Influence du bacille de Calmette et Guérin (B.C.G.) sur la migration larvaire de *Schistosoma mansoni* chez la Souris

par J. TRIBOULEY, J. TRIBOULEY-DURET et M. APPRIOU

Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Université Bordeaux II.
F 33000 Bordeaux

Résumé.

L'injection de B.C.G. à la Souris entraîne une augmentation de la résistance non spécifique de l'organisme vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*, se traduisant par une importante diminution du nombre des schistosomules pulmonaires ; les mécanismes de défense mis en jeu semblent intervenir de façon précoce dès les premiers stades de migration larvaire du parasite. L'état de résistance non spécifique ainsi obtenu apparaît de façon progressive après l'inoculation du bacille ; il se maintient plusieurs semaines bien qu'il ait alors tendance à s'atténuer. Une réinoculation de B.C.G. à l'animal déjà sensibilisé aux antigènes du bacille entraîne une immunostimulation beaucoup plus intense et dont le délai d'apparition est beaucoup plus court.

Summary.

Effects of *Bacillus Calmette and Guérin* (B.C.G.) on larvae migration of *Schistosoma mansoni* in mice.

The injection of B.C.G. into mice results in an increase of non-specific resistance in the organism against *Schistosoma mansoni* characterized by a sharp reduction in the number of pulmonary schistosomules ; the defense mechanisms involved appear to act early in first stages of migration by the parasite larvae. The state of non-specific resistance thus obtained appears progressively following inoculation of the bacillus ; it is maintained for several weeks despite its tendency to weaken afterwards. Re-inoculation of B.C.G. in an animal which has already been sensitized to the antigens of the bacillus results in a immunostimulation which is far more intense and which appears much earlier on.

Accepté le 14 novembre 1979.

Le B.C.G. se comporte comme un immuno-stimulant qui augmente la résistance non spécifique de l'organisme vis-à-vis de différents agents infectieux de nature virale, bactérienne ou parasitaire. C'est ainsi que chez la Souris l'injection de B.C.G. entraîne une plus grande résistance à l'infestation par *Schistosoma mansoni* comme le montre la diminution du nombre de parasites adultes hébergés par les animaux traités (2, 4). Mais il est certain que l'action protectrice du B.C.G. s'exerce dès les stades précoces de l'infestation ainsi que nous avons pu nous-mêmes le constater (12, 13). Le but de ce travail est de préciser l'action du B.C.G. sur la migration larvaire de *Schistosoma mansoni* chez la Souris.

Matériel et Méthodes

PROTOCOLE D'IMMUNOSTIMULATION.

Des souris femelles de race Swiss sont traitées par 1 mg d'immuno-B.C.G. Pasteur F, injecté par voie intraveineuse. Une deuxième injection de la même quantité de B.C.G. est éventuellement effectuée 8 semaines plus tard pour certains groupes d'animaux.

INFESTATION D'ÉPREUVE.

Les souris préalablement rasées sont infestées par balnéation à raison de 2 000 cercaires de *Schistosoma mansoni* (1) par animal.

L'infestation d'épreuve est réalisée à des temps variables après la dernière injection de B.C.G. allant du jour de l'injection jusqu'à la 11^e semaine suivant l'injection.

Des souris non traitées par le B.C.G. sont infestées dans les mêmes conditions et servent de témoins.

TESTS D'IMMUNITÉ.

La numération des schistosomules pulmonaires est effectuée à des temps variables après l'infestation allant du jour de l'infestation au 21^e jour de l'infestation, suivant la méthode de Sher *et al.* (9). Les vaisseaux pulmonaires sont perfusés par du liquide de Hanks hépariné et les poumons coupés en morceaux de 1 à 2 mm sont mis à incuber pendant 3 heures à 37 °C dans du liquide de Hanks. Après élimination des grosses particules la suspension larvaire est centrifugée et la numération des schistosomules contenues dans le culot est effectuée au microscope au faible grossissement.

Pour la numération des schistosomules cutanées, l'infestation est réalisée au niveau d'une zone bien délimitée des téguments par une technique dérivée de celle de Smithers et Terry (10), la Souris est immobilisée sur le dos à l'aide de bandes de sparadrap et un écrou en acier est déposé sur l'abdomen préalablement rasé de

(1) Souche L.E. Belo Horizonte.

l'animal, la suspension de cercaires est déposée à l'intérieur de l'écrou (200 cercaires par souris) et laissée en contact avec les téguments pendant 30 minutes. La numération des schistosomules cutanées est effectuée à des temps variables du 1^{er} au 5^e jour de l'infestation suivant la technique de Miller et Wilson (8) ; la zone des téguments mise en contact avec la suspension de cercaires est prélevée et découpée en morceaux, puis mise à incuber pendant 3 heures à 37 °C dans du liquide Hanks ; les schistosomules sont ensuite comptées suivant un protocole analogue à celui utilisé pour la numération des schistosomules pulmonaires.

Fig. 1. Effet d'une injection de B.C.G. sur l'apparition des schistosomules de *S. mansoni* au niveau du poumon de la Souris.

Résultats

I. — ETUDE COMPARÉE DES CINÉTIQUES D'APPARITION DES SCHISTOSOMULES AU NIVEAU DES POUMONS DE SOURIS TRAITÉES PAR LE B.C.G. ET DE SOURIS TÉMOINS.

Vingt-cinq Souris traitées par le B.C.G. sont infestées 14 jours plus tard à raison de 2 000 cercaires par animal ; parallèlement, 25 Souris non traitées par le B.C.G.

sont infestées dans les mêmes conditions avec la même suspension de cercaires. Tous les 2 jours, jusqu'au 21^e jour de l'infestation, 2 Souris de chaque groupe sont sacrifiées et les schistosomules pulmonaires sont dénombrées.

Les résultats rapportés sur le *tableau I* montrent que chez les Souris témoins, des schistosomules sont décelables au niveau du poumon dès le 3^e jour de l'infestation, leur nombre est maximum au 5^e jour et décroît ensuite très rapidement, puis d'une manière beaucoup plus lente puisqu'au 21^e jour quelques parasites sont encore décelables au niveau du poumon.

Chez les Souris traitées par le B.C.G. le nombre de schistosomules est nettement abaissé par rapport aux témoins, mais leur délai d'apparition au niveau des poumons n'est nullement modifié, en particulier, aucun retard ne peut être noté.

Tableau I. Effet d'une injection de B.C.G. sur l'apparition des schistosomules de S. mansoni au niveau du poumon de la Souris. (Deux Souris témoins et deux Souris traitées par le B.C.G. sont sacrifiées à des temps déterminés après l'infestation ; les chiffres rapportés sur le tableau indiquent le nombre de schistosomules retrouvées pour chaque Souris autopsiée, les chiffres entre parenthèses indiquent les valeurs moyennes)

Temps de l'autopsie après l'infestation	Nombre de schistosomules recueillies au niveau des poumons	
	Souris témoins	Souris traitées
3 jours	76 88 (82)	17 16 (16,5)
5 jours	333 313 (323)	98 70 (84)
7 jours	168 194 (181)	69 59 (64)
10 jours	95 51 (73)	34 32 (33)
12 jours	15 33 (24)	13 9 (11)
14 jours	17 27 (22)	8 9 (8,5)
17 jours	16 12 (14)	7 5 (6)
19 jours	7 13 (10)	1 3 (2)
21 jours	9 5 (7)	1 1 (1)

II. — INTENSITÉ ET DÉLAI D'APPARITION DE L'IMMUNOSTIMULATION CHEZ DES SOURIS TRAITÉES PAR DEUX INJECTIONS DE B.C.G.

Un premier lot de 25 Souris (lot A) reçoit deux injections de B.C.G. séparées par un intervalle de temps de 8 semaines.

Un deuxième lot de 25 Souris (lot B) reçoit une seule injection de B.C.G., contemporaine de la 1^{re} injection du lot A.

Un troisième lot de 25 Souris (lot C) reçoit une seule injection de B.C.G. contemporaine de la 2^e injection du lot A.

Un dernier lot de 25 Souris ne reçoit pas de B.C.G. et sert de témoin.

L'infestation des Souris des différents lots est effectuée, à raison de 3 Souris par lot, à des temps déterminés après la deuxième injection de B.C.G. (allant du jour de l'injection au 21^e jour suivant l'injection).

La numération des schistosomules pulmonaires est effectuée dans tous les cas au 5^e jour de l'infestation.

Le protocole utilisé peut être résumé de la façon suivante :

Les résultats obtenus pour les Souris du lot C (*tableau II et fig. 2*) montrent qu'à la suite d'une seule injection de B.C.G. un état de résistance non spécifique se développe rapidement dans l'organisme : déjà net chez les animaux infestés 5 jours après l'injection de la suspension bacillaire cet état de résistance devient important à partir des 7^e-10^e jours et se maintient à ce niveau jusqu'à la fin de la période d'observation (21 jours). L'étude des Souris du lot B montre par ailleurs que 8 semaines après une seule injection de B.C.G. l'état de résistance non spécifique est encore important, mais il a tendance à disparaître progressivement. Quant aux Souris traitées par 2 injections de B.C.G. (lot A) elles présentent un état de résistance marqué, plus intense que celui des animaux n'ayant reçu qu'une seule injection ; d'autre part cet état de résistance se manifeste très rapidement puisqu'il peut être mis en évidence chez des Souris infestées le jour même de la 2^e injection de B.C.G. (6 heures après l'injection) et sacrifiées 5 jours plus tard pour la numération des schistosomules ; cet état de résistance se maintient par la suite durant toute la durée de l'observation (21 jours).

III. — ETUDE COMPARÉE DES SCHISTOSOMULES CUTANÉES CHEZ DES SOURIS TRAITÉES ET NON TRAITÉES PAR LE B.C.G.

Cinq Souris traitées par 2 injections de B.C.G. pratiquées à 8 semaines d'intervalle sont infestées 2 semaines après la deuxième injection de B.C.G. suivant la méthode de Smithers et Terry précédemment décrite.

Tableau II. Effet d'une 2^e injection de B.C.G. sur l'intensité et le délai d'apparition de l'immunostabulation. Les chiffres rapportés indiquent le nombre de schistosomules retrouvées pour chaque Souris autopsiée, les chiffres entre parenthèses indiquant les valeurs moyennes ; les pourcentages sont calculés à partir des valeurs moyennes par rapport aux témoins non traités infestés et autopsiés le même jour.

(Lot A : Souris ayant reçu 2 injections de B.C.G. à 8 semaines d'intervalle

Lot B : Souris ayant reçu 1 seule injection de B.C.G. contemporaine de la 1^{re} injection du lot A.

Lot C : Souris ayant reçu 1 seule injection de B.C.G. contemporaine de la 2^e injection du lot A. Les témoins n'ont pas reçu de B.C.G.)

Temps de l'infestation après la 2 ^e injection de B.C.G.	Nombre de schistosomules pulmonaires au 5 ^e jour de l'infestation				
	Lot A	Lot B	Lot C	Témoins	
6 heures	8	53	187	210	
	7 4,2 %	61 29,2 %	201 96,1 %	174	
	9	54	166	192	
	(8 ± 2,5)	(56 ± 10,9)	(184,7 ± 43,7)	(192 ± 44,7)	
2 jours	8	75	168	203	
	6 4 %	63 36,4 %	175 89,4 %	211	
	10	79	190	182	
	(8 ± 5)	(72,3 ± 20,6)	(177,6 ± 27,9)	(198,7 ± 37,2)	
5 jours	3	95	154	220	
	5 1,5 %	86 43 %	157 73,3 %	209	
	2	103	173	231	
	(3,3 ± 3,8)	(94,7 ± 21,2)	(161,3 ± 25,4)	(220 ± 27,3)	
7 jours	9	94	53	219	
	6 3,4 %	122 51,1 %	40 25,5 %	182	
	5	89	59	196	
	(6,7 ± 5,2)	(101,7 ± 44,2)	(50,7 ± 24,1)	(199 ± 46,4)	
10 jours	13	84	52	310	
	5 3,2 %	147 45,2 %	22 18,9 %	264	
	8	143	83	253	
	(8,7 ± 10)	(124,7 ± 87,6)	(52,3 ± 75,8)	(275,7 ± 75,1)	
15 jours	4	151	47	210	
	5 2,8 %	174 73,6 %	37 18,4 %	195	
	9	143	34	232	
	(6 ± 6,6)	(156 ± 40)	(39,3 ± 16,9)	(212,3 ± 46,2)	
21 jours	6	135	35	201	
	8 3,3 %	173 66,4 %	32 17,1 %	233	
		111	41	197	
	(7 ± 12,7)	(139,7 ± 77,6)	(36 ± 11,4)	(210,3 ± 49)	

La comparaison statistique des taux d'infestation des différents lots A, B et C par rapport au lot témoin montre que les taux d'infestation du lot A sont plus bas que ceux du lot témoin ($p < 0,01$). Il en est de même pour le lot B ($p < 0,01$ sauf pour les temps 15 jours et 21 jours où $p < 0,05$) Pour le lot C, les différences sont statistiquement significatives à partir du temps 5 jour ($p < 0,01$).

La comparaison statistique des taux d'infestation du Lot A (2 injections de B.C.G.) et du lot C (1 seule injection de B.C.G.) montre que les différences observées sont significatives à tous les temps ($p < 0,01$) à l'exception du temps 10 jours.

Fig. 2. Intensité de l'infestation (en % par rapport aux témoins).

Cinq Souris non traitées par le B.C.G. sont infestées dans des conditions identiques avec la même suspension de cercaires. Du 1^{er} au 5^e jour de l'infestation, une Souris de chaque lot est sacrifiée et les schistosomules cutanées et pulmonaires sont comptées.

Tableau III. Action de l'immunostimulation par le B.C.G. sur les schistosomules cutanées et pulmonaires de Souris infestées par 200 cercaires de *S. mansoni*

Temps de l'autopsie après l'infestation	Nombre de schistosomules recueillies			
	Peau		Poumons	
	Témoins	Traitées	Témoins	Traitées
1 jour	64	66	0	0
2 jours	35	33	0	0
3 jours	4	3	2	0
4 jours	0	1	15	0
5 jours	0	0	80	1

Les résultats rapportés sur le *tableau III* montrent qu'au 5^e jour de l'infestation le nombre des schistosomules pulmonaires est considérablement abaissé chez les animaux traités, confirmant l'immunostimulation réalisée. Par contre, les nombres de schistosomules décelées au niveau de la peau sont tout à fait comparables chez les Souris traitées et non traitées. Il faut cependant noter que certaines schistosomules recueillies chez les animaux traités semblent avoir perdu une partie de leur mobilité.

Discussion

L'injection de B.C.G. permet d'augmenter de façon importante la résistance de la Souris vis-à-vis de *S. mansoni*. Les résultats que nous avons obtenus montrent que les facteurs de défense mis en jeu s'exercent de façon précoce durant la phase de migration des formes larvaires du parasite dans l'organisme. Nous avons pu d'ailleurs constater que le B.C.G. est pratiquement sans action lorsqu'il est injecté à des Souris déjà infestées par un parasite dont la migration larvaire est terminée. Ces observations sont tout à fait en accord avec les notions généralement admises concernant l'immunité au cours de la schistosomiase : l'organisme infesté par le parasite développe une résistance à la réinfestation qui s'exerce aux dépens des formes larvaires d'invasion du parasite ; mais cet état de résistance est incapable d'entraîner l'élimination de la population de vers adultes déjà installés dans l'organisme (état d'immunité concomitante). Des antigènes de l'hôte se fixent sur les schistosomules au cours de leur migration et masqueraient ainsi les antigènes parasitaires, permettant ensuite aux parasites plus âgés d'échapper aux réactions immunologiques de l'organisme (11). Un tel processus ne peut, semble-t-il, intervenir dans le déroulement d'une immunostimulation non spécifique telle que celle obtenue par le B.C.G. ; d'autres raisons doivent être invoquées dans ce cas pour expliquer la résistance des parasites adultes (localisation, taille, etc...). L'étude des schistosomules pulmonaires montre que la migration du parasite vers les poumons atteint son maximum au 5^e jour de l'infestation, mais elle se poursuit au-delà du 20^e jour ; chez les animaux traités par le B.C.G. la courbe de migration présente la même allure : l'étalement est le même et le maximum se situe également au 5^e jour de l'infestation. Aucun retard dans la migration des parasites vers le poumon n'est donc observé chez les animaux soumis à une immunostimulation par le B.C.G. ; par contre le nombre de parasites parvenant aux poumons est considérablement abaissé par rapport aux témoins. On peut en conclure qu'un certain nombre de schistosomules ont été détruites avant leur arrivée aux poumons et c'est pourquoi nous avons entrepris l'étude des schistosomules cutanées. Les résultats préliminaires portant sur un petit nombre d'animaux rapportés dans ce travail ne permettent pas de déceler de différences pour le nombre de schistosomules retrouvées au niveau des téguments à différents temps de l'infestation chez les animaux traités et les témoins. On pourrait donc conclure que la destruction des parasites s'effectue à un niveau intermédiaire entre la peau et les poumons. Il faut cependant noter qu'une altération de la mobilité des schistosomules cutanées peut être observée chez les animaux traités, permettant d'envisa-

ger une atteinte encore plus précoce du parasite, dès son passage au niveau des téguments.

L'immunostimulation obtenue dépend par ailleurs des modalités d'administration du B.C.G. Les facteurs conditionnant l'efficacité du B.C.G. sont liés d'abord au B.C.G. lui-même : dose, souche, méthode de culture et de conservation (5). L'immuno B.C.G.-F utilisé dans ce travail est une préparation de B.C.G. vivant frais conservé à + 4 °C dans une solution stabilisante (milieu de Dubos additionnée de glycérol et d'albumine humaine) ; il a été choisi en raison de son pouvoir immunostimulant élevé (7). Des facteurs liés à l'hôte jouent aussi un rôle important ; c'est ainsi qu'après une injection unique de B.C.G. l'immunostimulation ne se manifeste qu'après un certain temps de latence ; un état de résistance non spécifique important ne se manifeste qu'après le 10^e jour et on estime généralement qu'il est conditionné par l'apparition d'un état d'hypersensibilité vis-à-vis des antigènes bacillaires (1, 5). Effectivement, ainsi que nous l'avons constaté, la réinoculation de B.C.G. à des souris déjà sensibilisées par une 1^{re} injection de bacilles entraîne une immunostimulation ; celle-ci est non seulement plus marquée, mais son délai d'apparition après l'injection de la suspension bacillaire est beaucoup plus court. Ce sont bien les caractéristiques d'une réaction immunitaire de type secondaire. On considère habituellement, à la suite des travaux de MacKanness (1), que l'action immunostimulante du B.C.G. met en jeu un processus se déroulant en deux temps : durant le 1^{er} temps, les lymphocytes sensibilisés de l'organisme reconnaissent les antigènes bacillaires ; durant le 2^e temps, non spécifique, les lymphocytes sensibilisés ayant réagi avec l'antigène libèrent des produits de sécrétion qui activent les macrophages. Des études récentes se sont efforcées de préciser les rôles des différents types cellulaires impliqués dans ces réactions. Un traitement préalable de l'organisme par un sérum antithymocyte est en mesure d'abolir le pouvoir immunostimulant du B.C.G., confirmant l'importance du rôle joué par les lymphocytes T (3). D'autre part, des macrophages obtenus à partir d'organismes traités par le B.C.G. sont en mesure de tuer les schistosomules de *S. mansoni in vitro*, confirmant leur rôle de cellules effectrices. Le mécanisme par lequel les macrophages tuent le parasite est encore imparfaitement connu ; il met probablement en jeu des facteurs solubles qui ont pu être retrouvés dans les surnageants des cultures *in vitro* (6). Il est probable que la mise en jeu de lymphocytes sensibilisés n'est pas la seule voie d'activation des macrophages : en effet, à la suite d'une primo-inoculation de B.C.G. un état de résistance non spécifique est décelable dès les premiers jours suivant l'inoculation du bacille, avant qu'un état d'hypersensibilité retardée puisse s'être développé. De plus, une immunostimulation peut aussi être observée chez des souris Nude dépourvues de lymphocytes T (12).

Bibliographie

1. Blanden R. V., Lafford M. J., MacKanness G. B. (1969) : The host response to Calmette-Guerin Bacillus infection in mice. *J. Exp. Med.*, 129, 1079-1107.

2. Bout D., Dupas H., Carlier Y., Afchain D., Capron A. (1977): High resistance induced by young live *Bacillus Calmette-Guérin* (B.C.G.) to *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 128, 811-816.
 3. Civil R.H., Mahmoud A.A.F. (1977): A role for thymocytes in B.C.G. induced resistance to *Schistosoma mansoni* infection. *Fed. Proc.*, 36, 1057.
 4. Fauve R.-M., Dodin A. (1976): Influence d'une réaction inflammatoire provoquée par le B.C.G. ou par un irritant non biodégradable sur la résistance des Souris à la bilharziose. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 282, 131-134.
 5. Lagrange P.-H. (1979): Le B.C.G. et les cellules effectrices de la réponse immunitaire. *Med. Mal. Infec.*, 9, 4-10.
 6. Mahmoud A.A.F., Peters A.S., Civil R.H., Remington J.S. (1979): *In vitro* killing of *Schistosoma mansoni* by B.C.G. and *C. parvum*-activated macrophages. *J. Immunol.*, 122, 1655-1657.
 7. Mathe G. (1976): Immunothérapie active des cancers. *Expansion Scientifique Française* Edit., Paris, 1 vol.
 8. Miller P., Wilson R. A. (1978): Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. *Parasitology*, 77, 281-302.
 9. Scher A., MacKenzie P., Smithers S.R. (1974): Decreased recovery of invading parasites from the lung as a parameter of acquired immunity to schistosomiasis in the mouse. *J. Infect., Dis.*, 130, 626-633.
 10. Smithers S.R., Terry R. J. (1965): The infection of laboratory hosts with cercarial of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*, 55, 695-700.
 11. Smithers S.R., Terry R. J. (1976): The Immunology of schistosomiasis. in: *Adv. Parasitol.*, 14, 399-423.
 12. Tribouley J., Tribouley-Duret J., Appriou M. (1978): Influence du bacille de Calmette et Guérin (B.C.G.) sur la réceptivité de la Souris Nude vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 172, 902-904.
 13. Tribouley J., Tribouley-Duret J., Appriou M. (1979): Influence d'une réinfestation par le bacille de Calmette et Guérin (B.C.G.) sur la résistance non spécifique de la Souris vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*. *Pathol. Biol.* (sous presse).
-