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*." *Molec. Bioch. Parasitol.* 1993. **61**: 255-264.
- Wang, J. L., S. H. Xiao, Z. Yang, *et al.* "Effect of oral artemether in controlling schistosomiasis in Yunnan mountainous endemic area." *Chin. J. Parasitol. Parasitic Dis.* 1997. **15**: 138-143.
- Warren, K. S., E. O. Domingo and R. T. B. Cowan "Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity." *Am. J. Pathol.* 1967. **51**: 735-756.
- Webster, M., A. J. C. Fulford, G. Braun, *et al.* "Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6 kilodalton-antigen from *Schistosoma mansoni* adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment." *Infect. Immun.* 1996. **64**: 4042-4046.
- Webster, M., B. D. Libranda-Ramirez, G. D. Aligui, *et al.* "The influence of sex and age on antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in human populations in Kenya and the Philippines." *Parasitology* 1997a. **114**: 383-393.
- Webster, M., P. G. Fallon, A. J. C. Fulford, *et al.* "Effect of praziquantel and oxamniquine treatment on human isotype responses to *Schistosoma mansoni*: elevated IgE to adult worm." *Parasite Immunol.* 1997b. **19**: 333-335.
- Webster, M., M. Roberts, A. J. C. Fulford, *et al.* "Human IgE responses to rSm22.6 are associated with infection intensity rather than age *per se*, in a recently established focus of *Schistosomiasis mansoni*." *Trop. Med. Intern. Health.* 1998. **3**: 318-326.
- Weiner, H. L. "Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases." *Immunol. Today* 1997. **18**: 335-343.
- Wenish, C., B. Parschalk, E. Narzt, *et al.* "Elevated serum of IL-10 and IFN- γ in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria." *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995. **74**: 115-117.
- White, N. J. "Artemisinin: current status." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994. **88**: 3-4.
- Widhe, M., C. Ekerfelt, P. Forsberg, *et al.* "IgG subclasses in Lyme borreliosis: A study of specific IgG subclass distribution in an interferon- γ -predominated disease." *Scand. J. Immunol.* 1998. **47**: 575-581.
- Wiest, P. M. "The epidemiology of morbidity of schistosomiasis." *Parasitol. Today* 1996. **12**: 215-220.
- Williams, M. E., S. Montenegro, A. L. Domingues, *et al.* "Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens." *J. Infect. Dis.* 1994. **170**: 946-954.

- Williams, M. E., P. Caspar, I. Oswald, *et al.* "Vaccination routes that fail to elicit protective immunity against *Schistosoma mansoni* induce the production of TGF- β , which down-regulates macrophage antiparasitic activity." *J. Immunol.* 1995. **154**: 4693-4700.
- Wilson, M. E., B. M. Young, B. L. Davidson, *et al.* "The importance of TGF- β in murine visceral leishmaniasis." *J. Immunol.* 1998. **161**: 6148-6155.
- Windhagen, A., D. E. Anderson, A. Carrizosa, *et al.* "IL-12 induces human T cells secreting IL-10 with IFN- γ ." *J. Immunol.* 1996. **157**: 1127-1131.
- Wira, C. R. and R. M. Rossoll "Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: Influence of sex hormones on antigen presentation in the vagina." *Immunology* 1995. **84**: 505-508.
- Wira, C. R. and C. P. Sandoe "Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions." *Nature* 1977. **268**: 534-535.
- Wolowczuk, I., C. Auriault, H. Gras-Masse, *et al.* "Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* p-28-1 antigen." *J. Immunol.* 1989. **142**: 1342-1350.
- Wolowczuk, I., C. Auriault, M. Bossus, *et al.* "Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse and monkey." *J. Immunol.* 1991. **146**: 1987-1995.
- Woolhouse, M. E. J. and P. Hagan "Seeking the ghost of worms past." *Nature Med.* 1999. **5**: 1225-1227.
- Wright, E. D., J. Chippangwi and M. S. Hutt "Schistosomiasis of the female genital tract. A histopathological study." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1982. **76**: 822-829.
- Wyler, D. J. (1990). Cell biology of schistosomes. *Modern Parasite Biology*. New York, Freeman: 91-106.
- Wyler, D. J. "Why does liver fibrosis occur in schistosomiasis?" *Parasitol. Today* 1992. **8**: 277-279.
- Wynn, T. A., I. Eltoun, A. W. Cheever, *et al.* "Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*." *J. Immunol.* 1993. **151**: 1430-1440.
- Wynn, T. A., A. W. Cheever, D. Jankovic, *et al.* "An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection." *Nature* 1995. **376**: 594-596.
- Wynn, T. A., A. Reynolds, S. James, *et al.* "IL-12 enhances vaccine-attenuated immunity to schistosome by augmentation both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite." *J. Immunol.* 1996. **157**: 4068-4078.
- X**iao, S. H. and B. A. Catto "In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*." *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1989. **33**: 1557-1562.
- Xu, C.-B., C. Verwaerde, J.-M. Grzych, *et al.* "A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability." *Eur. J. Immunol.* 1991. **21**: 1801-1807.
- Xu, C. B., C. Verwaerde, H. Gras-Masse, *et al.* "*Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains." *J. Immunol.* 1993. **150**: 940-949.
- Y**azdanbakhsh, Y. "Common features of T cell reactivity in persistent helminth infections: lymphatic filariasis and schistosomiasis." *Immunol. Letters* 1999. **65**: 109-115.
- Yazdanpanah, Y., A. K. Thomas, R. Kardoff, *et al.* "Organometric investigations of the spleen and liver by ultrasound in *Schistosoma mansoni* endemic and nonendemic villages in Senegal." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997. **57**: 245-249.
- Young, D. G., G. Skibinski, J. I. Mason, *et al.* "The influence of age and gender on serum dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S), IL-6, IL-6 soluble receptor (IL-6 sR) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) levels in normal healthy." *Clin. Exp. Immunol.* 1999. **117**: 476-481.
- Z**aki, K., F. Hefnawi, S. Hamza, *et al.* "Pituitary and ovarian activities in human adult females with bilharzial hepatic fibrosis." *Endocrinol.* 1982. **79**: 57-64.
- Zan, H., A. Cerutti, P. Dramitinos, *et al.* "CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF- β : evidence for TGF- β but not IL-10 dependent direct $\Sigma\mu$ to $\Sigma\alpha$ and sequential $\Sigma\mu$ to $\Sigma\gamma$, $\Sigma\gamma$ to $\Sigma\alpha$ DNA recombination." *J. Immunol.* 1998. **161**: 5217-5225.
- Zurawski, G. and J. E. de Vries "Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells." *Immunology Today* 1994. **15**: 19-26.

Annexes

ANNEXE I**DOSAGE ANTICORPS SPECIFIQUES CHEZ L'HOMME**

Technique : ELISA

- **Coating** : Plaques 96 puits Maxisorp (Nunc, Roskilde, Danemark)

Antigènes dilués en tampon Phosphate 10 mM, pH 7,2 (PBS): 100 µl/puit

Sh28GST, Sm28GST: 10 µg/ml

SWAP, SEA: 5 µg/ml

KLH: 5 µg/ml

Peptides linéaires dilués en tampon carbonate/bicarbonate 100 mM, pH 9,5 : 100 µl/puit

10-43, 24-43, 115-131 et 190-211 (séquences Sh28GST/Sm28GST): 5 µg/ml

incubation: 1 nuit à 4°C

- 1 lavage PBS-tween 0,1%

- **Saturation des plaques:**

PBS-gelatine 0,5% - 200 µl/puit - 30 min à T°C ambiante

- 1 lavage PBS-tween 0,1%

- **Dépôt des échantillons:**

serum dilués en PBS-tween 0,1%: 100 µl/puit

Isotype	Ig(H+L)	IgG(H+L)	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgE	IgA
Dilution	1/1000	1/100	1/20	1/20	1/20	1/10	1/20	1/10	1/20

incubation: 1 nuit à 4°C

- 3 lavages PBS-tween 0,1 %

- **Dépôt du conjugué** : Ac anti- Ig humaine biotinylé (SBA, Birgminghan, AL) :

Ac dilués en PBS-tween 0,1 % : 100µl/puit

anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgM, anti-IgA, anti-IgE, anti-IgG3 et anti-IgG4: 1/1000

anti-Ig(H+L): 1/15000 - anti-IgG(H+L): 1/2000

incubation: 1h30 à 37°C

- 4 lavages PBS-tween 0,1 %

- **Streptavidine Biotine Peroxidase** (SBP; Amersham, Les Ulis, France) :

dilué au 1/1000 en PBS-tween 0,1 %: 100µl/puit

incubation: 30 min à 37°C

- 6 lavages PBS-tween 0,1 %

- **Révélation en ABTS:**

(2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) diammonium (Sigma, St-Louis, MO)

dilué en tampon citrate 50 mM, pH 4 + H₂O₂ 0,003%: 100 µl/puit

- **Lecture à 405 nm** : Lecteur de plaques Multiskan (Labsystems)

ANNEXE II**CULTURE CELLULAIRE DES PBMC - DOSAGES DES CYTOKINES****- Purification des PBMC par gradient de densité**

- prelevement de sang en tube hépariné 10ml (Vacutainer)
- centrifugation 10min, 1500 rpm TA: récupération du plasma
- purification des PBMC sur ficoll Histopaque (Pharmacia, Uppsala, Suède)
- comptage du nombre de PBMC sur cellule de Thomas

- Culture des PBMC pour le dosage des cytokines:

I0: - plaques 24 puits (Nunc, Roskilde, Danemark)

- dépôt de $1,5 \times 10^6$ cellules/puit en milieu de culture: 750 μ l/puit

Composition milieu de culture

RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France)

Gentaline (Gibco): 8 mg/ml

L-glutamine (Sigma, St-Louis, MO): 2 mM

Sodium-pyruvate (Sigma): 1 mM

10 % Serum Veau Fétal (Gibco) décomplémenté 30 min à 56 °C

- dépôt solution antigénique (dilué en milieu de culture): 250 μ l/puit

Sh28GST, SEA, SWAP: 10 μ g/ml final

Con A: 1 μ g/ml final

milieu seul = témoin négatif

incubation à 37°C en étuve à CO₂

I3 et I5 : récupération des surnageants de culture

- Dosage des cytokines dans les surnageants de culture:

- Pour le dosage du TNF α , IFN γ , IL-5 et IL-10 : technique ELISA de la "paire" d'Ac monoclonaux selon les recommandations du fabriquant:

Genzyme (Cambridge, MA) :

Ac monoclonal purifié de souris anti-TNF α et anti-IFN γ humain

Pharmingen (San Diego, CA)

Ac monoclonal biotinylé de lapin anti-TNF α et anti-IFN γ humain

Ac monoclonal purifié de rat anti- IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 humain

TNF α , IFN γ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-12 humaine recombinantes

- Pour le dosage de l'IL-4 et du TGF- β 1 : utilisation de trousse immunoenzymatique

Biosource (Fleurus, Belgique) : EASIA human IL-4 kits

Promega (Madison, WI): TGF- β 1 ELISA System Kit

ANNEXE II bis**TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE (TTL)****- Purification des PBMC par gradient de densité**

prelevement de sang en tube hépariné 10ml (Vacutainer)
centrifugation 10min, 1500 rpm TA: récupération du plasma
purification des PBMC sur ficoll Histopaque (Pharmacia, Uppsala, Suède)
comptage du nombre de PBMC sur cellule de Thomas

- Culture des PBMC pour TTL:

J0: - plaques 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark)
- dépôt de 2×10^5 cellules/puit en milieu de culture: 100 μ l

Composition milieu de culture

RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France)
Gentaline (Gibco): 8 mg/ml
L-glutamine (Sigma, St-Louis, MO): 2 mM
Sodium-pyruvate (Sigma): 1 mM
10 % Serum Veau Fétal (Gibco) décomplémenté 30 min à 56 °C

- dépôt solution antigénique (dilué en milieu de culture): 100 μ l

Sh28GST, SEA, SWAP: 10 μ g/ml final

Con A: 1 μ g/ml final

milieu seul = témoin négatif

incubation à 37°C en étuve à CO₂

- **J3**: dépôt de la [³H] thymidine (Amersham) au 1/50 dans milieu de culture: 0,5 μ Curie/puit
incubation 1 nuit à 37°C en étuve à CO₂

- J5: comptage de la [³H] thymidine incorporée

récolte de l'ADN marqué sur papier filtre

dépôt du liquide scintillant Optiphase: 4 ml

comptage de la radioactivité dans un compteur β à scintillation

ANNEXE III**TEST DE COMPETITION DE LIAISON Sh28GST-HORMONES**

Technique: Marquage radioactif

- **Coating:** Tubes à ailettes Immuno tube (Nunc)

Anticorps polyclonal de lapin IgG anti-Sh28GST : 5 µg/ml

dilué en tampon carbonate/bicarbonate 100 mM, pH 9,5: 200 µl/tube

Incubation : 2h30 à 37°C (en rotation)

- 1 lavage en tampon phosphate 10mM, pH 7,2 (PBS) + tween 0,1%

- **Saturation :**

PBS-gélatine 0,5% (Merck, Darmstadt, Allemagne) - 300 µl/tube - 1h à T°C ambiante

- 1 lavage PBS-tween 0,1%

- **Dépôt de la solution Sh28GST - hormones**

Préparation du mélange (extemporanément):

rSh28GST à 10 µg/ml en PBS : 50 µl/tube

Hormones "chaudes": 10^{-7} M; 0,2 µCi/ml - 50 µl/tube (Amersham)

[¹²⁵I]-Testosterone, [¹²⁵I]-17β-Estradiol, [¹²⁵I]-Progesterone,

Hormones "froides": 0 M et 10^{-7} à 10^{-3} M - 50 µl/tube (Sigma)

Water-soluble Testosterone, 17β-Estradiol, Progesterone

Incubation du mélange: 4h à 37°C (en rotation)

Incubation du mélange dans les tubes à ailettes: 2h 30 à 37°C (bain-marie)

- 1 lavage en PBS-tween 0,1%

- **Comptage de la radioactivité "liée" :** compteur γ

ANNEXE IV**MESURE AFFINITE DE LIAISON Sh28GST-TESTOSTERONE**

Technique: **BIACORE** (Biacore AB, Uppsala, Suède)

- Immobilisation de la testostérone:

Immobilisation sur "SA sensor chip" présensibilisé avec de la streptavidine (Biacore AB)

Testostérone biotinylée (Sigma) à 20 µg/ml dans un mélange eau/ethanol (70/30 v/v)

20 µl injectée à un flux de 10 µl/min

- Saturation de la "SA sensor chip"

par un large excès de biotine à 40 µg/ml dilué en tampon Hepes (HBS; Biacore AB)

- Injection de la Sh28GST et des peptides de la Sh28GST

rSh28GST, peptides 24-43, 115-131 et 190-211: 10 à 100 µg/ml dilués en tampon HBS

flux d'injection: 20 µl/min

- Analyse des constantes d'association (ka) et de dissociation (kd)

temps d'association: 180 secondes

temps de dissociation: 1000 secondes

Utilisation du logiciel BIAevaluation 3.01 (Biacore AB)

ANNEXE V**LIAISON PEPTIDES - HORMONES**

Technique : ELISA

- **Coating** : Plaques 96 puits Maxisorp (Nunc, Roskilde, Danemark)

Antigènes dilués en tampon carbonate/bicarbonate 0,1 M pH 9,5: 100 µl/puit

peptides dérivés de la structure primaire de la Sh28GST: 5 µg/ml

24-43, 115-131 et 190-211 couplé à l'ovalbumine (Biocytex, Marseille)

ovalbumine (Sigma): 5 µg/ml

rSh28GST: 5 µg/ml

Incubation : 1 nuit à 4°C

-1 lavage en tampon Phosphate 10 mM, pH 7,2 (PBS) - Tween 0,1 %

-**Saturation des plaques**

PBS-gélatine 0,5% (Merck) - 200 µl - 30mn à T°C ambiante

-3 lavages en PBS-tween 0,1 %

-**Dépôt des hormones**

Hormones marquées à la peroxidase (Sigma) : 100µl/puit

17β-Estradiol-peroxidase: 200 µg/ml

Progestérone-peroxidase: 2 µg/ml

Testostérone-peroxidase: 2 µg/ml

Incubation: 1h30' à 37°C

-3 lavages en PBS-tween 0,1 %

-**Révélation en ABTS**

(2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium (Sigma)

dilué en tampon citrate 50 mM, pH 4 + H₂O₂ 0,003%: 100 µl/puit

-**Lecture à 405nm** : lecteur de plaques Multiskan (Labsystems)

ANNEXE VI

**INHIBITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE
DE LA Sh28GST PAR LES HORMONES**

Technique: test *in vitro* d'activité enzymatique

- Préparation des plaques: Plaques 96 puits Maxisorp (Nunc)

Tampon Phosphate 10 mM, pH 7,2 (PBS) - gelatine 0,5% - 200 µl/puit
30 min à T°C ambiante

- Dépôt sur plaque:

Produits dilués en tampon phosphate de potassium 50 mM (Tp KPO₄), pH 6,5
rSh28GST: 6 µg/ml - 10 µl/puit
Hormones: 0 à 10⁻² M - 20 µl/puit
Water-soluble testostérone, 17β-Estradiol, Progestérone (Sigma)
Incubation: 1heure à 37°C

- Réaction enzymatique:

Préparation du substrat extemporanément:

CDNB (1-Chloro-2,4-Di-Nitrobenzene; Sigma): 8,12 mg/ml dans ethanol absolu
Glutathion réduit (Sigma): 12,3 mg dans 0,78 ml Tp KPO₄ + 0,22 ml NaOH 1N

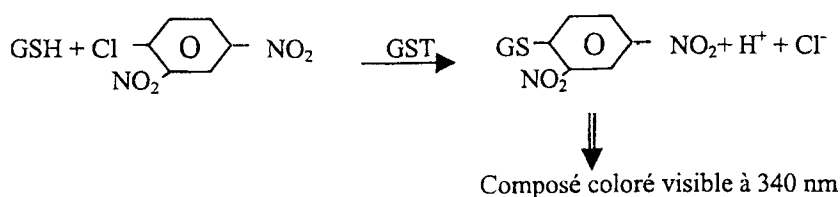
Dépôt du substrat: 200 µl/puit

9,50 ml de Tp KPO₄
250 µl de CDNB
250 µl de Glutathion réduit (GSH)

- Lecture à 340 nm: Lecteur de plaques Multiskan (Labsystems)

toutes les 15 secondes pendant 2 min
résultats exprimés en ΔDO sur 2 min

Principe de la réaction enzymatique:



ANNEXE VII**DOSAGE ANTICORPS SPECIFIQUES CHEZ LA SOURIS**

Technique : ELISA

- **Coating** : Plaques 96 puits Maxisorp (Nuns, Roskilde, Danemark)

Antigène dilué en tampon Phosphate 10 mM, pH 7,2 (PBS): 100 µl/puit

Sh28GST: 10 µg/ml

incubation: 1 nuit à 4°C

- 1 lavage PBS-tween 0,1%

- **Saturation des plaques:**

PBS-gelatine 0,5% - 200 µl/puit - 30 min à T°C ambiante

- 1 lavage PBS-tween 0,1%

- **Dépôt des échantillons:**

serums (saignée rétro-orbitale) dilués en PBS-tween 0,1 %: 100µl/puit

Isotype	IgG1	IgG2a	IgG3	IgA
Dilution	1/400	1/400	1/40	1/40

incubation: 1 nuit à 4°C

- 4 lavages PBS-tween 0,1 %

- **Dépôt du conjugué** : Ac anti- Ig murine marqué à la peroxydase:

Ac dilués en PBS-tween 0,1 % : 100µl/puit

anti-IgG1, anti-IgG2a: 1/1000 (SBA, Birgminghan, AL)

anti-IgG3: 1/1500 (SBA)

anti-IgA: 1/5000 (Sigma)

incubation: 1h30 à 37°C

- 6 lavages PBS-tween 0,1 %

- **Révélation en ABTS:**

(2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) diammonium (Sigma)

dilué en tampon citrate 50 mM, pH 4 + H₂O₂ 0,003 %: 100 µl/puit

- **Lecture à 405 nm** : Lecteur de plaques Multiskan (Labsystems)

ANNEXE VIII**INHIBITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE
DE LA 28GST EN PRESENCE DE SERUM HUMAIN**

Technique: test *in vitro* d'activité enzymatique

- Préparation des plaques: Plaques 96 puits Maxisorp (Nunc)

Tampon Phosphate 10 mM, pH 7,2 (PBS) - gelatine 0,5% - 200 µl/puit
30 min à T°C ambiante

- Dépôt sur plaques:

Antigènes dilués en tampon phosphate de potassium 50 mM (Tp KPO₄), pH 6,5

rSh28GST: 10 µg/ml - 10 µl/puit

rSm28GST: 4 µg/ml - 10 µl/puit

Serum (pur) pour chaque individu: 20 µl/puit

Incubation: 1heure à 37°C

- Réaction enzymatique:

Préparation du substrat extemporanément:

CDNB (1-Chloro-2,4-Di-Nitrobenzene; Sigma): 8,12 mg/ml dans ethanol absolu

Glutathion réduit (Sigma): 12,3 mg dans 0,78 ml Tp KPO₄ + 0,22 ml NaOH 1N

Dépôt du substrat: 200 µl/puit

9,50 ml de Tp KPO₄

250 µl de CDNB

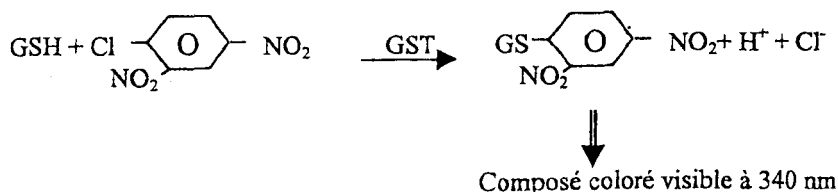
250 µl de Glutathion réduit (GSH)

- Lecture à 340 nm: Lecteur de plaques Multiskan (Labsystems)

toutes les 15 secondes pendant 2 min

résultats exprimés en ΔDO sur 2 min

Principe de la réaction enzymatique:



ANNEXE IX**DOSAGE DES ANTIGENES CIRCULANTS DE SCHISTOSOMES
DOSAGE DU CAA: Circulating Anodic Antigen**

Technique: ELISA

- **Coating:** Plaques 96 puits (Nunc)

Ac monoclonal anti-CAA en tampon Phosphate 10 mM (PBS): 2,5 µg/ml - 100 µl/puit

Incubation: 2h30 à 37°C

- 1 lavage en PBS-tween 0,1%

- **Saturation des plaques:**

PBS-BSA 0,5% (Sigma) - 200 µl/puit - 30 min à T°C ambiante

-3 lavages en PBS-tween 0,1%

- **Dépôt des échantillons:**

Préparation des échantillons (extemporanément):

Traitement à l'acide trichloro acétique (TCA) (dissociation des immun-complexes)

Serum de chaque individu: traitement TCA 4%

Gamme standart de SWAP: traitement TCA 7,5%

Dépôt sur plaques: 100 µl/puit

Incubation: 1h30 à 37°C

- 4 lavages en PBS-tween 0,1%

- **Dépôt du conjugué:**

Ac monoclonal anti-CAA biotinylé: 2 µg/ml en tampon CAA - 100 µl/puit

Tampon CAA: PBS 10 mM

MgCl₂ 2mM

BSA 0,1%

Tween 0,3%

Incubation: 1h30 à 37°C

- **Streptavidine-Phosphatase Alcaline :** (Sigma)

dilué au 1/6000 en tampon CAA: 100 µl/puit

Incubation 30 min à 37°C

- 6 lavages en PBS-tween 0,1%

- **Révélation:**

Substrat pNPP(FAST™ p-Nitrophenyl phosphate tablet sets; Sigma)

dilué en PBS: 100 µl/puit

- **Lecture à 405nm:** Lecteur de plaques Multiskan (Labsystems)

à 30 min, 1heure et après une nuit

ANNEXE X**BILHVAX 1a : DOSAGE ANTICORPS**

Technique : ELISA

- **Coating** : Plaques 96 puits Maxisorp (Nunc, Roskilde, Danemark)

Antigènes dilués en tampon Phosphate 10 mM, pH 7,2 (PBS): 100 µl/puit

rSh28GST: 10 µg/ml

SWAP: 5 µg/ml

GST placentaire humaine (Sigma): 5 µg/ml

incubation: 2h30 à 37°C

- 1 lavage PBS-tween 0,1 %

- **Saturation des plaques:**

PBS-gelatine 0,5% - 200 µl/puit - 30 min à T°C ambiante

- 3 lavage PBS-tween 0,1 %

- **Dépôt des échantillons:**

serum dilués en PBS-tween 0,1 %: 100µl/puit - 6 dilutions/serum

Isotype	IgG(H+L)	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE	IgA
Dilution de départ	1/500	1/100	1/20	1/20	1/10	1/10	1/20

incubation: 1h à T°C ambiante puis 1 nuit à 4°C

- 4 lavages PBS-tween 0,1 %

- **Dépôt du conjugué** : Ac anti- Ig humaine biotinylé (SBA, Birgminghan, AL) :

Ac dilués en PBS-tween 0,1 % + gélatine 0,5% (Tp A): 100µl/puit

anti-IgG(H+L), anti-IgG2, anti-IgG3 anti-IgG4, anti-IgA: 1/1000

anti-IgG1: 1/1500

anti-IgE (Pharmingen): 1/500 (Tp A + MgCl₂ 2 mM)

incubation: 1h30 à 37°C

- 4 lavages PBS-tween 0,1 %

- **Streptavidine Biotine Peroxidase** (SBP; Amersham, Les Ulis, France) :

dilué au 1/1500 en Tp A: 100 µl/puit

incubation: 30 min à 37°C

- 6 lavages PBS-tween 0,1 %

- **Révélation en ABTS:**

(2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) diammonium (Sigma)

dilué en tampon citrate 50 mM, pH 4 + H₂O₂ 0,003 %: 100 µl/puit

- **Lecture à 405 nm** : Lecteur de plaques Multiskan (Labsystems)

ANNEXE XI**BILHVAX 1a: INHIBITION DE L'ACTIVITE
ENZYMATIQUE DE LA Sh28GST**

Technique: test *in vitro* d'activité enzymatique

- Préparation des plaques: Plaques 96 puits Maxisorp (Nunc)

Tampon Phosphate 10 mM, pH 7,2 (PBS) - gelatine 0,5% - 200 µl/puit
30 min à T°C ambiante

- Dépôt sur plaque:

rSh28GST en tampon phosphate de potassium 50 mM (Tp KPO₄), pH 6,5: 20 µl/puit
10 µg/ml (7,14 pmole/puit)
6 µg/ml (4,3 pmoles/puit)
4 µg/ml (2,85 pmoles/puit)
2 µg/ml (1,43 pmoles/puit)

Serum (pur) par individu et par temps : 20 µl/puit

Incubation: 1 heure à 37°C

- Réaction enzymatique:

Préparation du substrat extemporanément:

CDNB (1-Chloro-2,4-Di-Nitrobenzene; Sigma): 8,12 mg/ml dans ethanol absolu

Glutathion réduit (Sigma): 12,3 mg dans 0,78 ml Tp KPO₄ + 0,22 ml NaOH 1N

Dépôt du substrat: 200 µl/puit

9,50 ml de Tp KPO₄

250 µl de CDNB

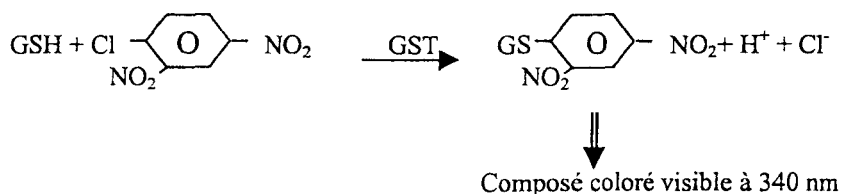
250 µl de Glutathion réduit (GSH)

- Lecture à 340 nm: Lecteur de plaques Multiskan (Labsystems)

toutes les 15 secondes pendant 2 min

résultats exprimés en ΔDO sur 2 min

Principe de la réaction enzymatique:



ANNEXE XII**BILHVAX 1a: CULTURE CELLULAIRE EN SANG TOTAL
ET DOSAGES DES CYTOKINES****- Prélèvement sanguin et numération**

prélevement de sang pour culture cellulaire en tube Sodium Héparine 20ml (Vacutainer)
numération des cellules mononuclées (monocytes et lymphocytes) par COULTER
prélèvement en tube EDTA - numération au CIC de Lille

- Culture en sang total des cellules mononuclées:

I0: - plaques 24 puits (Nunc)

- dépôt de 2×10^6 cellules/puit en milieu de culture: 1 ml/puit

Composition milieu de culture

RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France)

Gentaline (Gibco): 8 mg/ml

L-glutamine (Sigma, St-Louis, MO): 2 mM

Sodium-pyruvate (Sigma): 1 mM

- dépôt solution antigénique (dilué en milieu de culture): 1 ml/puit

rSh28GST: 3, 10 ou 30 μ g/ml final

BCG: 10 μ g/ml

Con A: 1 μ g/ml final

milieu seul = témoin négatif

incubation à 37°C en étuve à CO₂

I3 et I5 : récupération des surnageants de culture

- Dosage des cytokines dans les surnageants:

Kits de dosage immunoenzymatique

Immunotech (Marseille, France): IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13 et IFN- γ

Promega (Madison, WI): TGF- β 1 ELISA System Kit

Abstract

Specific immune response to vaccine candidate against schistosomiasis: from immuno-epidemiological evaluation to clinical trial.

Schistosomiasis is a endemic parasite disease affecting 200 million of individuals in the tropics. The eggs layed in the tissues are at the origin of a severe pathology causing several thousand deaths every year. Since chemotherapy present limits of efficacy, the development of a vaccinal strategy occur the principal hope against schistosomiasis. The schistosome Glutathion S-Transferases of 28 kDa (28GST) are probably the most promising vaccine candidates to prevent the pathology. In animal models, the efficacy of 28GST vaccination is principally characterized by the reduction of worm fecundity mediated by antibody-dependent inhibition of 28GST enzymatic activity.

The major objective of our immuno-epidemiological studies was to evaluate the immune response to *S. haematobium* 28GST (Sh28GST) in *S. haematobium*-infected populations from Senegal River basin. Our work show that specific immune response is naturally acquired with age in a gender-dependent manner. Anti-Sh28GST IgG3 response associated with specific IFN γ and IL-10 production is predominant in males whereas specific IgA, TGF β and IL-10 production is higher in female population. Sexual hormones could play a key role in the orientation of this gender-dependent immune response. In addition, we have demonstrated a specific binding between Sh28GST and these steroid hormones suggesting that 28GST antigen could be involved to its own immunogenicity in favoring the access of sexual hormones to immune cells. These results point out the involvement of original mechanisms in the regulation of specific immune response. The treatment by praziquantel (PZQ) induce the increase of the specific IgG3 and IgA responses in infected children suggesting that chemotherapy could accelerated the development of age-dependent acquired immune response to 28GST. The role of these isotypes in neutralizing the 28GST enzymatic activity has been also suggested in acquired resistance to infection.

The first clinical trials with Sh28GST antigen are actually performed and are coordinated by the Prof. A. CAPRON from Pasteur Institut of Lille. The results of Phase 1a trial showed that Sh28GST administration in healthy volunteers was well tolerated and induced a strong immune response. Specific IgG3 and IgA responses could be involved in the high inhibition of Sh28GST enzymatic activity induced after vaccination. This immune profile seems to be consistent with the initial concept supported by the preclinical data on the vaccine efficacy of Sh28GST and immuno-epidemiological studies. Our results show new mechanisms in the regulation of specific immune response and are promising in the perspective of Phase 2 clinical trials in which the vaccination will be combined with PZQ treatment in infected children.

Key-words : Human, Anti-infectious immunity, Schistosomiasis, Vaccination, Glutathion S-Transferases, Chemotherapy, Immune regulation.



Résumé

Les schistosomiasés constituent un groupe de maladies parasitaires infectant 200 millions de personnes dans les zones sub-tropicales. Les oeufs pondus par les schistosomes s'embolisant dans les tissus provoquent une pathologie sévère qui cause plusieurs centaines de milliers de décès par an. La lutte chimiothérapique présentant de nombreuses limites d'efficacité, le développement d'un vaccin représente donc le principal espoir. Les Glutathion S-Transferase de 28 kDa (28GST) de schistosomes sont probablement les candidats vaccins les plus prometteurs pour prévenir la pathologie. Dans les modèles animaux, l'efficacité de la vaccination GST est caractérisée principalement par une réduction de la fécondité des vers médiée par l'inhibition de l'activité enzymatique 28GST par les anticorps.

L'objectif principal de nos études immuno-épidémiologiques était d'évaluer la réponse immune spécifique à l'antigène Sh28GST chez des populations infectées par *S. haematobium* dans la région du Fleuve Sénégal. Notre travail montre que la réponse immune spécifique s'acquiert naturellement avec l'âge et de façon sexe-dépendante. La réponse IgG3 anti-Sh28GST associée à la production spécifique d'IFN γ et d'IL-10 est prépondérante chez les hommes alors que c'est la production d'IgA, de TGF β et d'IL-10 spécifique qui est majoritaire chez les femmes. Les hormones sexuelles pourraient jouer un rôle majeur dans l'orientation de cette réponse sexe-dépendante. De plus, nous avons mis en évidence une liaison spécifique entre la Sh28GST et ces stéroïdes suggérant que la 28GST pourrait intervenir directement sur la régulation de son immunogénicité en favorisant l'accès de ces stéroïdes aux cellules immunitaires. Ces résultats soulignent l'existence de mécanismes originaux intervenant dans la régulation de la réponse immune spécifique. L'effet d'un traitement par le PZQ chez les enfants entraîne une augmentation des IgG3 et IgA spécifiques suggérant que cette chimiothérapie pourrait accélérer le développement de la réponse anti-28GST acquise naturellement avec l'âge. Le rôle de ces isotypes dans la neutralisation de l'activité enzymatique GST peut également être suggéré dans l'acquisition naturelle d'une résistance à l'infection.

Les premiers essais cliniques avec la protéine *S. haematobium* 28 GST (Sh28GST) sont actuellement développés sous la responsabilité du Prof. A. CAPRON de l'Institut Pasteur de Lille. Les résultats de l'essai de Phase 1a ont montré que l'administration de la Sh28GST chez des volontaires sains était parfaitement tolérée et induisait une importante immunogénicité. Les IgG3 et IgA spécifiques interviendraient dans la forte inhibition de l'activité enzymatique GST induite après vaccination. Ce profil immunitaire semble donc compatible avec le concept initial d'efficacité vaccinale de la Sh28GST observée au cours des études pré-cliniques. Nos résultats ont permis de caractériser de nouveaux mécanismes de régulation de la réponse immune spécifique et sont prometteurs dans la perspective des essais cliniques de Phase 2 au cours desquels la vaccination sera associée au traitement par le PZQ chez des enfants infectés.

Mots-clefs : Homme, Immunité anti-infectieuse, Schistosomiasés, Vaccin, Glutathion S-Transferases, Chimiothérapie, Régulation immunitaire.

DISCIPLINE

Immunité anti-infectieuse

LABORATOIRE D'ACCUEIL

INSERM U167

"Relations Hôtes-Parasites et Stratégies Vaccinales"

Institut Pasteur de Lille

1, rue du Prof. Calmette - BP245

59019 Lille Cedex