ÉTUDE PAR LA RÉACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE DES ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

VI. Immunolocalisation d'un épitope glucidique aux différents stades évolutifs

BEN YOUNES R.*, LEJOLY-BOISSEAU H.*, APPRIOU M.***, TRIBOULEY-DURET J.** & TRIBOULEY J.*

Summary : STUDY OF FLUORESCENT ANTIBODIES DIRECTED AGAINST THE GUT EPITHELIUM OF *SCHISTOSOMA MANSONI*.

VI. IMMUNOLocalISATION OF A CARBOHYDRATE EPIOTOPE AT THE DIFFERENT STAGE OF THE PARASITE EVOLUTION

In the course of previous works, we described an IgM monoclonal antibody directed to a carbohydrate epitope located on the gut epithelium surface of the *Schistosoma mansoni* adult worm. We provided evidence that this epitope was present in all stages of the parasite and was particularly abundant in eggs. The current work was performed in order to specify the epitope localisation, at each stage, by immunohistochemical techniques. The epitope appears to be located on the peripheral membranes of the adult worm, while it is produced by the alive miracidium in the eggs located in the tissues and subsequently spread out inside the periovular granuloma. Moreover, in adult worms, the observed structure presents itself as a soluble form in organic solvents; on the other hand, in eggs, the epitope was essentially found made of an hydrosoluble substance. These datas can explain why, in experimentally infected mice, the epitope is mainly determined in urines at the sixth week of infestation, when eggs are settled down in the tissues. Besides, the inhibition of the monoclonal antibody fixation by a pentose which contains the Lewis X antigen, pointed out that the carbohydrate structure recognised by the monoclonal antibody could be the Lewis X antigen or a very closed structure.

KEY WORDS : *Schistosoma mansoni*, carbohydrate epitope, monoclonal antibody, immunohistology, Lewis X antigen.

Résumé :

Au cours de travaux antérieurs, nous avons isolé une IgM monoclonale de type lambda dirigée contre un épitope glucidique localisé à la surface de l'épithélium intestinal du ver adulte de *Schistosoma mansoni*. Nous avons montré que cet épitope, présent à tous les stades évolutifs, était particulièrement abondant au niveau de l'œuf du parasite. Le présent travail nous a permis de préciser la localisation de l'épitope au niveau des différents stades évolutifs par la mise en œuvre de techniques immunohistochimiques. Il apparaît en particulier que chez le ver adulte, l'épitope se localise au niveau des membranes périphériques, tandis que, dans l'œuf, il est abondamment excrété par le miracidium et diffuse dans les tissus de l'hôte. De plus, chez le ver adulte, l'épitope se présente sous la forme d'une structure soluble dans les solvants organiques, alors que, dans l'œuf, il se présente sous la forme d'une molécule hydrosoluble. Ces données permettent de mieux comprendre pourquoi, chez la souris expérimentalement infestée, l'épitope ne peut être détecté dans les urines à des taux importants qu'à partir de la sixième semaine après l'infestation, moment où les œufs commencent à être déposés dans les tissus. Par ailleurs, l'inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal par un pentose contenant l'antigène Lewis X fait apparaître que la structure glucidique reconnue par l'anticorps monoclonal pourrait être l'antigène Lewis X ou une structure très proche.

MOTS CLÉS : *Schistosoma mansoni*, épitope glucidique, anticorps monoclonal, immunomarquage, antigène Lewis X.

INTRODUCTION

Des études antérieures sur les antigènes de l'épithélium intestinal de *Schistosoma mansoni* à l'aide de la réaction d'immunofluorescence nous avaient permis de sélectionner un anticorps monoclonal d'isotype IgM dirigé contre un épitope glucidique du parasite et de préciser ses propriétés effectrices. De plus, des essais préliminaires effectués sur différents extraits du parasite avaient montré que l'épitope glucidique étudié était présent au niveau des différents stades évolutifs du schistosome (Appriou et coll., 1986).

* Laboratoire d'Immunologie et Biologie Parasitaire, Université Victor Segalen Bordeaux II, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex.

** Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex.

Correspondance : H. Lejoly-Boisseau. Tél. : (33) 5 57 57 16 41.

Le but du présent travail est de préciser la localisation de l'épitope au niveau de ces différents stades par la mise en œuvre des méthodes immunohistochimiques. La structure de l'épitope ainsi que la nature de la molécule porteuse de l'épitope au niveau des différents stades seront également envisagées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PRÉPARATION DES DIFFÉRENTS STADES PARASITAIRES

Les différents stades évolutifs du parasite sont obtenus à partir de la souche LE Belo Horizonte de *Schistosoma mansoni* entretenue au laboratoire sur hamster doré, le mollusque *Biomphalaria glabrata* servant d'hôte intermédiaire. Les vers adultes sont obtenus par perfusion du système porte du hamster, 6 semaines après l'infestation, suivant une technique dérivée de celle de Radke (Radke et coll., 1961). Les

œufs sont observés sur coupes de foies de hamsters infestés. Les miracidiums sont obtenus à partir d'une suspension d'œufs purifiée, préparée par centrifugation d'un broyat de foies de hamsters infestés contre une barrière de densité constituée par une solution de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals) à 20 % suivant un protocole que nous avons déjà décrit (Baltz et coll., 1982); les œufs, soigneusement lavés, sont mis à éclore dans 3 à 4 ml d'eau déchlorée, sous lumière artificielle à 27°C pendant 30 minutes. Une suspension de cercaires est obtenue à partir de mollusques infestés 4 à 6 semaines auparavant et concentrée sur un filtre de nitrate de cellulose de 3 mm de porosité (Sartorius). Les schistosomules de 3 heures sont préparées par passage de cercaires à travers un fragment de peau de souris selon la méthode de Clegg et Smithers (1972) et les schistosomules de 5 jours à partir de poumons de souris infestées par balnéation 5 jours au préalable, selon la technique de Sher et coll. (1974). Les sporocystes ont été observés sur coupes de mollusques massivement infestés (100 miracidiums par mollusque); les sporocystes primaires sont localisés au niveau du pied et des tentacules du mollusque 1 à 14 jours après l'infestation; les sporocystes-fils sont observés 14 à 42 jours après l'infestation au niveau de la partie antérieure de la glande digestive (Fournier & Théron, 1985).

PRÉPARATION DES DIFFÉRENTS ANTICORPS

L'anticorps monoclonal utilisé est un anticorps de classe IgM dirigé contre une structure antigénique glucidique de l'épithélium intestinal du ver adulte. Il est produit et purifié, suivant un protocole précédemment décrit, à partir d'un hybridome sélectionné et entretenu au laboratoire (Appriou et coll., 1986, 1989). L'IgM monoclonale est couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine suivant la technique de Morelec (1977) et à la peroxydase suivant la technique d'Avrameas (Avrameas & Ternynck, 1971).

Deux conjugués sont utilisés par ailleurs : des IgG dirigées contre l'anticorps monoclonal, produites par immunisation d'un lapin, et purifiées par chromatographie échangeuse d'ions sur une suspension de DEAE-Sephacel (Pharmacia). Les IgG ainsi obtenues sont couplées à la peroxydase comme précédemment. Le deuxième conjugué est un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Diagnostics Pasteur).

TECHNIQUES DE LOCALISATION DE L'ÉPITOPE ÉTUDIÉ AU NIVEAU DES DIFFÉRENTS STADES ÉVOLUTIFS DU PARASITE

La localisation de l'épitope étudié au niveau des différents stades évolutifs du parasite a été déterminée au moyen d'une réaction d'immunofluorescence directe et

par révélation immunoenzymatique. Ces réactions immunohistochimiques ont été réalisées sur des coupes à la paraffine des différents stades évolutifs du parasite (ver adulte, cercaire, miracidium, schistosomule), sur des coupes de mollusque infesté (observation des sporocystes) et sur des coupes de foie de hamster infesté (organe riche en œufs). Les échantillons sont traités selon les méthodes de l'histologie classique. Des coupes de 2 µm d'épaisseur sont réalisées. La réaction d'immunofluorescence directe est pratiquée sur ces coupes à l'aide de l'anticorps monoclonal conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine en présence de bleu d'Evans. La révélation immunoenzymatique utilisée est la technique à la peroxydase décrite par Heyderman (1979) : après une étape de trypsinisation et une étape d'inhibition de la peroxydase endogène, les coupes sont incubées avec l'anticorps monoclonal; puis sont appliqués l'IgG de lapin dirigée contre l'anticorps monoclonal et l'anticorps anti-IgG de lapin, ces deux derniers anticorps étant couplés à la peroxydase; la fixation des conjugués marqués à la peroxydase est révélée par le 3-amino-9-éthyl-carbazole (AEC Kit, Vector Laboratories).

Par ailleurs, les structures glucidiques sont révélées, sur les coupes précédemment décrites, par une coloration à l'acide periodique de Schiff (PAS, Sigma).

ÉTUDE DE LA NATURE BIOCHIMIQUE DES MOLÉCULES PORTEUSES DE L'ÉPITOPE ÉTUDIÉ

Des extraits aqueux (bruts et délipidés) et des extraits lipidiques totaux de vers adultes et d'œufs sont préparés. Leur réactivité vis-à-vis de l'anticorps monoclonal est testée par une technique ELISA.

Les différents extraits sont préparés à partir de quantités égales des différents stades parasitaires. Les extraits aqueux sont obtenus par broyage au broyeur de Potter dans une solution de NaCl 0,15 M, le surnageant recueilli après centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes constituant l'antigène aqueux brut. Les extraits aqueux délipidés sont préparés par la technique de délipidation à l'alcool-éther de Pautrizel et coll. (1963). Les extraits lipidiques sont obtenus selon la méthode au méthanol/chloroforme de Folch et coll. (1957).

Les extraits aqueux sont testés par la technique ELISA. Les structures glucidiques hydrosolubles se fixant mal ou ne se fixant pas sur le polystyrène, chaque extrait est couplé au préalable à de l'albumine bovine méthylée (Sigma) suivant la technique de Vos (Vos et coll., 1979) puis dilué en tampon carbonate pH = 9,6 (1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1 000, 1/5 000, 1/10 000). Chaque dilution est fixée sur des plaques de polystyrène à fond plat. Leur fixation est révélée par l'IgM monoclonale conjuguée à la peroxydase. Le substrat chromogène, témoin de la fixation de l'anticorps conjugué est l'orthophénylène diamine. Les den-

sités optiques sont mesurées au spectrophotomètre à 495 nm.

Les extraits lipidiques sont testés par la technique ELISA de Buehler et coll. (1987). Chacun des différents extraits est dilué au 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1 000, 1/5 000, 1/10 000 dans un mélange méthanol/eau (80 : 20). Chaque dilution est distribuée dans des puits d'une plaque de polystyrène à fond plat. La plaque est laissée 1 heure à la température du laboratoire en évitant le séchage complet. Les sites encore libres sur le plastique sont bloqués par addition d'albumine bovine à 2 %. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites précédemment.

INHIBITION DE LA FIXATION DE L'ANTICORPS MONOCLONAL SUR SON ÉPITOPE CIBLE PAR UN HAPTÈNE

Le pouvoir inhibiteur du lacto-N-fucopentaose III est mis en évidence par un test ELISA. Un extrait antigénique ovulaire aqueux, couplé à l'albumine bovine méthylée, dilué en tampon carbonate pH = 9,6 est fixé sur une plaque de polystyrène. Un mélange à parties égales de lacto-N-fucopentaose III (Sigma) à différentes concentrations (2, 5, 10, 20, 50, 100 et 200 µg/ml) et d'IgM monoclonale couplée à la peroxydase et diluée à 0,06, 0,12, 0,25 et 0,5 µg/ml est rajouté. La réaction est révélée par l'orthophénylène diamine. La pourcentage d'inhibition du lacto-N-fucopentaose III est calculé en comparant les valeurs des densités optiques obtenues à celles données par la même concentration du conjugué IgM-peroxydase en l'absence de l'haptène.

ÉVOLUTION DE L'ÉPITOPE ÉTUDIÉ AU NIVEAU DU FOIE ET DES URINES DE L'HÔTE

Deux lots de souris sont infestés par voie sous-cutanée avec 50 cercaires par animal. Avant infestation et toutes les semaines après l'infestation jusqu'à la huitième semaine, trois souris de l'un des lots sont autopsiées et les foies sont prélevés après perfusion, broyés au broyeur de Potter en NaCl 0,15M à raison de 1 ml/g de foie et centrifugés pendant 10 minutes à 3 000 g. Les urines des souris du second lot sont recueillies individuellement avant l'infestation puis toutes les semaines pendant 9 semaines après l'infestation.

La technique de titrage utilisée est une réaction d'inhibition de l'hémagglutination passive mise en œuvre à l'aide de globules rouges de mouton sensibilisés par un extrait ovulaire de *S. mansoni*. La réaction est effectuée sur les échantillons à tester dilués de 1/2 en 1/2, le titre en antigène étant exprimé par la dernière dilution donnant encore lieu à une réaction positive.

RÉSULTATS

LOCALISATION DE L'ÉPITOPE ÉTUDIÉ AU NIVEAU DES DIFFÉRENTS STADES ÉVOLUTIFS DU PARASITE

Chez le ver adulte, l'épitope est localisé au niveau des microvillosités et des cellules épithéliales qui forment la paroi intestinale. Cet épitope est également retrouvé au niveau du tégument (fig. 1) dans la membrane basale et la membrane externe séparées par un espace clair contenant des inclusions légèrement immunoréactives. De plus, on note également la présence de cet épitope au niveau du parenchyme sous forme de sillons qui traversent la couche musculaire du parasite, lui donnant un aspect en « nid d'abeille », et atteignent ensuite le tégument (fig. 2). Des structures de nature glucidique sont d'ailleurs mises en évidence par le réactif de Schiff qui colore les coupes de vers adultes en totalité mais avec une plus forte intensité au niveau de l'épithélium intestinal et du tégument.

Sur les coupes de miracidium, l'épitope a pu être mis en évidence au niveau des glandes latérales de sécrétion et plus précisément au niveau de leurs granules tandis que la coloration au PAS de ces mêmes coupes montre la présence de structures glucidiques au niveau des glandes latérales et apicale, au niveau du tégument ainsi qu'au niveau des structures internes du miracidium à l'exception des cellules germinales et du centre nerveux. Dans les granulomes centrés par des œufs, l'épitope est retrouvé à la périphérie du miracidium et sur la face interne de la coque de l'œuf sous forme d'un fin liseré (fig. 3). Parfois, il est observé de façon plus diffuse dans l'espace libre séparant le miracidium de la coque. Il est également détecté autour de l'œuf dans la réaction inflammatoire (fig. 4). Le réactif de Schiff révèle également la présence de structures glucidiques dans l'espace libre séparant le miracidium de la coque de l'œuf et, dans certains cas, autour de l'œuf centrante la réaction inflammatoire. Une intense fluorescence peut être observée au niveau de la fente de la coque d'œufs isolés d'où émerge le miracidium comme si celui-ci abandonnait une certaine quantité de matière particulièrement riche en antigène (fig. 5). Les sporocystes primaires ne sont pas immunoréactifs tandis que chez les sporocystes-fils cercariogènes, l'épitope étudié est mis en évidence au niveau des glandes de pénétration des cercaires mûres et sur la paroi interne de la cavité des sporocystes-fils (fig. 6). La coloration au PAS montre une distribution des structures glucidiques identique à celle de l'épitope.

La cercaire ne présente aucun marquage sur le tégument et la partie caudale. Mais sur les coupes longitudinales de la portion céphalique, l'épitope est

Figures 1 à 8. — Immunomarquage réalisé sur les différents stades parasitaires à l'aide de l'anticorps monoclonal. Fig. 1 et 2 : révélation immunoenzymatique sur coupe de ver adulte; marquage au niveau de l'épithélium intestinal (fig. 1); marquage au niveau du tégument, sur les membranes externe et basale, et au niveau des connexions cytoplasmiques traversant la couche musculaire. Fig. 3 et 4 : réaction d'immunofluorescence directe sur coupe de foie de hamster infesté; marquage diffusant largement au sein de la réaction inflammatoire péri-ovulaire. Fig. 5 : réaction d'immunofluorescence directe réalisée sur un œuf isolé après éclosion; une importante fluorescence est localisée au niveau de la fente de l'enveloppe d'où a émergé le miracidium. Fig. 6 : révélation immunoenzymatique réalisée sur coupe de sporocystes; marquage des glandes de pénétration des cercaires mûres et de la paroi interne des cavités des sporocystes. Fig. 7 : réaction d'immunofluorescence directe réalisée sur des schistosomules cutanées de 3 heures; une fluorescence continue et uniforme est observée à la surface. Fig. 8 : révélation immunoenzymatique réalisée sur coupe de cercaire; marquage de la portion céphalique au niveau des glandes de pénétration.

retrouvé au niveau des granules des glandes de pénétration : glandes postacétabulaire, préacétabulaire et céphalique (ou glande apicale) (fig. 8). Sur certaines coupes, les canaux excréteurs des glandes acétabulaires apparaissent marqués. La coloration au PAS met en évidence une même distribution des structures glucidiques.

Les coupes de schistosomules cutanées et pulmonaires montrent un immunomarquage uniforme du tégument. Chez la schistosomule de 3 heures, l'épitope est également retrouvé au niveau des glandes de pénétration. Chez la schistosomule de 5 jours, c'est l'ébauche du tube digestif qui est réactif. Lorsque la réaction est effectuée sur des schistosomules en suspension, l'immunomarquage est continu et uniforme chez toutes les schistosomules de 3 heures et inconstant chez les schistosomules de 5 jours : certaines sont totalement négatives tandis que pour d'autres, l'épitope peut être détecté à la surface mais de façon plus ou moins discontinue (fig. 7).

RÉACTIVITÉ DE L'ANTICORPS

VIS-À-VIS DES DIFFÉRENTS EXTRAITS PARASITAIRES

L'étude comparée des extraits aqueux de vers adultes et d'œufs montre que ces deux types d'extraits n'ont pas la même réactivité : l'extrait ovulaire brut réagit jusqu'à la dilution de 1/5 000 avec l'anticorps monoclonal alors que l'extrait brut de ver adulte n'est réactif que jusqu'à la dilution au 1/100. La réactivité des extraits bruts ovulaires est donc beaucoup plus forte que celle des extraits de vers adultes et elle se maintient pour l'essentiel après délipidation (fig. 9A et 9B). L'étude de la réactivité de l'extrait lipidique ovulaire

met en évidence une réactivité très faible, l'extrait ne réagissant pas au-delà du 1/10, alors que l'extrait lipidique de vers adultes conserve encore une forte réactivité jusqu'à la dilution au 1/100 (fig. 9C).

RÉACTION D'INHIBITION DU TEST ELISA PAR L'HAPTÈNE

Le lacto-N-fucopentaose III est capable d'inhiber, de façon dose dépendante, la fixation de l'anticorps monoclonal sur son épitope cible comme le montrent les résultats rapportés sur la figure 10.

ÉVOLUTION DE L'ÉPITOPE ÉTUDIÉ AU NIVEAU DU FOIE ET DES URINES DE L'HÔTE

Les résultats rapportés sur la figure 11 montrent que les antigènes hépatiques et urinaires évoluent de façon parallèle, l'antigène d'origine hépatique apparaissant plus précocement. Ces antigènes ne sont détectables à des taux importants qu'à partir de la sixième semaine.

DISCUSSION

Au cours de travaux antérieurs, nous avons isolé une IgM monoclonale de type lambda dirigée contre un épitope glucidique localisé à la surface de l'épithélium intestinal du ver adulte de *Schistosoma mansoni*. Cet épitope s'est avéré être également présent à tous les stades évolutifs du parasite, et c'est dans l'œuf qu'il est le plus abondant (Appriou et coll., 1986). La mise en jeu des méthodes immunohistochimiques nous a permis de préciser la localisation

Fig. 9. — Comparaison de la réactivité des extraits antigéniques vis-à-vis de l'anticorps monoclonal par le test ELISA (A : extraits aqueux bruts ; B : extraits aqueux délipidés ; C : extraits lipidiques). Les extraits sont testés non dilués, dilués au 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1 000, 1/5 000 et au 1/10 000.

Fig. 10. — Inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal (AcM) par le lacto-N-fucopentaose III (LNFP III) par un test ELISA. Le LNFP III est testé aux concentrations de 2, 5, 10, 20, 50, 100 et 200 µg/ml et l'anticorps monoclonal aux concentrations de 0,06, 0,12, 0,25, et 0,5 µg/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition.

sation de cet épitope au niveau des différents stades. Chez le ver adulte, la localisation au niveau de la paroi intestinale a pu être précisée par les techniques immuno-enzymatiques, plus sensibles que la technique d'immunofluorescence directe; en effet, on observe un marquage au niveau des microvillosités et à l'intérieur des cellules épithéliales, ce qui permet de suggérer que la structure est synthétisée à ce niveau. Les techniques immuno-enzymatiques ont également permis de mettre en évidence une localisation en périphérie du ver se répartissant en deux zones parallèles séparées par un espace clair. Le tégument syncytial qui borde le ver adulte de schistosome est formé de deux membranes : une membrane interne ou membrane basale formée d'une bicouche lipidique classique et une membrane externe qui présente une structure heptalaminée formée de deux bicouches lipidiques apposées l'une à l'autre. Cette structure heptalaminée serait une adaptation à l'habitat intravasculaire (McLaren, 1980). Le marquage est localisé au niveau des membranes interne et externe du tégument. Le marquage en « nid d'abeille » de la couche musculaire du parasite correspond à une localisation de l'épitope au niveau des connexions cytoplasmiques entre le tégument syncytial et les corps cellulaires localisés sous la couche musculaire.

Le marquage périphérique au niveau du tégument est également mis en évidence chez la schistosomule, mais n'est observé sur aucun des autres stades évolu-

Fig. 11. — Évolution en fonction du temps des taux d'antigène parasite retrouvé dans les urines et les foies de souris infestées par *Schistosoma mansoni*. La détection est faite par inhibition de l'hémagglutination passive par l'anticorps monoclonal. Les chiffres rapportés correspondent à des valeurs moyennes calculées à partir de trois souris.

tifs. La présence de l'épitope en périphérie pourrait correspondre à la formation d'un tégument heptalaminé puisque seuls vers adultes et schistosomules présentent ce type de tégument qui se met en place très rapidement après la pénétration transcutanée (McLaren, 1980). Le marquage intestinal apparaît chez la schistosomule de 5 jours au niveau de l'ébauche du tube digestif.

Chez la cercaire, c'est au niveau des glandes de pénétration que l'épitope est localisé, où le marquage est observé au niveau des granules et des canaux excréteurs; ce marquage au niveau des glandes de pénétration est encore visible après pénétration transcutanée chez la schistosomule de 3 heures.

Chez le miracidium, l'épitope est localisé au niveau des granules des glandes de sécrétion. Il est vraisemblable qu'il soit synthétisé par ces glandes. Puis il est excrété par le miracidium et s'accumule à l'intérieur de la coque de l'œuf, dans l'espace libre entre la larve et la coque avant d'être excrété à travers les pores de la coque et de diffuser largement dans le granulome inflammatoire périovulaire.

Il est à noter que la réalisation en parallèle de la coloration au PAS des structures glucidiques, effectuée sur des coupes des différents stades évolutifs du parasite, montrent que l'épitope étudié est toujours localisé au niveau des structures PAS positives, confirmant la nature glucidique de l'épitope.

Cette étude de la localisation précise de l'épitope glucidique réalisée au niveau des différents stades évolutifs, en particulier chez les stades hébergés par l'hôte définitif (ver adulte et œuf), fait apparaître que, chez le ver adulte, l'épitope est localisé au niveau des membranes périphériques, tandis que, chez l'œuf, il est abondamment excrété par le miracidium et diffuse dans les tissus. Nous avons par ailleurs montré que cette structure glucidique peut être mise en évidence dans les urines d'hommes atteints de bilharziose à *S. mansoni* (Ripert et coll., 1988). Une analyse plus précise de l'évolution en fonction du temps de l'épitope dans les urines et le foie, réalisée chez la souris, nous permet d'observer que ce n'est qu'à partir de la sixième semaine après l'infestation que l'antigène est détectable à des taux importants, la sixième semaine correspondant au moment où les œufs commencent à être déposés dans les tissus. L'épitope glucidique reconnu par l'anticorps monoclonal se présente donc sous deux formes fort différentes chez le ver adulte et l'œuf, ce qui est confirmé par l'étude de la réactivité de l'anticorps monoclonal vis-à-vis de différents extraits antigéniques : chez l'œuf ce sont les extraits aqueux qui sont les plus réactifs tandis que chez le ver adulte ce sont les extraits par les solvants organiques qui présentent la plus forte réactivité. Cette observation est à rapprocher des résultats rapportés dans la littérature. C'est ainsi que la présence d'épitopes glucidiques portés par des glycolipides à la surface des vers adultes a pu être mise en évidence par l'utilisation de différents anticorps monoclonaux (Makaaru et coll., 1992); d'autre part, un même épitope glucidique peut être porté à la fois par un glycolipide et une glycoprotéine; en effet, des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes glucidiques portés par des glycoprotéines sont capables de donner des réactions croisées avec des extraits glycolipidiques de parasite (Weiss et coll., 1986; Makaaru et coll., 1992). La présence de glycolipides immunogènes a été rapportée pour différents stades évolutifs du parasite, en particulier pour les vers adultes et les œufs (Leverly et coll., 1992). Les anticorps monoclonaux ont par ailleurs permis de caractériser de très nombreux antigènes; il s'est avéré que, dans la majorité des cas, ces anticorps reconnaissent des épitopes qui sont présents sur plusieurs, voire sur tous les stades évolutifs du parasite. Les anticorps monoclonaux décrits comme étant dirigés à la fois contre des épitopes communs à l'épithélium digestif et à l'œuf sont le plus souvent de classe IgM et il est à noter d'autre part que ces épitopes sont habituellement de nature glucidique (Pujol et coll., 1993; Van Dam et coll., 1993). Ce type d'anticorps monoclonaux de classe IgM présente le plus souvent une activité bloquante vis-à-vis de la mise en place d'une immunité protectrice (Grzych et coll., 1984; Yi et coll., 1986; Dunne

et coll., 1987). C'est ce que nous avons mis en évidence avec l'anticorps monoclonal pour lequel une activité bloquante vis-à-vis des schistosomules avait pu être établie (Appriou et coll., 1989). L'abondance des structures glucidiques en surface les rend particulièrement accessibles au système immunitaire de l'hôte; d'autre part, les glucides d'origine ovulaire stimulent eux aussi le système immunitaire de l'hôte (Newport et coll., 1993). Il apparaît que l'abondance des œufs déposés chaque jour dans les tissus dès la phase aiguë libère dans l'organisme une grande quantité de glucides qui met en jeu précocement la réponse immunitaire de l'hôte. Il est connu par ailleurs que les polysaccharides sont des antigènes T indépendants, qui provoquent l'apparition d'isotypes essentiellement de classes IgM et IgG2 qui bloqueraient la mise en place d'une immunité protectrice (Khalife et coll., 1986). Il a été observé que le titre des anticorps bloquants diminue avec l'âge chez l'homme, de même que les taux d'anticorps dirigés contre les glucides (Simpson et coll., 1989; Simpson, 1990). Plus l'infection évolue vers la chronicité et plus l'hôte régulerait ou perdrait cette réponse immune dirigée contre les glucides. Les glucides pourraient donc jouer le rôle d'antigènes protecteurs pour le parasite par détournement du système immunitaire de l'hôte.

La structure de l'épitope glucidique reconnu par l'anticorps monoclonal a pu être également abordée au cours de ce travail. En effet, la fixation de l'anticorps monoclonal est inhibée de manière spécifique par un pentose, le lacto-N-fucopentaose III, qui contient l'antigène Lewis X, ou haptène X, ou CD15. Le Lewis X est un triose, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNac, structure biochimiquement proche de l'antigène de groupe sanguin Le^a. Il s'agit d'un isomère de position dépourvu d'activité Le^a (Salmon et coll., 1991). Cette molécule est présente à la surface des granulocytes. Cette spécificité est également retrouvée chez un glycolipide, l'antigène SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) ainsi que chez certaines lignées tumorales (tératocarcinomes murins, quelques lignées tumorales humaines). Une α 1-3Fucosyltransférase a été mise en évidence chez le schistosome adulte (De Bose-Boyd et coll., 1996) lui permettant de synthétiser l'antigène Lewis X sous forme de motifs répétés au sein de chaînes oligosaccharidiques (Srivastan et coll., 1992); d'autre part, des anticorps anti-Lewis X ont pu être mis en évidence chez des humains et des primates atteints de bilharziose à *S. mansoni* (Nyame et coll., 1996). L'anticorps monoclonal utilisé dans ce travail est dirigé contre un épitope glucidique à la fois présent chez le ver adulte et sécrété par l'œuf. Peu d'antigènes circulants d'origine ovulaire sont décrits dans la littérature chez les schistosomes. Les antigènes circulants les plus anciennement connus et les plus étudiés sont deux protéo-

glycanes isolés du tube digestif des vers adultes : CCA ou circulating cathodic antigen et CAA ou circulating anodic antigen (Deelder et coll., 1980); une fraction du CCA, également décrit sous le nom d'antigène M, a été mis en évidence dans les urines d'individus infectés (Carlier et coll., 1975). Le CCA est formé de chaînes polysaccharidiques répétant le motif Lewis X (Van Dam, 1994). L'IgM monoclonale isolée dans notre laboratoire présente des réactions croisées avec certains anticorps monoclonaux anti-CCA développés par l'équipe de Deelder (Van Dam, 1995). Il est donc envisageable que l'épitope glucidique reconnu par l'IgM monoclonale isolée au laboratoire soit cette structure Lewis X. Le rôle des anticorps anti-Lewis X serait également un rôle de détournement du système immunitaire de l'hôte en agissant directement sur les granulocytes circulants provoquant leur lyse après fixation du complément (Ko et coll., 1990; Van Dam et coll., 1996).

En conclusion, l'antigène Lewis X serait présent chez le ver adulte de *S. mansoni* au niveau de l'épithélium digestif et du tégument syncytial périphérique, tandis que chez l'œuf, il est excrété de manière abondante sous une forme hydrosoluble qui est détectée dans les urines de l'animal infesté à partir de la sixième semaine.

RÉFÉRENCES

- APPRIOU M., BEN YOUNES R., TRIBOULEY-DURET J. & TRIBOULEY J. Étude par la réaction d'immunofluorescence des anticorps dirigés contre les antigènes de l'épithélium intestinal de *Schistosoma mansoni*, IV. Étude du pouvoir bloquant sur l'immunité d'un anticorps monoclonal de classe IgM. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1989, 64, 456-468.
- APPRIOU M., TRIBOULEY-DURET J. & TRIBOULEY J. Étude par la réaction d'immunofluorescence des anticorps dirigés contre les antigènes de l'épithélium intestinal de *Schistosoma mansoni*, III. Étude de la réactivité d'un anticorps monoclonal. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1986, 61, 435-446.
- AVRAMEAS S. & TERNYNCK T. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry*, 1971, 8, 1175-1179.
- BALTZ T., LACASSIE I., TRIBOULEY-DURET J. & TRIBOULEY J. Density gradient separation of *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Parasitology*, 1982, 658, 963-965.
- BUEHLER J., GALILI U. & MACHER B.A. Use of enzyme-linked immunosorbent assay to monitor the purification of glycosphingolipid antigens by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1987, 164, 521-525.
- CARLIER Y., BOUT D., BINA J. C., CAMUS D., FIGUEIREDO J.F.M. & CAPRON A. Immunological studies in human schistosomiasis, I. Parasitic antigen in urine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1975, 24, 949-954.
- CLEGG J.A. & SMITHERS S.R. The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 1972, 2, 79-98.
- DE BOSE-BOYD R., NYAME A.K. & CUMMINGS R.D. *Schistosoma mansoni*: Characterisation of an α 1-3Fucosyltransferase in adult parasites. *Experimental Parasitology*, 1996, 82, 1-10.
- DEELDER A.M., KORNELIS D. & VAN MARCK E.A.E. *Schistosoma mansoni*: characterisation of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. *Experimental Parasitology*, 1980, 50, 16-32.
- DUNNE D.W., BICKLE Q.D., BUTTERWORTH A.E. & RICHARDSON B.A. The blocking of human antibody-dependant, eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by monoclonal antibodies which cross-react with a polysaccharide-containing egg antigen. *Parasitology*, 1987, 94, 269-280.
- FOLCH J., LEES M. & SLOANE STANLEY G.H. A single method for the isolation and purification of total lipids on animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226, 497-509.
- FOURNIER A. & THERON A. Sectorisation morphoanatomique et fonctionnelle de sporocystes-fils de *S. mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1985, 71, 325-336.
- GRZYCH J.M., CAPRON M., DISSOUS C. & CAPRON A. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology*, 1984, 133, 998-1004.
- HEYDERMAN E. Immunoperoxidase technics in histopathology: application methods and controls. *Journal of Clinical Pathology*, 1979, 32, 971-226.
- KHALIFE J., CAPRON M., GRZYCH J.-M., BUTTERWORTH A.E., DUNNE D.W. & OUMA J.H. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 1986, 164, 1626-1640.
- KO A.I., DRÄGER U.C. & HARN D.A. A *Schistosoma mansoni* epitope recognised by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1990, 87, 4159-4163.
- LEVERY S.B., WEISS J.-B., SALYAN M.E.K., ROBERTS C.E., HAKOMORI S.I., MAGNANI J.-L. & STRAND M. Characterisation of a series of novel Fucose-containing glycosphingolipid immunogens from eggs of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267, 5542-5551.
- MAKAARU C.K., DAMIAN R.T., SMITH D.F. & CUMMINGS R.C. The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesises a novel type of glycosphingolipid. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267, 2251-2257.
- MC LAREN D.J. The adult worm, in: *Schistosoma mansoni*: The Parasite Surface in Relation to Host Immunity. Mc Laren D.J. (ed), Research Studies Press, Chichester, 1980, 1-27.
- MORELEC M.J. Préparation d'un immunosérum fluorescent, in : Techniques de l'immunofluorescence et les réactions immunoenzymatiques. Cours de l'Institut Pasteur. Faure M., Dupouey P. & Morelec M.J. (eds), Maloine SA, Paris, 1977, 85-101.

- NEWPORT G.R. & COLLEY D.G. Schistosomiasis, *in*: Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. Warren K.S. (ed), Blackwell Scientific Publications, Boston, 1993, 401-402.
- NYAME A.K., PILCHER J.-B., TSANG V.C.W. & CUMMINGS R.D. *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le^x determinants on myeloid cells. *Experimental Parasitology*, 1996, 82, 191-200.
- PAUTRIZEL R., TRIBOULEY J. & DURET J. Diagnostic sérologique de la bilharziose à *Schistosoma mansoni* à l'aide d'une réaction de fixation du complément utilisant un antigène délipidé. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1963, 104, 502-510.
- PUJOL F.N., LIPRANDI F., ALARCON DE NOYA B., MATOS C. & CESARI M. Characterisation of mouse monoclonal antibodies against common and repeated epitopes of different developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *Tropical Medicine and Parasitology*, 1993, 44, 289-294.
- RADKE M.G., BERRIOS-DURAN L.A. & MORAN K. A perfusion procedure for recovery of schistosome worms. *Journal of Parasitology*, 1961, 47, 366-368.
- RIPERT C., COMBE A., DAULOUEDE S., APPRIOU M., TRIBOULEY-DURET J., TRIBOULEY J., MOYOU-SOMO R., SAME-EKOBO A. & AMBASSA P. Detection with a monoclonal antibody of an antigen, characteristic of the genus *Schistosoma*, excreted in the urine. *Tropical Medicine and Parasitology*, 1988, 39, 131-135.
- SALMON C., CARTRON J.P. & ROUGER P. Le système Lewis, *in* : Les groupes sanguins de l'homme. Salmon C., Cartron J.P. & Rouger P. (eds), Masson, Paris, 1991, 179-195.
- SHER A., MACKENZIE P. & SMITHERS S.R. Decreased recovery of invading parasite from the lungs as a parameter of acquired immunity to schistosomiasis in the laboratory mouse. *Journal of Infectious Diseases*, 1974, 130, 626-633.
- SIMPSON A.J.G. Schistosome surface antigens: developmental expression and immunological function. *Parasitology Today*, 1990, 6, 40-45.
- SIMPSON A.J.G., OMER ALI P., MEADOWS H.M., JEFFS S.A., HAGAN P. & SMITHERS S.R.E. *Schistosoma mansoni* surface proteins. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1989, 84, 179-187.
- SRIVASTAN J., SMITH D.F. & CUMMINGS R.D. The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesises glycoproteins containing the Lewis X antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267, 20196-20203.
- VAN DAM G.J., KORNELIS D., VAN ZEYL R.J.M., ROTMANS P. & DEELDER A.M. *Schistosoma mansoni*: analysis of monoclonal antibodies reactive with gut-associated antigens, *Parasitology Research*, 1993, 79, 55-62.
- VAN DAM G.J., BERGWERF A.A., THOMAS-OATES J.E., ROTMANS J.P., KAMERLING J.P., VLEGENTHART J.F.G. & DEELDER A.M. The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis X as repeating unit. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 225, 467-482.
- VAN DAM G.J., CLAAS F.H.J., YAZDANBAKHSH M., KRUISE Y.C.M., VANKEULEN A.C.I., FERREIRA S.I.M.F., ROTMANS J.P. & DEELDER A.M. *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis X epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependant lysis of granulocytes. *Blood*, 1996, 11, 4246-4251.
- VOS J.G., BUYS J., HANSTEDDE J.G. & HAGENAAS A.M. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and passive hemagglutination method for quantification of antibodies to liposaccharides and tetanus toxoid in rats. *Infection and Immunity*, 1979, 24, 798-803.
- WEISS J.-B., MAGNANI J.-L. & STRAND M. Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrates with glycoproteins. *Journal of Immunology*, 1986, 136, 4275-4282.
- YI X., OMER ALI P., KELLY C., SIMPSON A.J.G. & SMITHERS S.R. IgM antibodies recognizing carbohydrate epitopes shared between schistosomula and miracidia of *Schistosoma mansoni* that block *in vitro* killing. *Journal of Immunology*, 1986, 137, 3946-3954.

Reçu le 31 octobre 1996

Accepté le 29 janvier 1997