50376
1986
197

50376
1986
197

N° d'ordre 1367

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
CENTRE D'IMMUNOLOGIE ET DE BIOLOGIE PARASITAIRE

THESE

PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU
DOCTORAT DE 3ÈME CYCLE EN
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
PAR

ODILE ELMASMODI-ROESCH

CONTRIBUTION A LA RECHERCHE DE MOLECULES ASSOCIEES AU CONTROLE DE LA MATURATION ET DE LA DIFFERENCIATION SEXUELLES DE LA FEMELLE *SCHISTOSOMA MANSONI*.

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

LE 27 NOVEMBRE 1986, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

PRÉSIDENT : MR LE PROFESSEUR M. PORCHET
RAPPORTEUR : MR LE DOCTEUR G. TORPIER
MEMBRES : MR LE PROFESSEUR A. DHAINAUT
MR LE PROFESSEUR A. CAPRON

SCD LILLE 1
D 030 321855 6

50376
1986
197

Ce travail a été réalisé au Laboratoire du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, implanté à l'Institut Pasteur, rue du Professeur Calmette à Lille, sous la direction de **Monsieur le Professeur André CAPRON.** Je tiens à le remercier vivement pour l'aide qu'il m'a apportée tout au long de ce travail.

Je remercie **Monsieur Gérard TORPIER** de m'avoir acceptée dans son équipe et de m'avoir fait bénéficier de son expérience.

Je tiens également à remercier :

Monsieur M. PORCHET, Professeur à Lille I,

Monsieur A. DHAINAUT, Professeur à Lille I

de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement **Monsieur Pierre LEMAY et les membres du Laboratoire de Virologie,** unité INSERM 233, pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide technique dont j'ai bénéficié lors de mon stage.

Je remercie aussi **tous les membres du Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire** qui ont participé, de près ou de loin, à l'accomplissement de ce travail.

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I. CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE PARASITE *Schistosoma mansoni*

I.1. Cycle parasitaire 3

I.1.1. Ethologie de *Schistosoma mansoni* 3

I.1.2. Caractéristiques des différents stades évolutifs de *Schistosoma mansoni* 4

I.1.2. a- le miracidium 4
I.1.2. b- les sporocystes 5
I.1.2. c- les cercaires 7
I.1.2. d- les schistosomules 10
I.1.2. e- le schistosome adulte 10

I.2. Connaissances actuelles sur la biologie de reproduction du parasite 12

I.2.1. Description de l'appareil reproducteur des Schistosomes 12

I.2.1. a- description de l'appareil génital mâle 12
I.2.1. b- description de l'appareil génital femelle 15
I.2.1. c- définition génétique des mâles et femelles *Schistosoma mansoni* 18
I.2.1. d- comportement sexuel des schistosomes 19

I.2.2. Formation et description des oeufs 19

I.2.2. a- l'embryon 20
I.2.2. b- la coque de l'oeuf 20
I.2.2. c- ponte et maturation de l'oeuf 22

I.2.3. Maturation sexuelle 24

I.2.3. a- description du dysfonctionnement de l'appareil reproducteur femelle 24
I.2.3. b- rôle du mâle dans le développement de la femelle 26
I.2.3. c- nature du facteur de maturation 29
I.2.3. d- caractérisation de polypeptides marqueurs de maturation sexuelle 36

I.2.4. Conclusion 40

CHAPITRE II. RESULTATS - DISCUSSION

II.1. Analyse élecrophorétique des protéines totales des *Schistosoma mansoni* adultes mature et immature 42

II.1.1. Principes des techniques électrophorétiques utilisées 42
II.1.2. Analyse des protéines d'extraits totaux de schistosomes adultes provenant d'infestations bisexuée et monosexuée par l'électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une coloration à l'argent selon MORRISSEY (1981) 45
II.1.3. Analyse des protéines d'extraits totaux de schistosomes adultes par marquage métabolique avec de la Methionine S^{35} 47

II.1.4. Analyse électrophorétique des protéines d'extraits totaux d'oeufs de Schistosomes par coloration à l'argent 56

II.1.5. Analyse électrophorétique d'extraits totaux de schistosomules par coloration à l'argent 58

II.1.6. Conclusion des différentes analyses électrophorétiques réalisées 61

II.2. Recherche de mise en évidence de la phénolase chez la femelle au niveau des gels de polyacrylamide 62

II.3. Analyse immunologique à partir d'un transfert sur nitrocellulose des protéines totales d'adultes 62

II.3.1. Analyse des immunoblots obtenus à partir des 4 sources de protéines totales testées par rapport à l'immunsérum "anti-femelle bisexuée" 64

II.3.2. Analyse des immunoblots obtenus à partir des 4 sources de protéines totales testées par rapport à l'immunsérim "anti-mâle bisexué" 65

II.3.3. Analyse des immunoblots obtenus à partir des 4 sources de protéines totales testées par rapport à l'immunsérum "anti-femelle monosexuée" 66

II.3.4. Analyse des immunoblots obtenus à partir des 4 sources de protéines totales testées par rapport à l'immunsérum "anti-mâle monosexué" 67

II.3.5. Discussion des résultats immunologiques 70

II.4. Discussion générale 72

CHAPITRE III. APPENDICE TECHNIQUE

III.1. Infestations des animaux de laboratoire 77

III.2. Collecte des animaux 79

III.3. Solubilisation du matériel parasitaire 81

III.4. Marquage métabolique 82

III.5. Electrophorèses 83

III.5.1. Focalisation isoélectrique 83

III.5.2. En présence de S.D.S. 84

III.6. Analyse des gels 86

III.6.1. Coloration au bleu de Comassie 86

III.6.2. Coloration par l'argent 86

III.6.3. Autoradiographie 86

III.6.4. Immunoblotting 87

III.7. Obtention des immuns sérums 88

CHAPITRE IV. BIBLIOGRAPHIE 89

La schistosomiase est l'une des plus importantes endémies parasitaires dans le monde : elle touche surtout 73 pays tropicaux où le nombre de personnes infestées est estimé à 200 millions (note O.M.S., 1982). L'agent de cette parasitose est un trématode digénétique, de la famille des Schistosomatidae, de l'embranchement des Plathelminthes.

La compréhension de ce modèle d'infection parasitaire fait appel à trois données fondamentales :

-la complexité des cycles biologiques accomplis par le parasite au cours des divers stades de développement, chez l'hôte intermédiaire et l'hôte vertébré, conférant à chacun de ces stades une identité biologique et moléculaire particulière.

-l'extraordinaire capacité d'adaptation et de survie des parasites qui leur permet d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

-le fait que l'immunité protectrice consiste plus en une limitation de la réinfection qu'à l'élimination de la population parasitaire existante.

L'ensemble de ces données a amené les chercheurs du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, unité Inserm U167 - Equipe de recherche associée CNRS 422, implanté à l'Institut Pasteur de Lille et dirigé par le professeur André Capron, à développer parallèlement les investigations nécessaires à la compréhension des mécanismes effecteurs de l'immunité et à celle des stratégies de survie parasitaire.Entre autres, l'étude des mécanismes de

différenciation qui participent aux grands moments biologiques du parasite est importante ; l'étude des mécanismes de différenciation et de maturation sexuelles nous est notamment apparue essentielle, du fait que l'oeuf, source de pérennité de l'espèce, est aussi en grande partie responsable du degré de sévérité de la maladie.

Déjà, certains auteurs ont permis de montrer la nécessité de la présence du mâle pour une maturation normale de la femelle (Armstrong, 1965 ; Michaels, 1969 ; Erasmus, 1973 ; Popiel, Cioli et Erasmus, 1984). Par contre, la nature de cette stimulation reste toujours inconnue bien que de nombreuses hypothèses aient été formulées. En effet du point de vue moléculaire, la compréhension des mécanismes de reproduction s'est traduite par une tentative d'identification de molécules associées à ces contrôles par différentes techniques biochimiques. Personnellement, nous nous sommes intéressés à la définition moléculaire de polypeptides marqueurs de la différenciation et de la maturation sexuelles qui pourraient permettre d'envisager une dysrégulation de la reproduction du parasite.

Avant d'aborder les résultats de notre contribution à cette étude, nous présenterons le cycle du parasite en insistant plus précisément sur tous les éléments concernant la biologie de la reproduction du Schistosoma mansoni.

CHAPITRE I

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE PARASITE

SCHISTOSOMA MANSONI

I.1.CYCLE PARASITAIRE.

L'agent de la bilharziose intestinale et hépatosplénique est Schistosoma mansoni, Trématode de la famille des Schistosomatidae ; il présente comme beaucoup de parasites de nombreuses adaptations pour survivre dans un cycle qui implique obligatoirement et successivement deux hôtes, l'un dit hôte intermédiaire, le mollusque d'eau douce Biomphalaria glabrata et l'autre dit hôte définitif nécessairement vertébré.

I.1.1.éthologie du parasite.

Les vers adultes dont la durée de vie peut atteindre 20 ans vivent dans les ramifications de la veine porte. Les femelles gravides migrent vers les capillaires mésentériques où s'effectue la ponte.

Les oeufs pourvus d'un éperon latéral traversent la paroi intestinale pour tomber dans la lumière intestinale et être rejetés avec les fécès.

Au moment de la ponte, les oeufs sont embryonnés mais n'éclosent qu'en présence d'eau douce et à une température de 30°C. On observe alors la libération d'un miracidium, forme de vie brève nageant très vite.

A ce stade, le cycle évolutif nécessite obligatoirement l'intervention d'un hôte intermédiaire de spécificité étroite : la planorbe, Biomphalaria glabrata.

Le miracidium pénètre au niveau des tentacules de la Planorbe pour migrer jusque dans l'hépatopancréas où il se transforme en sporocyste primaire.

Ce sporocyste produit à son tour des sporocystes fils (secondaires voire tertiaires) qui donnent naissance à des furcocercaires infestantes pour l'hôte vertébré.

Ces formes ultimes sont libérées du mollusque parasité, 30 jours à 40 jours après l'infestation selon une chronobiologie précise.

Les cercaires infestent activement l'hôte définitif par voie transcutanée, elles perdent alors leur partie caudale et se transforment en schistosomules.

Ceux-ci migrent vers les poumons (5ème jour) puis vers le foie (11ème jour) où ils deviennent matures. Vers le 40ème jour, les schistosomes sont adultes et le cycle peut se perpétrer de nouveau par une nouvelle ponte.

I.1.2.Caractéristiques des différents stades évolutifs de schistosoma mansoni.

I.1.2.a.le miracidium.

Le miracidium est muni de cils insérés sur quatre rangées de plaques épidermiques : ce revêtement facilite la nage en milieu aquatique.
Un intestin bilobé ou sacculaire non fonctionnel constitue l'appareil digestif.
L'appareil excréteur possède quatre cellules flammes.

Deux glandes débouchent par des conduits de part et d'autre de l'extrémité antérieure renflée. Elles produisent une enzyme semblable à celle présente chez la cercaire, ayant des propriétés lytiques permettant l'adhésion du miracidium au mollusque.
Le miracidium est mobile, doué de mouvements très vifs : dès sa sortie, il recherche l'hôte dans lequel il continuera son développement.

I.1.2.b.les sporocystes.

Chez l'hôte intermédiaire, le miracidium perd son revêtement cilié et subit une métamorphose régressive au cours de laquelle disparaissent la plupart des organes caractéristiques du miracidium.

Cette transformation aboutit à un sporocyste, sac de plusieurs centaines de microns,non mobile, contenant des cellules germinales disposées en rangées le long de la paroi (Olivier et Mao, 1949). En fait, ce sporocyste est rempli d'un jeune tissu probablement parenchymateux qui donne place à une cavité centrale ; on observe alors plusieurs couches cellulaires :

. la plus externe, un épithélium primitif en voie de dégénérescence qui forme l'assise cellulaire externe.

. une couche musculaire à fibres circulaires et longitudinales.

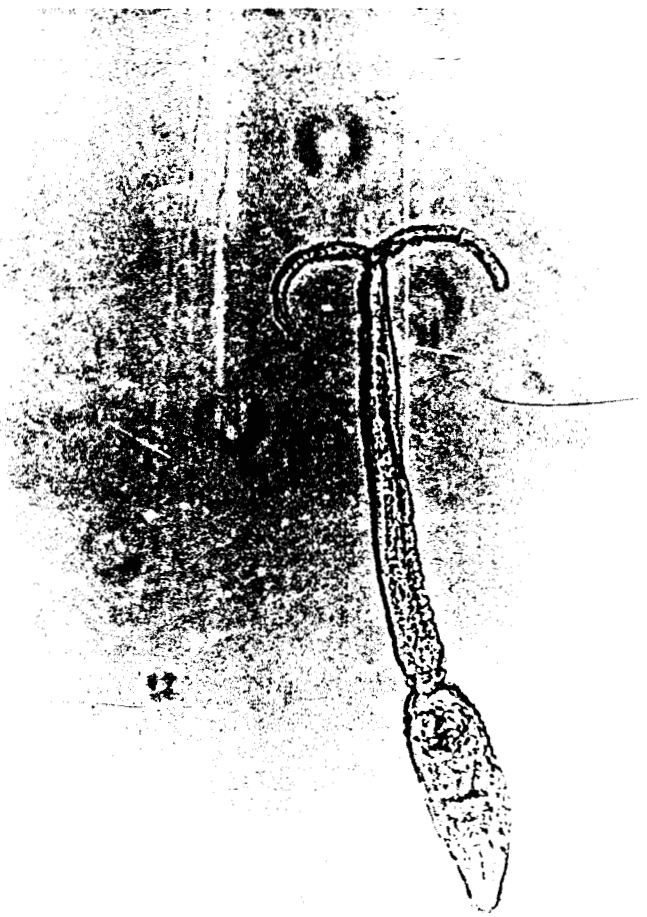
. la plus interne, une assise cellulaire formée de deux types cellulaires :

-des cellules pariétales, plus nombreuses, à protoplasme lacuneux et à noyaux clairs.

-des cellules germinales, sphériques, fixées à la base de la couche interne par un pédoncule cytoplasmique. Ces cellules peuvent être libres lors d'une rupture du pédoncule et former par multiplication une masse germinale. On obtient ainsi une deuxième génération de sporocystes.

Ces sporocystes sont mobiles et migrent dans les glandes digestives et dans l'ovotestis du mollusque.

Dans la cavité centrale de ces sporocystes secondaires, on reconnaît nettement les cercaires qui vont migrer à travers les tissus de l'hôte et émerger.



0,1mm

BU LILLE

FIGURE 1

CERCAIRE

I.1.2.c.les cercaires. (figure 1)

La cercaire représente le stade ultime de la multiplication asexuée étudiée ci-dessus. Elle est destinée à se transformer en adulte chez l'hôte vertébré définitif.

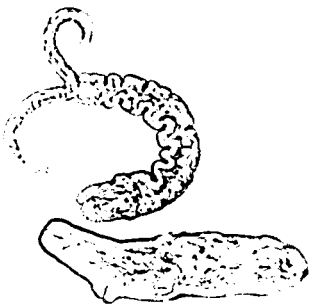
Elle est formée d'une partie antérieure qui donnera le futur schistosomule et d'une partie postérieure formée d'un appendice caudal bifide, organe locomoteur (Hockley, 1968 ; Race, Martin, Moore et Larsh, 1971).

La cercaire est limitée par une membrane unitaire classique. Elle possède deux ventouses, l'une orale et l'autre ventrale, constituées de deux couches musculaires.

La cercaire est libérée du mollusque, à partir de 27 jours après infestation selon une chronobiologie précise. Elle est attirée vers l'hôte définitif par un chimiotactisme défini.

Lors de la pénétration, elle perd sa partie caudale et se transforme en schistosomule. La pénétration est facilitée par des sécrétions enzymatiques qui rompent le ciment cellulaire et les substances fondamentales de l'épiderme (Lewert et Lee, 1954). Les produits de sécrétions sont stockés dans les glandes acétabulaires (Stirewalt et Kruidener, 1961).

La furcocercaire, en plus de l'aspect agent causal de la maladie, est un stade important du cycle puisqu'elle forme la charnière entre les stades asexués chez le mollusque et les stades sexués chez l'hôte définitif. C'est en plus le stade ultime de l'amplification par multiplication asexuée des formes larvaires : en effet, un mollusque infesté par un seul miracidium émet plusieurs milliers de cercaires de génotype identique.

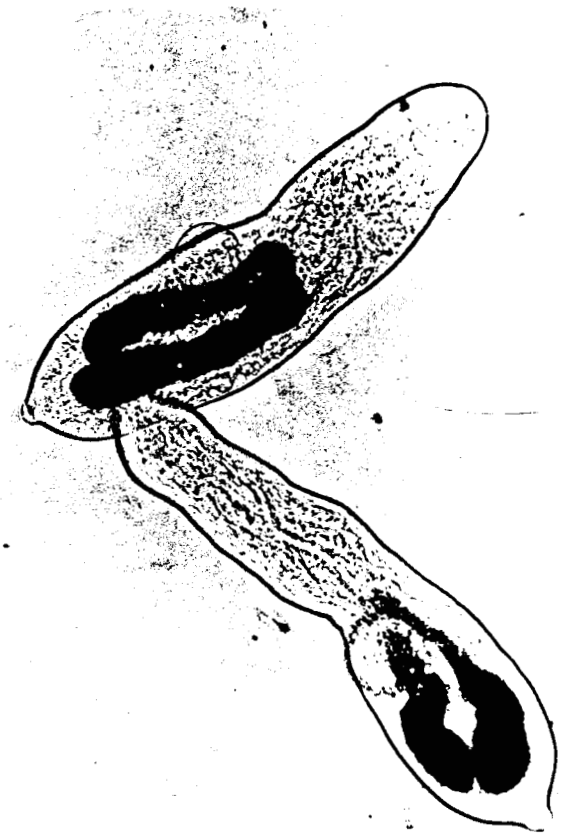


0,1mm

FIGURE 2

BU LILLE

SCHISTOSOMULES MECANIQUES



0,1 mm

FIGURE 3

SCHISTOSOMULES J11

BU LILLE

I.1.2.d.les schistosomules. (figures 2 et 3)

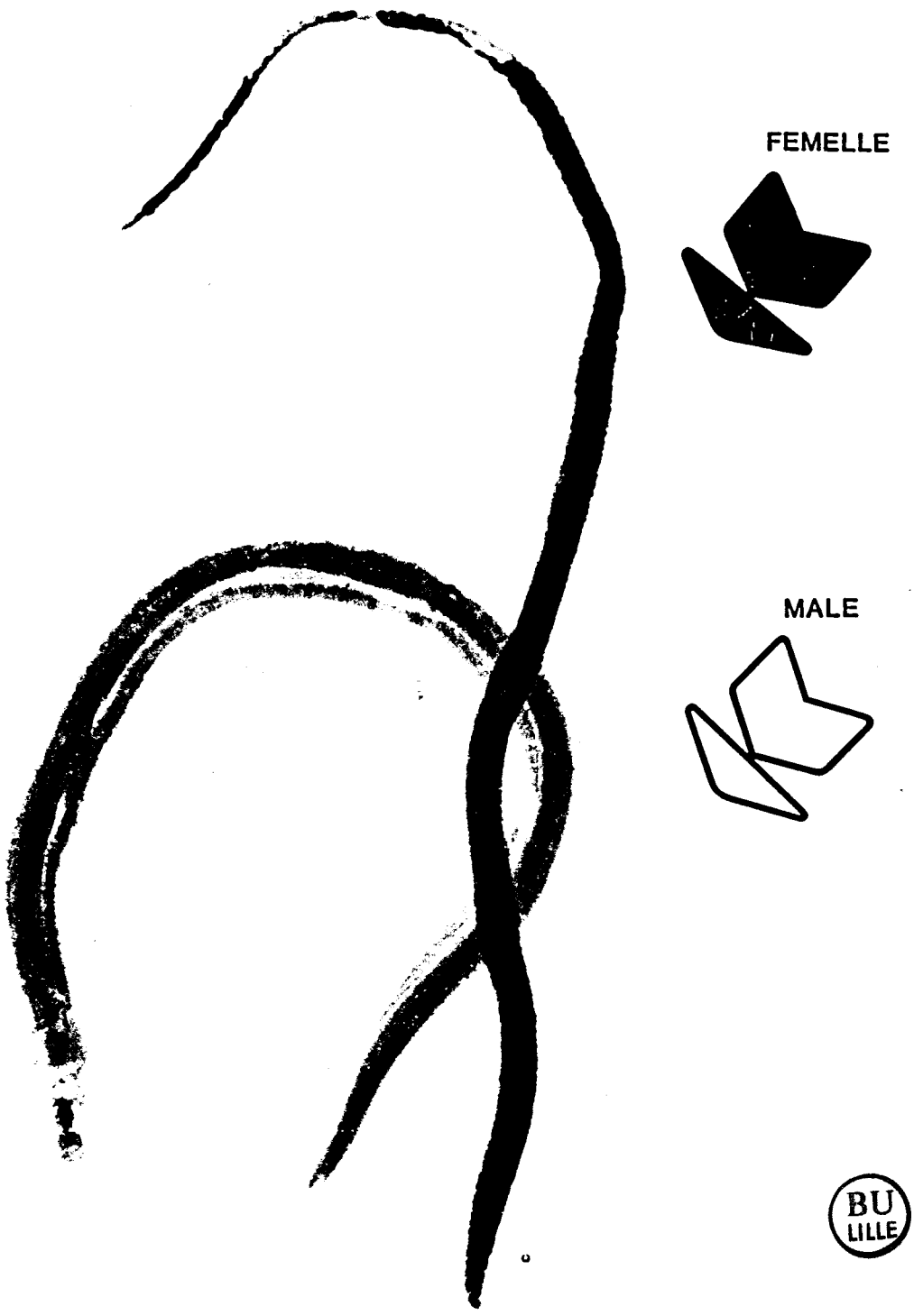
Juste après pénétration chez l'hôte définitif, la larve correspond à la cercaire dont la partie caudale, le cell coat et les glandes sécrétoires ont disparu. Pendant la migration du parasite des poumons vers le foie, des changements dans les fonctions biologiques et morphologiques apparaissent : notamment une réduction en taille et degré de torsion du parasite ainsi qu'une réduction de l'amplitude des mouvements d'élongation et de contraction des vers entrainant chez le schistosome installé dans le foie la perte de sa capacité à migrer dans d'autres organes (Wilson, Draskau, Miller et Lawson, 1978).

D'autres travaux (Torpier, Capron et Capron, 1977 ; Torpier, Hirn, Nirdé, De Reggi, Capron, 1982) montrent que le complexe membranaire du schistosome de 11 jours, présente un phénomène de desquamation, comparable au processus de mue chez les arthropodes où ces métamorphoses sont induites par des hormones spécifiques, ecdysone et 20-hydroxyecdysone.

I.1.2.e.le schistosome adulte. (figure 4)

Le mâle mesure 10 à 15mm de longueur et 1mm maximum de largeur. Les bords de son corps s'enroulent pour délimiter un canal, dit canal gynécophore, dans lequel se loge la femelle. Son corps plat possède un revêtement rugueux du à la présence de papilles hérissées d'épines.

La femelle possède un corps cylindrique plus long que celui du mle. Elle mesure de 15 à 20mm. Sa largeur varie régulièrement d'avant en arrière respectivement de 100um à 200um. Le corps est de teinte noire, due notamment à la présence des glandes vitellogènes en activité.



BU
LILLE

FIGURE 4 COUPLE DE S.MANSONI

I.2.CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA BIOLOGIE DE REPRODUCTION DU SCHISTOSOME.

La connaissance de la différenciation sexuelle du schistosome et de la physiologie du système de production d'oeufs est donc indispensable pour mettre en place un processus de blocage de la production d'oeufs et donc des manifestations pathologiques dues à la présence de l'oeuf dans l'organisme (granulomes, hémorragies intestinales). Notamment la compréhension du mécanisme de maturation des femelles est nécessaire.

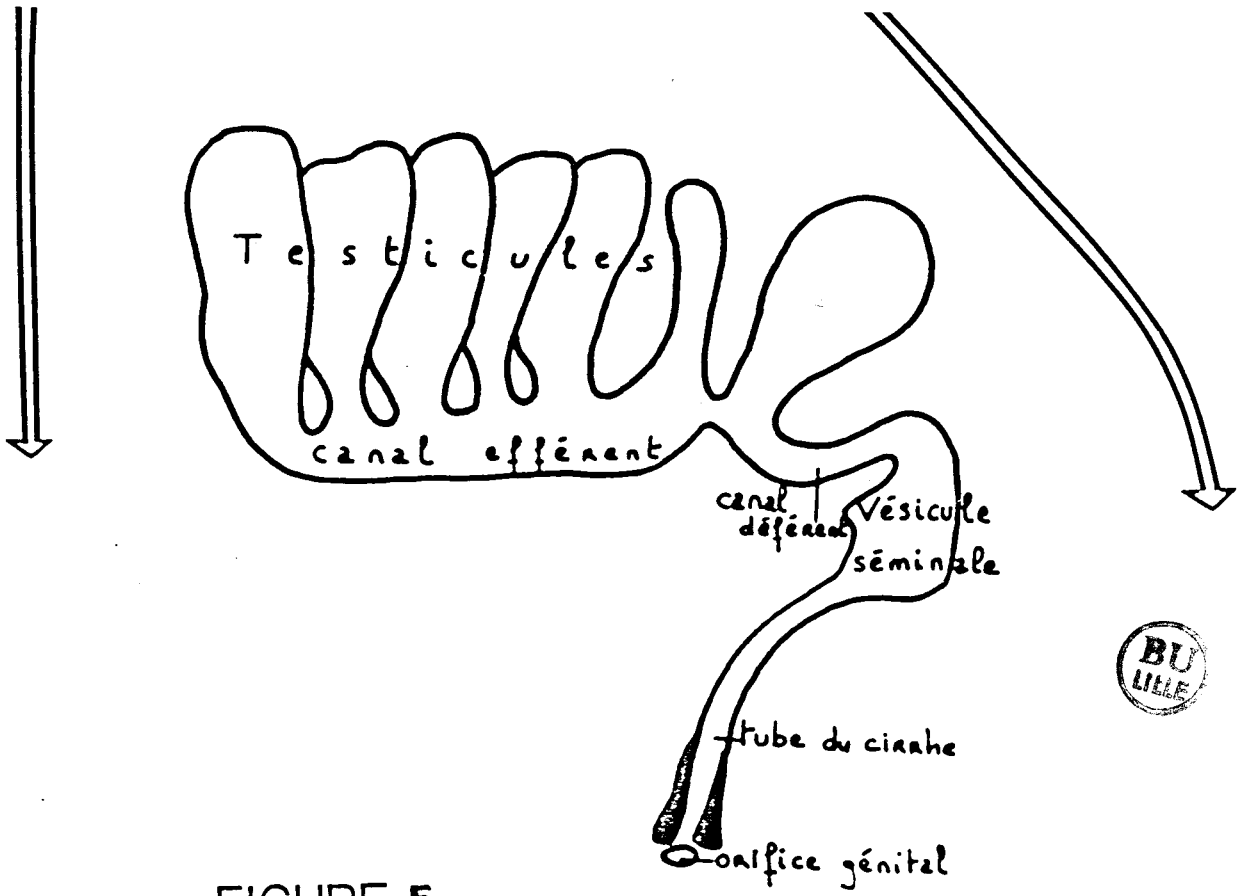
Déjà le genre schistosome se distingue des autres Trématodes par un dimorphisme sexuel net. Les partenaires mâles et femelles présentent des organes sexuels bien différenciés dont la morphologie générale actuellement connue correspondant aux deux schémas suivants.

I.2.1.Description de l'appareil reproducteur des schistosomes.

I.2.1.a.Description de l'appareil génital mâle. (figure 5)

L'appareil génital mâle est situé dans la partie antérieure du parasite. Le testicule plurilobé est relié au niveau de chaque partie ventrale des lobes à un canal efférent dont le prolongement se différencie en un canal déférent unique.

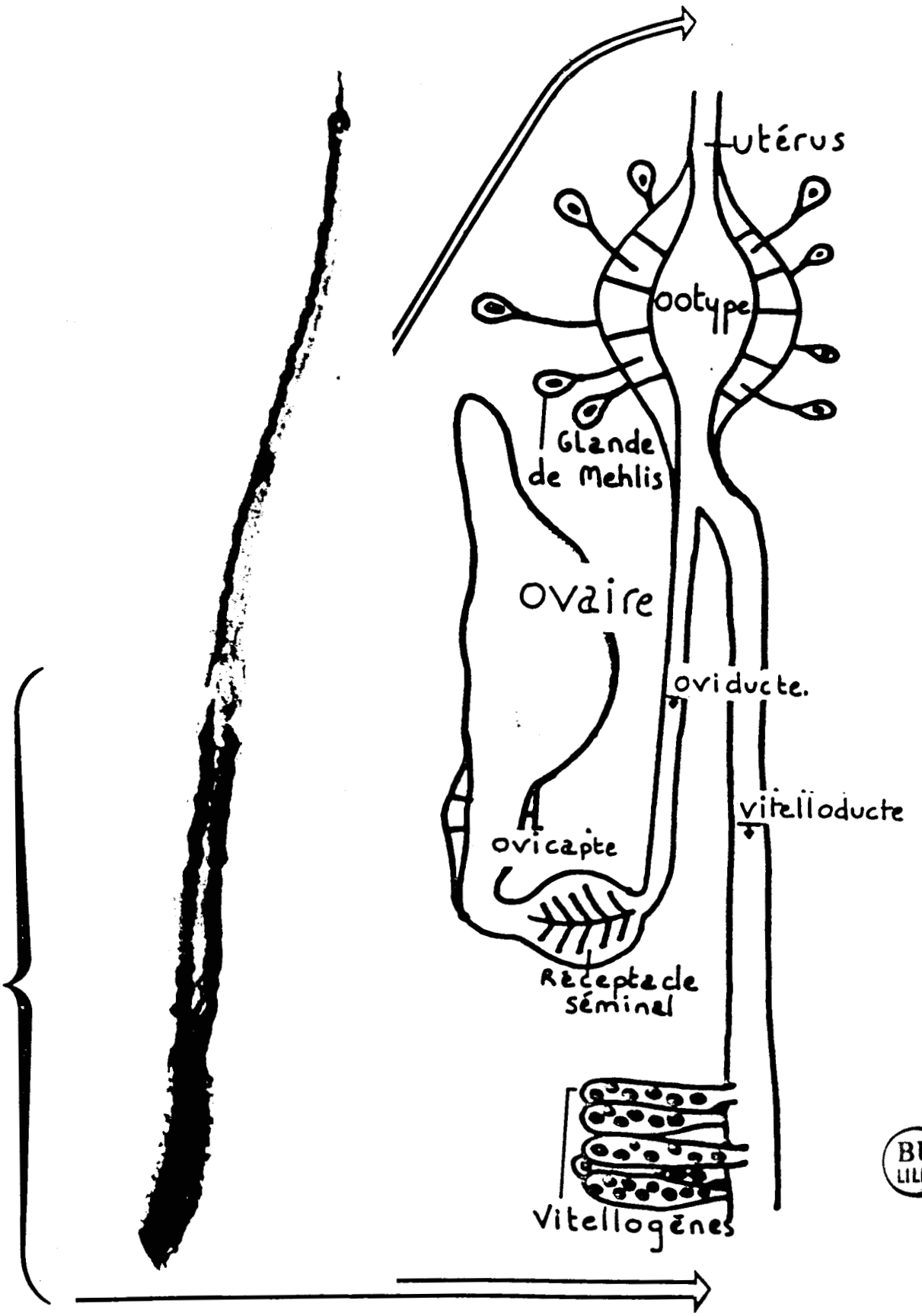
Ce canal s'ouvre selon un plan dorsolatéral dans une vésicule séminale de forme sphérique ressemblant à un large conduit de 35um de diamètre. Cette vésicule est reliée au tube du cirrhe, de 8 à 9um de diamètre, qui s'ouvre dans la partie antérieure du canal gynécophore. Aucune structure glandulaire n'a été observée autour de ce tube (Otubanjo, 1980).



BU LILLE

FIGURE 5

REPRESENTATION DE L APPAREIL REPRODUCTEUR MALE



BU LILLE

FIGURE 6

REPRESENTATION DE L APPAREIL REPRODUCTEUR FEMELLE

Le processus de la spermatogénèse chez les schistosomes parasites des humains est exceptionnel par rapport aux autres digéniens car dans leur cas, les différents stades de développement sont répartis au hasard dans les testicules. Cette étude morphologique a été réalisée par Severinghaus (1928) et confirmée par des travaux plus récents utilisant un marquage à la thymidine tritiée (Nollen, Floyd, Kolzow et Deters, 1976).

Le spermatozoide mature, décrit par Kitajima, Paraense et Correa (1976) et par Justine et Mattei (1981), formé d'une partie antérieure renflée et d'une partie postérieure constituée d'un flagelle unique, ne possède pas d'acrosome. La fécondation se ferait alors par fusion du plasmalemme de l'ovule à paroi peu épaisse et du plasmalemme du spermatozoide (Burton, 1967).

I.2.1.b.Description de l'appareil génital femelle (Gönnert, 1955 ; Erasmus, 1973) (figure 6)

L'appareil génital femelle est formé d'un ovaire où prennent naissance les oogonies qui par divisions mitotiques successives donnent les oocytes. Ceux-ci, sous la poussée d'autres éléments, gagnent le centre de l'organe et quittent l'ovaire.

Ils sont alors engagés dans un ovicapte musculeux en forme d'entonnoir qui représente le début de l'oviducte, canal à épithélium à cils vibratiles. Ainsi l'oeuf progresse dans la lumière de cet oviducte pour aboutir dans l'ootype, dilatation ellipsoidale de ce canal.

Les ovules fécondés par les spermatozoides sont stockés lors de l'accouplement dans le réceptacle séminal, autre dilatation de l'oviducte.

Les sécrétions de la glande vitellogène et de la glande de Mehlis assurent la formation de la coque de l'oeuf.

D'un point de vue ultrastructural, le système reproducteur femelle peut être divisé en trois parties : une partie comprenant l'utérus, l'ootype et la glande de Mehlis ; une autre partie comprenant l'ovaire et l'oviducte ; et une dernière partie comprenant la glande vitelline et le canal vitellin.

Certains organes de la femelle mature possèdent des particularités spécifiques au genre schistosoma :

-Les cellules de la glande de Mehlis pénètrent, par perforation, dans le canal de l'ootype.

-l'ovaire présente deux zones distinctes de par leur contenu : la partie antérieure renferme les oocytes à tout stade de maturation et la partie postérieure contenant les ovules (selon Erasmus) ou les oocytes primaires (selon Nollen et al., 1976, qui les identifient à ceux d'autres trématodes digénétiques). Ces ovules sont caractérisés par la présence de granules corticaux typiques élaborés à partir des complexes de Golgi.

-L'oviducte se subdivise en trois parties : un canal à revêtement cilié, un canal non cilié et une zone particulière où sont stockés les spermatozoides (correspondant au réceptacle séminal décrit par de nombreux auteurs). On remarquera que les spermatozoides stockés sont orientés de telle sorte qu'on observe une association très étroite entre la partie antérieure du spermatozoide et les cellules de l'oviducte.

-La glande vitelline est formée de nombreux lobules, chaque lobule contenant de nombreuses cellules à différents stades de développement

Arbitrairement, Erasmus (1975 et 1982) les a classées en quatre catégories :

-Stade 1: les cellules sont indifférenciées et situées à la périphérie du lobule. Leur noyau est grand par rapport au volume de la cellule. Les complexes de Golgi sont présents mais l'élaboration de granules vitellins n'est pas mise en évidence.

-Stade 2 : les cellules démarrent leur activité synthétique. Le volume cytoplasmique a augmenté. De petits granules protéiques sont observés et les complexes de Golgi sont rares.

-Stade 3 : les cellules sont en pleine synthèse protéique. Le volume cytoplasmique est important. Les complexes de Golgi sont présents et associés aux granules vitellins qui formeront les corpusculess vitellins.

-Stade 4 : la cellule est complètement mature. Les complexes de Golgi produisent activement les granules vitellins, précurseurs des corpuscules. Ceux-ci sont abondants, situés à la périphérie du cytoplasme, ils sont formés de granules de taille uniforme. On observe des organites typiques de ce stade : les corpuscules lipidiques parfois associés à du glycogène et les corpuscules calcaires qui pourraient jouer un rôle dans la formation de l'oeuf (Erasmus et Davies, 1979).

I.2.1.c.Définition génétique des mâles et femelles S.mansoni.

Le génôme de Schistosoma mansoni est constitué de huit paires de chromosomes (2n = 16) que l'on peut diviser en trois groupes selon la taille (Short et Grossman, 1981). La méthode du C.banding, permettant de colorer l'hétérochromatine constitutive et de différencier au niveau du chromosome des bandes sombres dites bandes C, révèle que la paire de chromosomes n°2 de la femelle est hétérologue : en effet l'un des chromosomes, dit chromosome W, présente en plus de l'hétérochromatine du centromère, un autre bloc d'hétérochromatine. La paire de chromosomes n°2 du mâle ne présente pas cette dissemblance (Short et Grossman, 1981). Ainsi cette paire de chromosomes n°2 est considérée comme les chromosomes sexuels. La femelle est donc hétérogamétique (ZW) et le mâle homogamétique (ZZ). Actuellement, les techniques de biologie moléculaire permettent d'approfondir les connaissances sur le génôme de S.mansoni. Des études d'hybridation montrent que la taille du génôme haploide de S.mansoni est d'à peu près $2,7.10^8$ paires de bases. Ceci représente environ le dixième de la taille du génôme de la plupart des espèces mammifères ($5,5.10^9$ paires de bases) et la même taille que celle du génôme des éponges (1.10^8 paires de bases). On remarque aussi que les séquences de D.N.A. sont au nombre de deux, répétitives et uniques. Ainsi à partir de ces critères, on constate que la taille du génôme est compatible avec celles des autres génômes d'eucaryotes (Simpson, Sher, et Mac Cutchan, 1982).

I.2.1.d.Comportement sexuel des schistosomes.

On sait que les schistosomules arrivent dans le foie après migration dans l'organisme de l'hôte et ceci sans être accouplés. C'est au niveau du foie que les jeunes adultes atteignent leur maturité, s'accouplent et migrent dans les veines mésentériques de l'hôte. En fait la chronologie exacte de leur migration fait l'objet d'études intensives (Wilson et Coulson, 1986) trop récentes pour que l'on puisse dégager un schéma général pouvant expliquer le comportement sexuel des S.mansoni. On peut signaler cependant l'étude de Awwad et Bell (1978) qui indique que les schistosomes S.mansoni accouplés sont plus attirés vers un dialysat fécal en système in vitro que des vers non accouplés .

De nombreux auteurs (Fairley, 1920 ; Faust et al., 1930) concluent à un accouplement polygame et temporaire pour les femelles qui quittent les mâles pour pondre. D'autres auteurs (Kitajima et al., Nollen et al., 1976) assurent que la copulation par les mâles est rapide et continue .

I.2.2.Formation et description des oeufs.

Lors de sa vie adulte, la femelle schistosoma mansoni produit beaucoup d'oeufs, une centaine par jour. Bien que l'oeuf soit un agent très pathogène dans la bilharziose, la physiologie de la production d'oeufs est très peu connue, notamment les mécanismes biochimiques responsables de la formation de l'oeuf. En fait, on suppose qu'ils sont à peu près identiques des mécanismes déjà connus chez d'autres Plathelminthes .

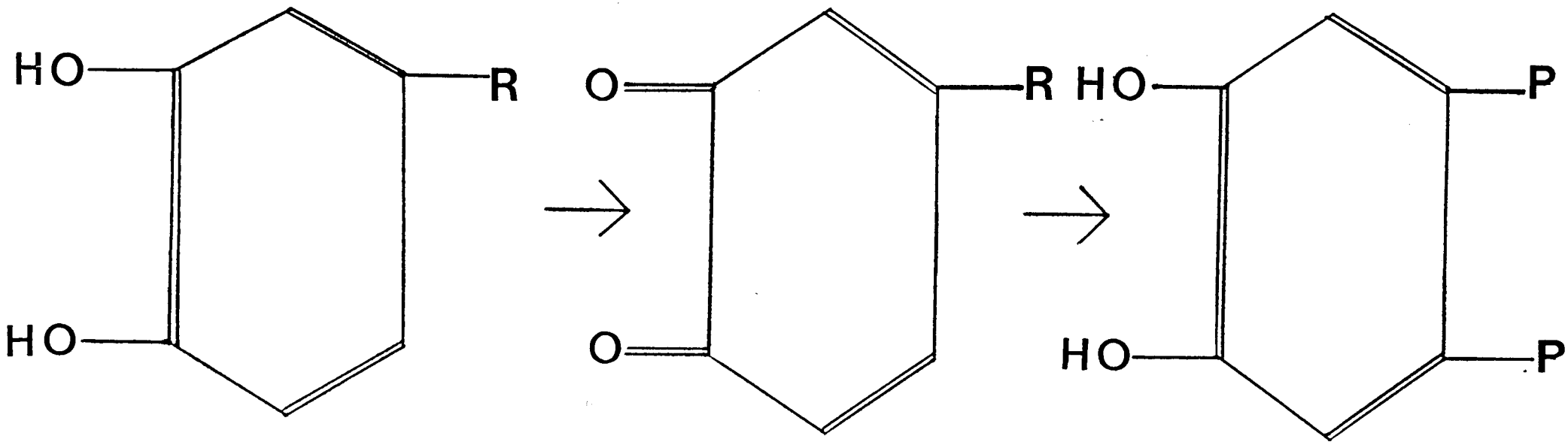
I.2.2.a.l'embryon .

La fécondation se réalise souvent au niveau de l'oocyte, par pénétration du spermatozoide entier dans l'oocyte. A ce moment, on observe l'expulsion des globules polaires qui traduit la fin de la méiose de l'oocyte. Des cellules nourricières d'origine vitelline, amenées dans l'ootype par contraction de l'oviducte, entourent l'embryon et lui assurent sa croissance .

La première division de l'oeuf est inégale : on obtient une grande cellule dite ectodermique et une cellule plus petite dite propagatrice. La cellule ectodermique se divise alors que la cellule propagatrice n'est pas encore en activité mitotique et est rejetée à l'un des pôles. Plus tard elle donnera deux cellules l'une donnant la lignée des cellules germinales, l'autre la lignée somatique qui engendrera le corps du miracidium.

I.2.2.b.la coque de l'oeuf .

Les sécrétions de la glande vitellogène et de la glande de Mehlis assurent la formation de la coque de l'oeuf. En fait la glande de Mehlis ou glande coquillière, manchon cellulaire entourant l'ootype, a un rôle assez mal connu: les sécrétions de cette glande permettraient la liquéfaction des globules vitellins qui s'étaleraient alors autour de l'embryon et des cellules vitellines pour former une membrane mince, ébauche de la coque. Les protéines vitellines subissent ensuite un tannage qui augmente la résistance mécanique et chimique de la coquille favorisant une protection contre les attaques enzymatiques lors du passage dans l'intestin.



DERIVE PHENOLIQUE → 1 → DERIVE DE LA QUINONE → 2 → LIAISON AVEC LES PROTEINES P

BU LILLE

FIGURE 7 TANNAGE DES OEUFS DES HELMINTHES

La phénol oxydase semblerait être un des catalyseurs majeurs du tannage des protéines. L'action de cette enzyme est de former des quinones à partir de L-tyrosine, ou de L-DOPA ou encore d'autres substrats phénoliques, ces quinones servant d'intermédiaires dans la polymérisation des protéines (Seed, Boff et Bennet, 1978).

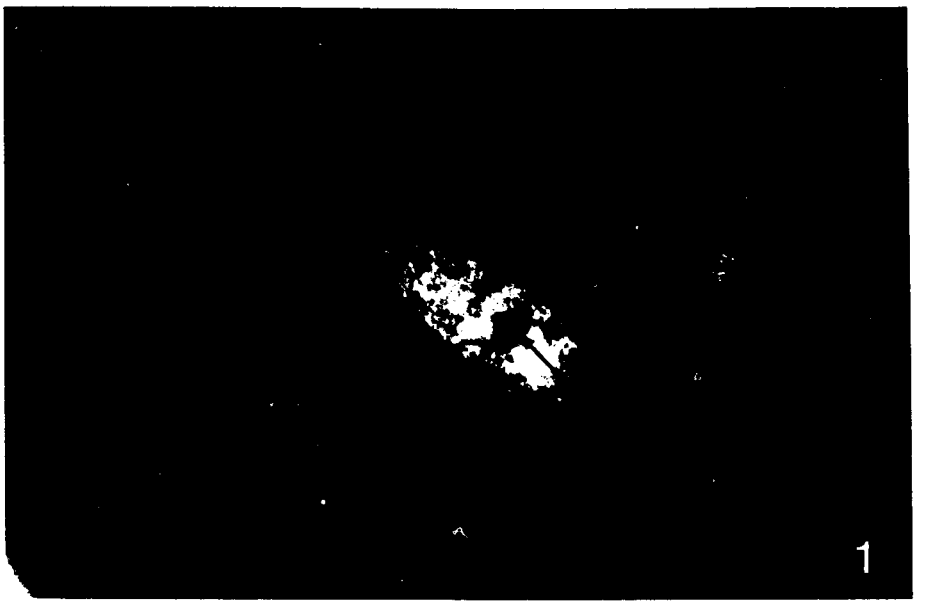
En fait le tannage des oeufs des helminthes est basé sur le système des insectes : les phénols dérivés de la tyrosine sont oxydés en quinone par la phénolase (1). La quinone ensuite se lie aux protéines au niveau des groupements amino-libres (2). (figure 7)

Ceci a été largement démontré histochimiquement par des tests sur les protéines, les phénols et la phénolase (Bell et Smyth, 1958 ; Smyth, 1954). De plus cet enzyme exclusivement situé chez la femelle semble être inhibé par des drogues telles que le diéthylthiocarbamate qui inhibent la production d'oeufs (Seed et al., 1978) . Actuellement la phénolase provenant de schistosoma mansoni a été isolée et caractérisée (Seed et Bennet, 1980).

I.2.2.c.ponte et maturation des oeufs. (figure 8)

L'oeuf est de forme ellipsoidale, de teinte jaune-brun. Il possède un éperon latéral qui lui permet de résister au courant sanguin.

Chez les animaux infestés par schistosoma mansoni , la ponte débute vers le 30ème jour de l'infestation. Une période de 6 jours est encore nécessaire pour que l'embryon soit totalement formé et se développe en un miracidium .



BU LILLE

FIGURE 8

DEUX STADES EXTREMES DE LA MATURATION DES OEUFS DE S.MANSONI.

1-Oeuf immature montrant un embryon en developpement. Gr. 20×12.5.

2-Oeufs complètement matures présentant des miracidies (flèches). Gr. 32×12.5.

Beaucoup d'oeufs sont retenus dans les tissus : ce sont les oeufs non fertiles de petite taille, très souvent déformés et n'aboutissant pas à la maturation. Les oeufs assurant la continuation du cycle sont appelés oeufs viables. Ceux-ci deviendront matures et contiendront une miracidie parfaite, prête à éclore.

L'éclosion se réalise dans l'eau douce, à la température de 30°C : le miracidium soulève un opercule situé à un pôle de l'oeuf (Higgins et Opitz, 1983) dont on distingue au microscope la ligne de fragilisation.

I.2.3.Maturation sexuelle .

I.2.3.a.Description du dysfonctionnement de l'appareil reproducteur femelle.

Le système reproducteur femelle de Schistosoma mansoni est particulièrement pertubable. Déjà, des travaux ont révélé que de nombreux facteurs intervenaient au niveau du dysfonctionnement du système reproducteur des schistosomes femelles, entre autres le régime alimentaire de l'hôte, certaines drogues utilisées en chimiothérapie (Machado, Da Silva et Pellegrino, 1970), les hormones de l'hôte (Berg, 1957 ; Davies et Jackson, 1970 ; Barrabès, Duong et Combescot, 1979) et l'isolement sexuel du parasite (Erasmus, 1973 ; Shaw, 1977) .

De nombreuses études ont montré que notamment lors d'une infestation unisexuée, une croissance et un développement anormaux sont observés.

Erasmus (1973 ; 1982) décrit un dysfonctionnement de l'appareil reproducteur femelle lors de ces infestations :

- les cellules de la glande de Mehlis ne perforent pas la paroi de l'ootype car le processus de sécrétion n'a pas atteint son maximum de production.
- l'ovaire est plus petit que celui des femelles matures de même âge. Il possède des cellules de petit diamètre qui ressemblent aux oocytes des femelles matures, sans toutefois posséder de nucléole ni d'amas d'hétérochromatine. Ces oeufs ne possèdent pas de granules corticaux typiques.
- on note l'absence de spermatozoides dans l'oviducte.
- la glande vitelline n'est pas parfaitement différenciée en lobules vitellins. En fait, on observe des cellules indifférenciées réparties autour d'un caecum central.

Seuls, l'utérus, l'oviducte et le canal vitellin sont fonctionnels de la même façon que chez la femelle mature provenant d'infestation bisexuée.

On remarque que le dysfonctionnement du système reproducteur femelle lors de l'infestation unisexuée n'est pas assimilable à celui lors de l'immaturité du système reproducteur des femelles jeunes (30 jours après infestation) provenant d'infestation bisexuée. La comparaison entre ces deux types de femelles révèle que :

-le canal de l'ootype est perforé par les cellules de la glande de Mehlis chez les femelles immatures contrairement au canal des femelles unisexuées.

-au niveau des ovaires des femelles immatures, les complexes de Golgi sont associés à de petits granules, futurs granules corticaux typiques de l'oeuf.

-les lobules vitellins de la glande vitelline des femelles immatures sont bien différenciés et contiennent des cellules à tous les stades de maturation.

Ainsi on peut conclure que l'absence du mâle entraîne deux différences morphologiques au niveau du système reproducteur femelle :

-l'ovaire, bien que plus petit que la normale, produit des oeufs mais dépourvus de ces granules corticaux typiques.

-les cellules vitellines sont totalement inaptes à devenir matures.

Alors que les femelles des deux types présentent des différences bien nettes, les mâles paraissent identiques. On peut seulement noter que Lennox et Schiller (1972) décrivent des mâles unisexués, plus petits que les mâles bisexués, et à sexualité rudimentaire, qui atteindraient une taille normale après plusieurs accouplements.

I.2.3.b.Rôle du mâle dans le développement de la femelle.

Les observations ci-dessus faites par Erasmus (1973) et d'autres observations du même genre (Armstrong, 1965 ; Michaels, 1969) traduisent chez les femelles lors d'infestation unisexuée, une absence de stimulus essentiel à l'initiation de la maturation sexuelle liée à l'absence du mâle qui joue donc un rôle très important dans le fonctionnement de la femelle S.mansoni.

Des travaux plus récents précisent la nature du rôle du mâle sans toutefois éclaircir la nature du facteur de maturation. En fait, le mâle est nécessaire non seulement pour la maturation initiale du système reproducteur femelle mais aussi pour la continuation de la production du matériel vitellin et d'oeufs viables, tout le long de la vie de la femelle. En effet, Clough (1981) a étudié morphologiquement des femelles matures transplantées en l'absence de mâle. L'auteur constate, après 9 jours de transplantation, une dégénérescence évidente du système reproducteur : le matériel vitellin devient diffus, les vitellogènes dégénèrent et se décolorent. La production d'oogonies au niveau des ovaires est interrompue, même si des spermatozoides sont encore présents dans l'oviducte. Toutefois, cette dégénérescence est réversible et apparemment ne présente pas de dommage définitif au niveau du système reproducteur. Floyd et Nollen (1977) ont observé la même dégénérescence rapide des ovaires et des vitellogènes des femelles bisexuées transplantées en infestation unisexuée : après 6 jours de transplantation, les auteurs notaient l'absence de trace d'oogénèse et de vitellogénèse chez ces femelles transplantées en infestation unisexuée ; des changements sont observés au bout de deux jours de transfert au niveau de la glande vitelline. On remarque une altération de la composition structurale des cellules vitellines ; les cellules vitellines en voie de développement se font rares et les lobules contiennent surtout des cellules S1 et des cellules S4 qui peuvent présenter des corpuscules vitellins en voie de désaggrégation. Après 14 jours de transplantation, les cellules S4 sont totalement anormales et les cellules mortes deviennent très abondantes. Parallèlement à la dégénérescence de la glande vitelline, on note celle de l'ovaire à partir du septième jour de transplantation qui se traduit par une présence de matériel fibreux dans l'épithélium basal et la mort cellulaire de nombreux oocytes.

Ainsi bien que les cellules vitellines présentes avant le transfert continuent leur développement, la différenciation de nouvelles cellules S1 cesse. On remarque que les changements de la glande vitelline sont les mêmes que ceux obtenus lors de la présence de drogues antischistosomiales (Erasmus et Popiel, 1980 ; Popiel et Erasmus, 1981 a) : on peut conclure que cette dégénérescence de la glande vitelline est une réponse habituelle à des conditions anormales quelles qu'elles soient. Par contre, la régression de l'ovaire dépendrait uniquement de l'absence du mâle (Popiel, Cioli et Erasmus, 1984).

La présence du mâle n'interviendrait pas seulement sur le développement reproducteur de la femelle mais aussi sur son développement somatique : en effet les femelles provenant d'infestation unisexuée et les femelles immatures sont plus petites que les femelles matures. Elles obtiennent une taille identique à celles des femelles matures, en présence de mâle (Erasmus, 1973 ; Shaw et Erasmus, 1981 ; Shaw ; Marshall ; Erasmus, 1977). Inversement, lorsque des femelles matures sont transplantées en infestation unisexuée, en plus de la dégénérescence du système reproducteur, on observe une réduction de la taille de ces vers (Popiel, Cioli et Erasmus, 1984).

I.2.3.c.Nature du facteur de maturation

La nécessité de la présence du mâle pour obtenir un développement et une maturité sexuelle chez les schistosomes est actuellement admise puisque de nombreux facteurs jusqu'à ce jour en témoignent (Armstrong, 1965 ; Michaels, 1969 ; Erasmus, 1973, Shaw et Erasmus, 1981 ; Clough, 1981 ; Popiel, Cioli et Erasmus, 1984).

Quand la femelle est stimulée par le mâle pour terminer sa maturation sexuelle, un large programme de division cellulaire, de différenciation et de croissance s'établit avec une éventuelle maturation de la glande vitelline : par contre, la nature du stimulus induisant cette maturation reste inconnue.

Le fait de l'importance du mâle dans le développement de la femelle a conduit de nombreux auteurs à se demander si l'insémination ne serait pas le stimulus majeur de l'initiation de la maturation. Notamment, Moore, Yolles et Meleney (1954) émettaient l'hypothèse qu'une substance hormonale était transmise du mâle à la femelle avec les spermatozoides et ils n'écartaient pas l'idée que le spermatozoide lui-même pouvait induire la maturation. Actuellement, à partir de plusieurs travaux, cette théorie peut être écartée :

Armstrong (1965) et Michaels (1969) montrent que des mâles stérilisés par des rayons X stimulent autant les femelles que des mâles fertiles. Cette expérience intéressante ne peut à elle seule éliminer l'hypothèse émise car les mâles ne sont peut-être pas stérilisés totalement.

Erasmus (1973) met en évidence par microscopie électronique l'absence de spermatozoides dans l'oviducte des femelles unisexuées, mais aussi dans celui des femelles bisexuées immatures qui pourtant possèdent un système reproducteur complet en voie de maturation.

De même, la présence de spermatozoides dans l'oviducte de femelles bisexuées transplantées en infestation unisexuée n'empêche pas la dégénérescence du système reproducteur femelle (Clough, 1981). Un examen ultrastructural, réalisé par Shaw (1977), de femelles unisexuées accouplées à des mâles montre que la présence du spermatozoide au niveau de la femellle n'est pas essentielle pour l'entrée en activité des glandes vitellines. D'après toutes ces observations, on peut donc conclure que l'insémination n'est pas un stimulus majeur dans l'initiation de la maturation.

En fait, le succès de la reproduction et plus précisément de la maturation de la femelle est lié certainement à des mécanismes dépendants les uns des autres. D'ailleurs, actuellement, les deux théories à propos de l'initiation de la maturation, seraient nécessaires toutes les deux ; le premier mécanisme ne pouvant initier le développemnt sexuel de la femelle sans la réalisation de l'autre mécanisme et vice-versa.

La première hypothèse supposée intervenir dans le déclenchement du développement de la femelle est basée sur un contact physique avec le mâle. Une étude réalisée <u>in vitro</u> par Shaw (1977) indique une mise en activité des systèmes glandulaires de la femelle unisexuée lorsqu'elle est en présence de mâles. Il constate plus précisément que seules, les femelles ayant résidé dans le canal gynécophore du mâle présentent des cellules vitellines à développement normal, sans que la présence du spermatozoide ne soit requise. L'effet initial du contact physique entre les deux partenaires serait donc d'activer la formation des corpuscules vitellins à l'intérieur des cellules vitellines et d'augmenter la synthèse des cellules de la glande de Mehlis.

Den Hollander et Erasmus (1985) par l'étude des variations du taux de synthèse du D.N.A. au niveau des différents adultes S.mansoni montrent aussi que le contact physique est nécessaire à l'initiation de la maturation. Pendant les premières 24 heures de mise en présence de femelles unisexuées avec des mâles, les auteurs notent une augmentation du taux de synthèse de D.N.A., traduisant un début de différenciation des cellules vitellines, augmentation identique chez les femelles accouplées ou non. Par contre, après 48 heures de mise en présence,ils remarquent que l'accouplement devient nécessaire à la continuation de l'augmentation du taux de synthèse de D.N.A., c'est à dire à la continuation du développement des cellules vitellines. Ainsi donc, un contact physique quelqu'il soit au niveau de la surface du mâle provoquerait la stimulation initiale pour le développement de la femelle, qui ne pourrait s'achever, seulement si un accouplement correct se réalise. Ces observations impliquent que des récepteurs doivent être situés à la surface de la femelle et que l'activation, lors du contact physique entre les deux sexes, soit de nature physique ou chimique. Si des récepteurs sont de nature physique, ils seront tégumentaires, sous forme d'organes sensoriels, sensibles au contact physique avec le mâle. Si des récepteurs sont de nature chimique, il doit exister un transfert d'une substance du mâle vers la femelle, qui initierait une zone localisée de la femelle.

Cette idée de transfert d'une substance du mâle vers la femelle est commune aux deux hypothèses de l'origine de la maturation sexuelle, la deuxième théorie suggérant un mécanisme d'origine purement chimique.

La possibilité que le facteur de maturation soit humoral (hormone ou phéromone) est suggérée par des études antérieures incluant celles de Severinghaus (1928) et de Moore, Yolles et Meleney (1954). Les travaux d'Armstrong (1965) et de Michaels (1969) concluent que le mâle contrôle le développement sexuel et la taille de la femelle ; c'est pourquoi ils suggèrent l'existence d'une phéromone qu'ils définissent de la façon suivante : c'est une substance sécrétée par des individus qui, perçue au niveau d'individus conspécifiques, entraîne une réponse au niveau du comportement ou du développement de ces derniers.

Shaw, Marshall et Erasmus (1977) observent qu'en culture in vitro des extraits éther-acétone initient le développement des cellules vitellines et stimulent la croissance des femelles provenant d'infestation unisexuée ; un développement similaire n'est pas observé par des extraits de femelle, ou de mâles et de femelles ensemble ou encore par un milieu dans lequel le mâle a été mis en culture. En fait l'extrait de mâles augmenterait, chez la femelle unisexuée, la quantité de tyrosine qui est utilisée sélectivement par les cellules vitellines pour la synthèse des protéines coquillières (Popiel et Erasmus, 1981).

L'existence de phéromone chez S.mansoni est aussi suggérée par l'observation de l'attraction sexuelle entre les deux sexes, comparativement à l'étude réalisée chez les nématodes et les insectes. Les travaux de Shirazian et de Schiller (1982), notamment, indiquent non seulement que les sexes opposés sont attirés l'un vers l'autre, mais qu'ils préfèrent s'accoupler avec leurs partenaires initiaux.

Quant aux travaux d' Impéria, Fried et Eveland (1980) qui concluent à l'émission d'une phéromone par le mâle, ils doivent être considérés avec réserve car leurs résultats présentent certaines lacunes telles qu'un temps d'incubation court (quatre heures seulement) et que l'absence d'explication sur le fait que trois mâles sont moins effectifs qu'un mâle pour attirer les femelles.

Une substance stimulante serait donc transmise directement du mâle à la femelle ; un contact intime étant nécessaire pour éviter la dilution de l'agent stimulateur, ce qui expliquerait l'absence de stimulation des femelles unisexuées par un milieu où le mâle a séjourné (Shaw, Marshall et Erasmus, 1977).

La nature de cette substance pourrait aussi être d'origine nutritionnelle; des travaux récents insistent sur l'importance du mâle au niveau de l'apport de métabolites à la femelle :

Cornford et Hunt (1981) ont trouvé que les couples Schistosoma mansoni possèdent plus de glucose que des mâles et des femelles non accouplés, la différence entre "accouplé" et "non accouplé" étant très nette chez la femelle. De même, le glycogène est plus abondant chez les mâles seuls ce qui ferait penser à la possibilité d'un transfert de carbohydrates du mâle vers la femelle. Les auteurs concluent à la nécessité d'un transfert continu du glucose pour maintenir une croissance normale de la femelle.

L'étude des protéines des mâles et femelles de S.mansoni témoigne aussi de l'importance du facteur nutritionnel dans la maturation normale des femelles.

Atkinson et Atkinson (1980) trouvent qu'une protéine majeure de 66 kDa synthétisée par le mâle est transferrée à la femelle. Ces auteurs mettent en évidence ce transfert chimique direct après incubation d'un mâle dans un milieu contenant de la leucine marquée au carbone 14 et après accouplement pendant 18 heures avec des femelles non marquées. Après séparation des couples, une électrophorèse PAGE en présence de S.D.S. et suivie d'une fluorographie est réalisée sur chaque échantillon de sexe différent. Cette technique met en évidence une bande de 66 kDa représentant le polypeptide le plus abondant chez la femelle. Or ce produit particulier n'est synthétisé que chez le mâle. C'est pourquoi les auteurs ont pensé à un transfert de ce polypeptide du mâle à la femelle, qui nécessite obligatoirement une relation intime entre les deux sexes. On constate aussi qu'aucune évidence sur l'action de ce polypeptide sur le développement sexuel de la femelle n'a été faite. Actuellement, ce résultat est plus ou moins contesté par des travaux plus récents tel que celui de Popiel et Basch (1984). A partir de la même technique, les auteurs ne retrouvent pas le résultat d'Atkinson et al. : la bande de 66 kDa ne représente pas le polypeptide le plus abondant chez la femelle. Cette bande est d'intensité comparable chez les mâles, les femelles matures et les femelles unisexuées. Les auteurs n'ont pas réussi à démontrer une différence entre les mâles et les femelles dans la capacité de synthèse de ce polypeptide de 66 kDa. Par contre ils mettent en évidence une autre bande de 50 kDa environ chez la femelle normale. On peut tenter d'expliquer ces contradictions entre les deux travaux par une différence de protocole dans la technique ou par l'usage de souches de parasites différentes ou encore par l'usage de milieux de culture différents.

D'autres travaux apportent aussi la preuve que les protéines peuvent être susceptibles de jouer un rôle dans la maturation des femelles. Par exemple, Aronstein et Strand (1983) ont observé un relargage spécifique des glycoprotéines selon le sexe du schistosome et notamment une glycoprotéine relarguée par les femelles, de poids moléculaire de 66 kDa et de pH 4.7-4.5. Cette étude a été réalisée à partir des protéines marquées métaboliquement avec de la méthionine S^{35}. L'analyse s'est basée à partir de résultats obtenus par électrophorèse bidimensionnelle et comprend l'étude des protéines provenant du milieu, qui lors d'infestation naturelle, peuvent représenter des antigènes importants.

Ainsi donc, malgré une mise en évidence de l'existence d'un stimulus de maturation, les nombreuses tentatives de caractérisation de la nature de celui-ci n'ont pu actuellement aboutir et nous en restons donc toujours au stade des hypothèses.

I.2.3.d. Caractérisation de polypeptides marqueurs de la maturation sexuelle.

La compréhension du contrôle de la maturation sexuelle de la femelle et de la production d'oeufs peut aussi se réaliser au niveau moléculaire par l'identification de molécules associées à ce contrôle . Dans ce but, de nombreux auteurs ont tenté de caractériser biochimiquement les adultes matures des adultes immatures.

Ruppel et Cioli (1977) ont étudié la composition protéique de Schistosoma mansoni par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. Ils notent un fort degré de ressemblance entre les protéines des adultes matures ou immatures. Toutefois, chez les femelles, une protéine de 29 kDa semblerait être spécifique de la glande vitelline et trois polypeptides de poids moléculaires suivants, 58 kDa, 23 kDa, et 11 kDa sembleraient caractériser le stade adulte mature du parasite. Par une technique qui permet une résolution plus grande, l'électrophorèse bidimensionnelle suivie de fluorographie, Atkinson et Atkinson (1982) étudient les protéines synthétisées in vitro par les adultes et les parasites immatures. Une analyse préliminaire par électrophorèse monodimensionnelle indique que les parasites immatures produisent plus de protéines adultes. La séparation par électrophorèse bidimensionnelle permet d'obtenir plus d'indications : le mâle homogamétique synthétiserait spécifiquement trois polypeptides dont les caractéristiques respectives sont : PM 88 kDa-pI 5.65 ; PM 66 kDa-pI 5.25 ; et PM 58 kDa-pI 5.25. De la même façon, chez la femelle, quatre polypeptides spécifiques de bas poids moléculaires et de point isoélectrique variant de 4.3 à 4.7 ont pu être mis en évidence mais seulement en gel de polyacrylamide à 12 %.

D'une façon indirecte, puisque le but initial des travaux d'Aronstein et Strand (1983) est d'analyser des polypeptides spécifiques d'espèce ou de genre chez trois espèces humaines de schistosomes, ces travaux permettent de mettre en évidence des polypeptides spécifiques de sexe chez Schistosoma mansoni. Les protéines sont marquées métaboliquement avec de la méthionine S^{35}. Les protéines synthétisées par des mâles et des femelles séparées sont examinées par électrophorèse bidimensionnelle. L'identification de produits spécifiques est facilitée par l'isolement de glycoprotéines par chromatographie d'affinité vis à vis des lectines. Ainsi, les auteurs concluent à la présence d'un groupe protéique spécifique du mâle de poids moléculaire variant de 200 kDa à 70 kDa et de point isoélectrique de 4. A part cette différence au niveau des protéines synthétisées, aucune différence au niveau des protéines totales entre mâle et femelle n'a été établie. Par contre au niveau des glycoprotéines relarguées dans le milieu, une glycoprotéine de poids moléculaire de 66 kDa et de 20 kDa et de point isoélectrique de 6.7 apparaissent comme étant spécifiques de la femelle. Les auteurs affirment que ce relargage de protéines n'est pas dû à une désaggrégation de l'organisme mais résulte d'un mécanisme physiologique au niveau d'un système sécréteur tel que les intestins ou organes génitaux.

Malgré une identification de quelques polypeptides, l'analyse de la composition des protéines totales de mâles et de femelles S.mansoni par électrophorèse en gel de polyacrylamide met en évidence peu de spécificité de genre ou de sexe. Parallèlement, d'autres voies d'analyse ont été étudiées permettant d'apporter des informations supplémentaires au niveau de la caractérisation moléculaire des parasites mâles et femelles S. mansoni.

D'un point de vue immunoélectrophorétique, Aronstein et Strand (1984) et Ruppel, Rother, Vongerichten, Lucius et Diesfield (1985) apportent de nouvelles données concernant la différence d'autigénicité entre les parasites matures et immatures. Aronstein et Strand ont identifié des antigènes spécifiques de stade (mature ou immature) qui sont des glycoprotéines entraînant une réponse immune humorale qualitativement différente selon le type d'infestation. Ruppel et al. ont mis en évidence, par la technique de transfert de protéines sur nitrocellulose, une protéine autigénique d'origine intestinale reconnue seulement par les adultes, de poids moléculaire de 31 kDa.

En fait, aucune sonde immunologique permettant de différencier les mâles des femelles, ou de caractériser un produit de maturation tel que l'oeuf, n'a été vraiment mise en évidence. C'est pourquoi des auteurs ont utilisé la voie de la biologie moléculaire pour tenter d'identifier et de clôner les gènes majeurs de régulation du développement et surtout les gènes de production d'oeufs (Simpson et Knight, 1986. Knight, Simpson, Kelly et Smithers, 1986). Comme aucune donnée concernant la nature de la composition des protéines structurales d'oeufs et concernant l'existence de polypeptides spécifiques de la maturation n'est actuellement bien définie, ces auteurs à partir de c.D.N.A. ont cherché à identifier des gènes dont les caractéristiques devraient être les suivantes : avoir un haut pouvoir d'expression et s'exprimer au niveau des femelles matures seulement, c'est à dire ne pas être exprimé ni chez les mâles matures, ni chez les femelles immatures. Une librairie de c.D.N.A. formée à partir de R.N.A. isolé de schistosomes mansoni adultes a ainsi été triée par hybridation différentielle afin d'identifier des clônes correspondant à des gènes fortement exprimés par les vers femelles.

Le R.N.A. total a été obtenu par précipitation du matériel parasitaire au chlorure de lithium et urée puis par extraction phénolique ; le c.D.N.A. a été créé à partir des méthodes conventionnelles. Le screening par hybridation différentielle de ces clônes de c.D.N.A. a été réalisée avec un seul brin de c.D.N.A. marqué au Phosphore 32. Plusieurs de ces c.D.N.A. ont été identifiés; ceux-ci codent pour des mêmes espèces de m.R.N.A. présent en très grande abondance. Les études réalisées avec l'un d'entre eux, le pSF10 qui contient 500 paires de bases, (obtenu par digestion euzymatique avec une endonucléase de restriction (Pstl) et purifié par électrophorèse sur gel d'agarose), montrent que ce gène n'est pas exprimé ni chez les femelles immatures, ni au niveau des oeufs et est transcrit en un polypeptide d'environ 35 kDa. La numération de ces puits de R.N.A. montre que 10 % du R.N.A. total des femelles parasites sont les homologues du pSF10. Par ailleurs, un seul gène correspondant à pSF10 a été identifié par des travaux de transfert sur nitrocellulose ("Southern blotting") utilisant du D.N.A. de ver adulte.

Donc par cette approche directe, Simpson et al. ont mis en évidence un gène qui code pour un polypeptide majeur spécifique de la femelle, de 30-35 kDa. Les auteurs à partir des travaux de Ruppel et Cioli (1977) et de Popiel et Basch (1984) font l'hypothèse que ce polypeptide pourrait être la protéine majeure des corpuscules vitellins à partir desquels les oeufs sont formés.

I.2.4.Conclusion.

La réussite de la reproduction nécessite donc une série de mécanismes interdépendants tels que la présence des deux sexes dans l'hôte, l'accouplement sexuel, la maturation de la femelle, la migration des vers accouplés du foie vers les veines mésentériques, l'insémination et la fécondation, la production d'oeufs et la copulation continue. Chacun de ces processus est nécessairement soumis à des mécanismes de régulation non encore clairement définis, du fait de la difficulté de reconnaissance et d'analyse des conditions "in vivo". Dans des conditions "in vitro", certaines difficultés ont pu être levées et ont permis de mettre en évidence une relation spatiale et temporelle entre les sexes, d'apporter des hypothèses plus précises sur les produits variés intervenant dans les relations sexuelles de ce parasite et d'essayer d'isoler et d'identifier les facteurs qui les régulent. On peut conclure à partir de toutes ces études que le mâle est nécessaire de façon continuelle pour maintenir fonctionnel le système reproducteur de la femelle. Le stimulus de la maturation sexuelle qui est certainement continu ou répétitif serait déclenché lors du contact entre les partenaires (Shaw, 1977 ; Den Hollander et Erasmus, 1985), et nécessiterait la présence de récepteurs dont la nature n'a pu être vraiment identifiée. D'un point de vue moléculaire, la compréhension des mécanismes de reproduction, notamment celui de la maturation sexuelle de la femelle, s'est traduite par une tentative d'identification de molécules associées à ces contrôles par différentes techniques biochimiques. Les techniques électrophorétiques et immunologiques n'aboutissent pas actuellement à une réelle identification de tels polypeptides ou d'antigènes pouvant caractériser la maturation sexuelle.

Par contre, les quelques études récentes réalisées en biologie moléculaire, tel que le clônage de gènes particuliers, devraient faciliter l'étude moléculaire et génétique de la maturation du schistosome femelle.

Personnellement, par l'étude électrophorétique des protéines totales des différents adultes, nous avons tenté de discriminer des protéines sexuelles et d'apporter des informations supplémentaires à cette recherche de molécules associées au contrôle de la maturation de la femelle. Notre premier objectif dans la recherche de polypeptides spécifiques de stade ou de sexe a été de comparer les cartes polypeptidiques de mâles et de femelles bisexuées, et de mâles et de femelles unisexuées, obtenues par la technique d"électrophorèse bidimensionnelle et d'en déduire s'il était possible d'isoler des polypeptides spécifiques de la différenciation ou de la maturation sexuelles. Ce travail abordé dans le cadre de D.E.A., et repris au niveau de la thèse montre une non reproductibilité des résultats, qui déjà se fait sous-jacente dans l'expression des résultats d'autres auteurs (cf. Atkinson). Ceci nous a conduit à envisager d'autres voies permettant la recherche de molécules spécifiques intervenant dans la différenciation ou la maturation sexuelles. Notre deuxième objectif a donc été de rechercher par la voie immunologique des antigènes spécifiques, qui pourraient permettre à plus long terme de créer des sondes spécifiques d'une fonction de la reproduction. Parallèlement à ces travaux, il nous a paru intéressant de caractériser différents stades larvaires, de la même manière que les adultes, dans le but de compléter l'étude réalisée sur ces derniers.

CHAPITRE II

-RESULTATS-

II.1.ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES TOTALES DU SCHISTOSOMA MANSONI ADULTE MATURE ET IMMATURE.

II.1.1.Principes des techniques électrophorétiques utilisées.

La technique d'électrophorèse, notamment celle de l'électrophorèse bidimensionnelle, nous a paru comme un bon outil d'analyse préliminaire à cette recherche de molécules particulières ; en effet, l'électrophorèse réalisée sur gel de polyacrylamide est souvent employée comme moyen de détection et d'analyse de protéines provenant de sources biologiques complexes. Les techniques d'électrophorèse couramment utilisées sont les électrophorèses monodimensionnelle et bidimensionnelle, elles permettent une séparation des polypeptides en fonction de leur mobilité électrophorétique qui dépend de un ou deux paramètres selon le type d'électrophorèse :

II.1.1.a.L'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. (sodium dodécylsulfate) sépare les protéines en fonction de leurs poids moléculaires.

le détergent S.D.S. s'adsorbe sur les protéines à raison d'environ 1g de S.D.S. adsorbé par gramme de protéines : on obtient une particule en forme de bâtonnet chargée négativement. Ainsi la mobilité électrophorétique dépend non plus de la charge globale des protéines mais de leur masse : les protéines migrent alors en fonction inverse de leur poids moléculaire qui sera déterminé à partir d'une courbe témoin semi logarithmique du poids moléculaire en fonction de la mobilité électrophorétique.

II.1.1.b.L'électrophorèse bidimensionnelle (selon O'Farrel (1975) et modifiée par Lemay (1980)) se réalise en deux étapes :

- la focalisation isoélectrique en présence d'urée et d'ampholytes sépare les protéines en fonction de leur point isoélectrique, pH auquel leur mobilité électrophorétique est nulle.
- ensuite est réalisée une deuxième séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. à partir du gel d'isofocalisation

Les protéines sont ainsi réparties dans un plan selon deux paramètres indépendants (point isoélectrique et poids moléculaire) (figure 9) ; de cette façon, il serait théoriquement possible de séparer jusqu'à 7000 protéines.

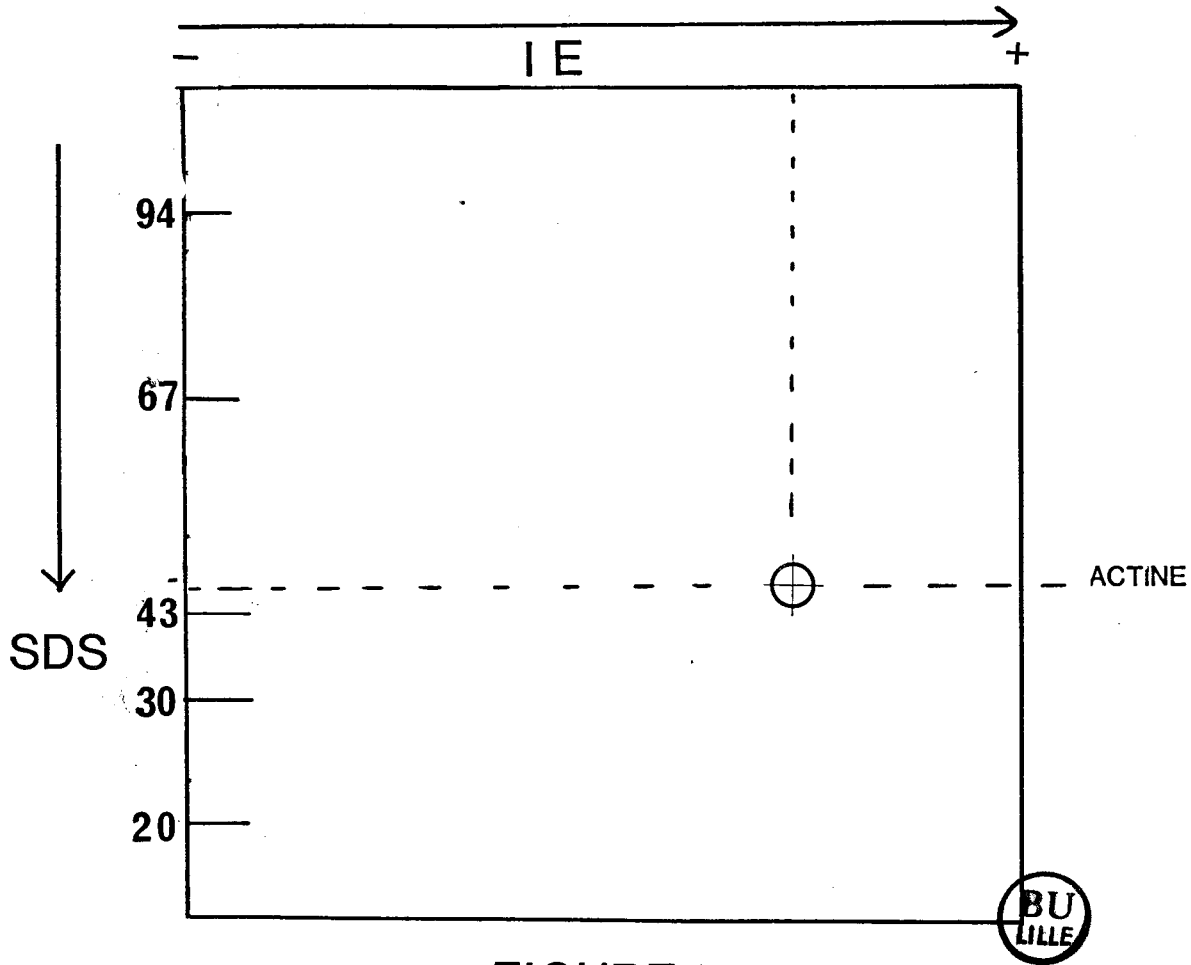


FIGURE 9

le choix des paramètres s'est fixé sur un gel à 15%, sur les protéines témoins commercialisées chez Pharmacia et sur les ampholines L.K.B. gamme large comme témoins de migration. Ainsi l'électrophorèse bidimensionnelle se réalisera toujours selon la figure ci-dessous.

Le polypeptide sera donc caractérisé par son P.M. et son pI : on le notera polypeptide P, valeur de P.M.-valeur de pI.

II.1.2.analyse des protéines d'extraits totaux de schistosomes adultes provenant d'infestation bisexuée et monosexuée par l'électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une coloration à l'argent selon Morrissey (1981).

Notre préoccupation initiale était donc de pouvoir disposer de marqueurs polypeptidiques de chacun des sexes dans une situation normale d'infection ou après un isolement sexuel. Dans le cadre du D.E.A., nous avions mis en évidence certaines différences selon ces situations particulières, notamment au niveau de la femelle provenant d'infestation monosexuée (cf. "♀ mono"). Une variation de poids moléculaire dans une zone protéique de 45 kDa, et sans variation de point isoélectrique avait été notée ; de même, l'absence d'un polypeptide majeur d'environ 48 kDa de poids moléculaire et de point isoélectrique 6.5 ainsi que celle d'un groupe polypeptidique de faible poids moléculaire avaient été remarquées. A partir de ces travaux, de nouveaux gels ont été réalisés afin de tester le degré de reproductibilité de ces résultats ; il s'est alors avéré difficile de réaffirmer la spécificité de certains polypeptides. En effet, sur les gels récents de femelles "monosexuées", il est possible d'observer le polypeptide de poids moléculaire de 48 kDa et les polypeptides de bas poids moléculaires présents bien qu'en quantité faible par rapport aux autres groupes (mâle bisexué, "♂bi" ; femelle bisexuée, "♀ bi" ; mâle monosexué , "♂mono") (cf. figure 11).

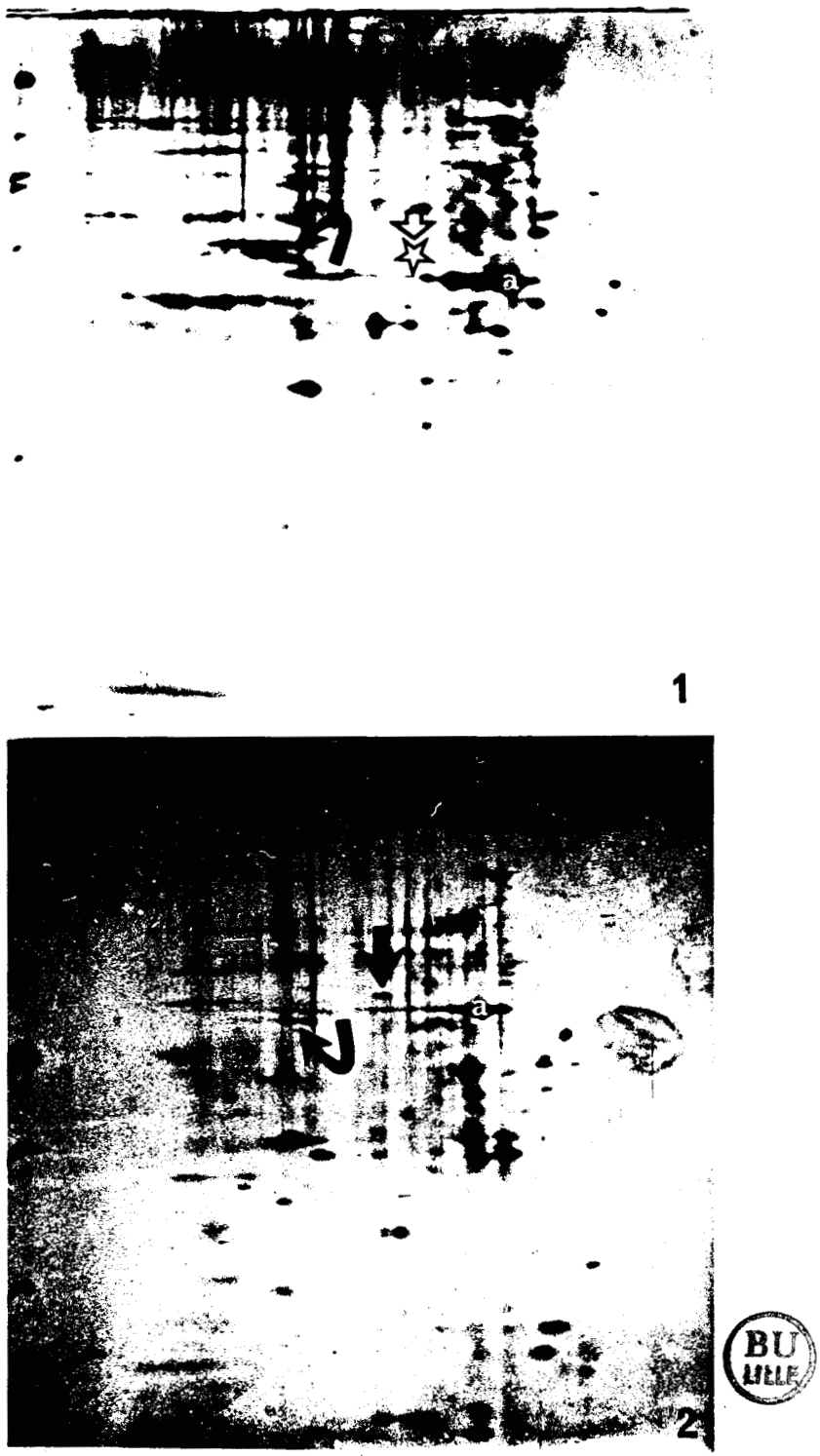
Cette non-reproductibilité des résultats apparaît aussi lors des comparaisons entre travaux similaires dans la littérature ; notamment les travaux d'Atkinson (1980), qui mettent en évidence une protéine particulière de 66 kDa, sont actuellement controversés par d'autres auteurs tels que Popiel et Basch (1984).

Personnellement, cette non-reproductibilité nous a posé le problème de la fiabilité de la technique et notamment celle de la coloration à l'argent. En effet, parallèlement dans la littérature, des auteurs (Dunn et Burghes, 1983 par exemple) ont discuté cette technique et entre autres, la difficulté de reproductibilité de cette coloration qui dépend de trop nombreux paramètres pour donner un résultat fiable à 100 %, surtout lors de l'étude de protéines totales. Nous avons donc décidé de comparer l'analyse des polypeptides colorés à l'argent avec l'analyse des polypeptides obtenus à partir d'échantillons marqués après incorporation de méthionine radiomarquée au S^{35} dans des parasites maintenus en culture in vitro.

II.1.3.analyse des protéines d'extraits totaux de schistosomes adultes par marquage métabolique avec de la méthionine ^{35} S. (figure 12a.b.c.d.)

Au premier abord, cette technique apparaît plus fiable, du fait de la sensibilité augmentée de la détection des polypeptides au niveau des cartes, due à l'imprégnation des gels par un scintillateur organique. De plus, lors d'un marquage métabolique, seuls les polypeptides propres au parasite sont discriminés.

A partir de cette nouvelle analyse, la comparaison des différents gels obtenus révèle aussi une grande similitude entre les cartes d'adultes matures et immatures, et de sexe différent (cf. fig 12 a.b.c.d.) ; les polypeptides cités dans le paragraphe ci-dessus sont présents mais de façon non spécifique chez la femelle monosexuée : ils présentent les mêmes caractéristiques que chez le mâle bisexué ou monosexué et chez la femelle bisexuée. Ainsi, à partir de ces deux analyses, on peut conclure à une carte type du schistosome adulte, quels que soient le degré de maturité et le sexe du parasite (fig. 13). Toute autre conclusion quant à la spécificité de certains polypeptides paraîtrait hâtive, du fait de la difficulté de reproductibilité mise en évidence non seulement dans nos travaux, mais aussi dans les travaux cités dans la littérature.



BU LILLE

FIGURE 10

COMPARAISON DES CARTES POLYPEPTIDIQUES

DES DIFFERENTS EXTRAITS TOTAUX DE FEMELLES MONOSEXUEES

les protéines sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide à 15% et colorées par la coloration à l'argent selon Morrissey. Le polypeptide noté "a" représente le marqueur interne de ces cartes. Les cartes récentes de femelle monosexuée (2) présentent les memes caractéristiques que les autres cartes polypeptidiques d'adultes (fig.**11**). La flèche courbe représente les différences de P.M. du triplet d'environ 45 kDa. La flèche droite (noire ou blanche étoilée) caractérise la présence ou l'absence du polypeptide de 48 kDa. Au niveau de la carte polypeptidique (2) on observe nettement les polypeptides de bas poids moléculaire.

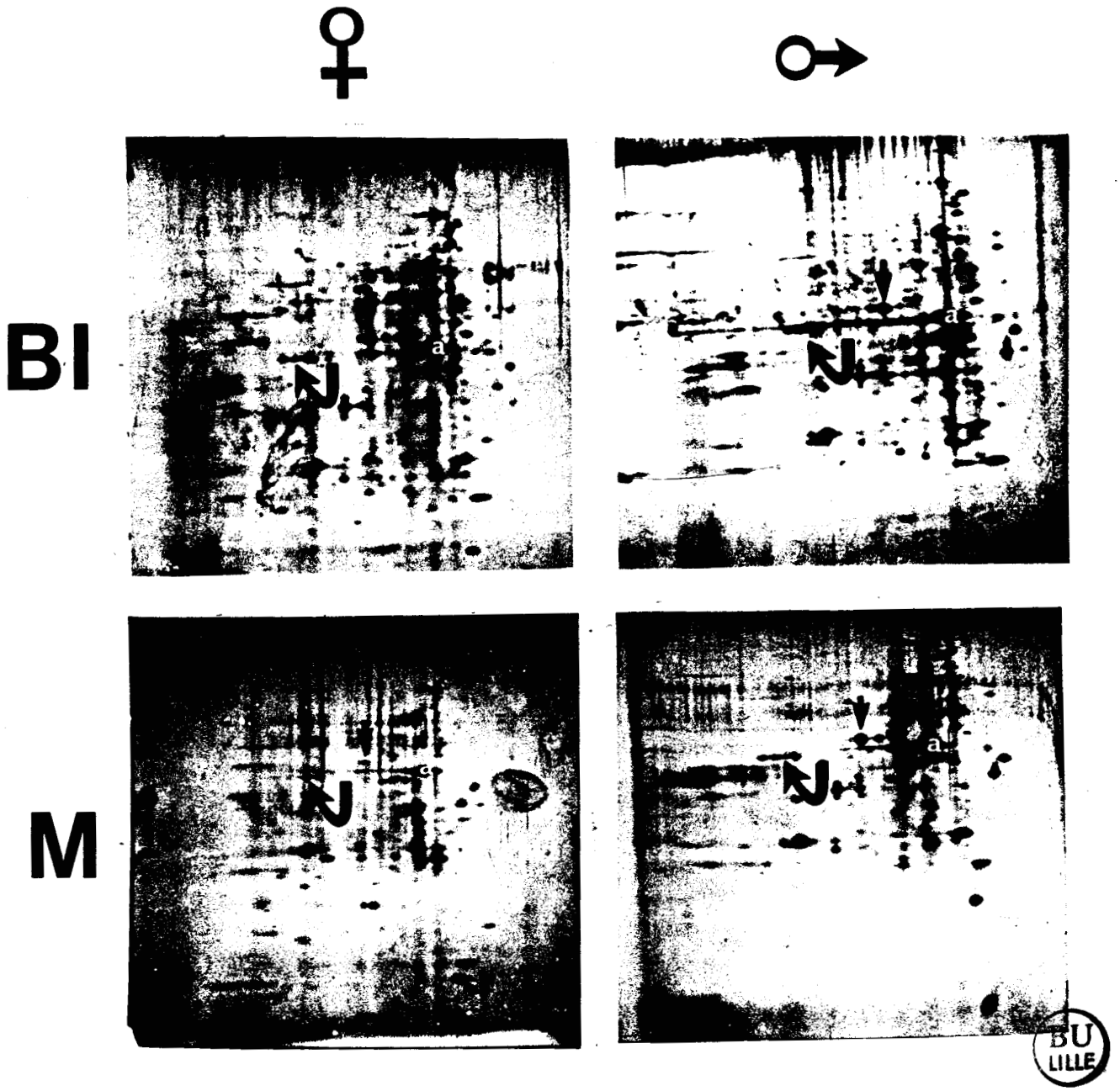


FIGURE 11

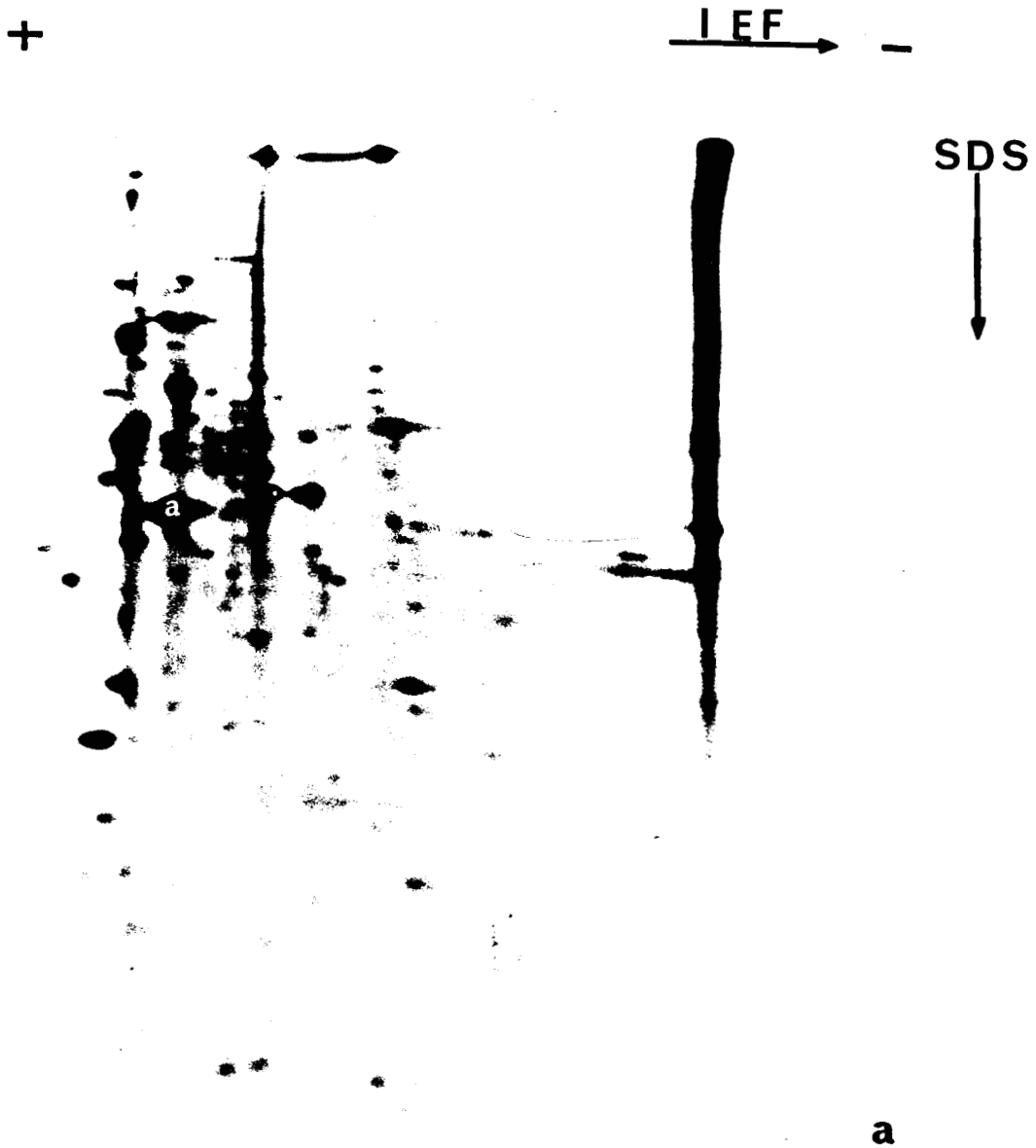
CARTES POLYPEPTIDIQUES DES DIFFERENTS EXTRAITS TOTAUX

DE SCHISTOSOMES ADULTES

Le polypeptide noté "a", l'actine, sert de marqueur interne. Les polypeptides fléchés représentent les polypeptides qui ont fait l'objet d'une étude particulière dans le mémoire de D.E.A.. Cette figure permet de mettre en évidence la grande similitude entre les différentes cartes polypeptidiques obtenues après coloration à l'argent selon Morrissey. Cette étude ainsi que celle des cartes autoradiographiques (fig.**12**) nous ont permis d'établir une carte type de schistosome adulte (fig.**13**)

FIGURE 12.a.b.c.d. : CARTES AUTORADIOGRAPHIQUES DES DIFFERENTS ADULTES

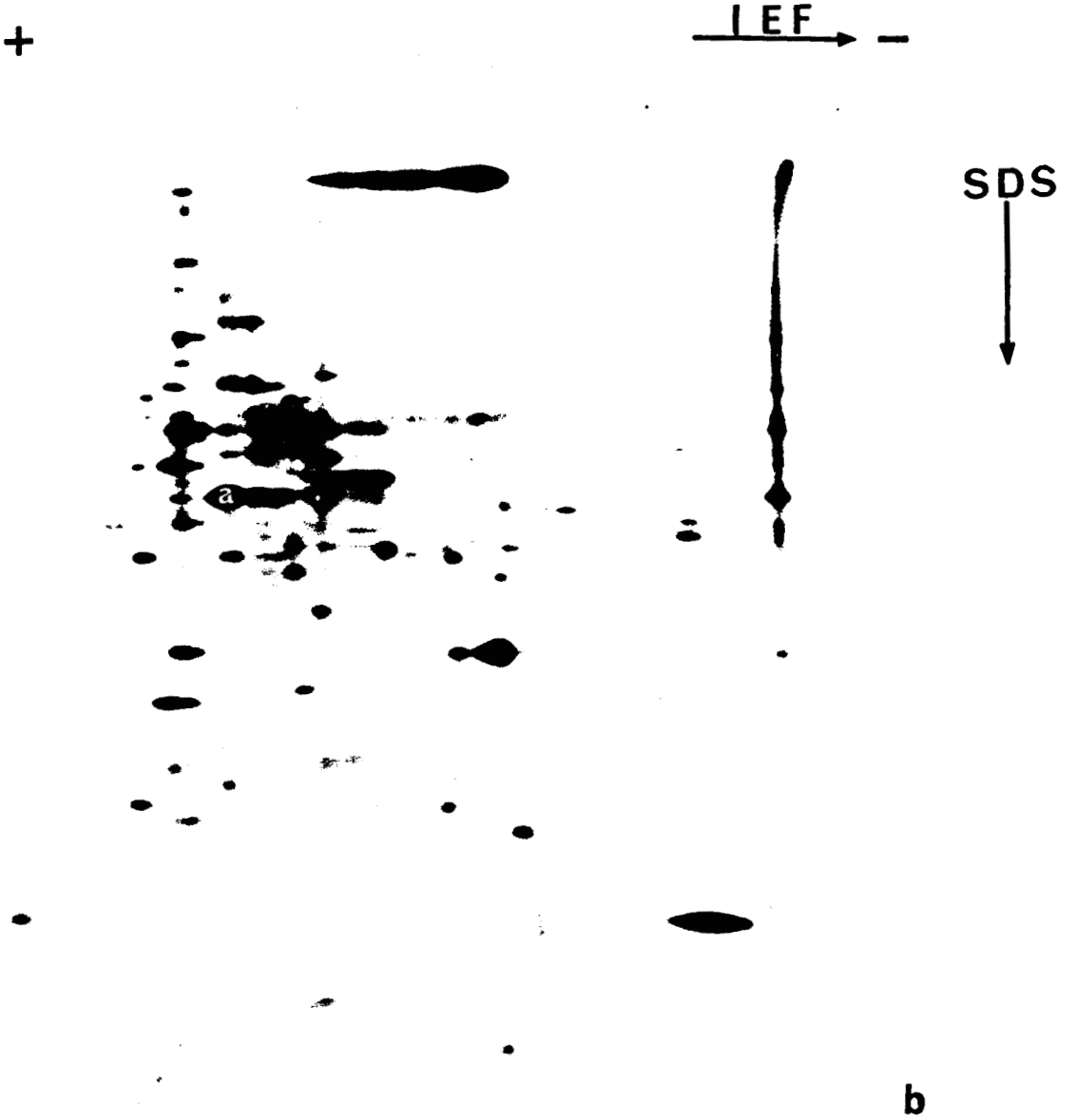
Les protéines après avoir été marquées par de la méthionine ^{35}S lors d'une incorporation in vitro de cette méthionine par les parasites, ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Les gels obtenus ont été mis en contact avec des films X.OMAT AR.5. Nous avons ainsi obtenu des cartes autoradiographiqu qui permettent d'affirmer la similitude polypeptidique existant entre les differents adultes, déjà décrite au niveau des cartes colorées à l'argent (FIG.1



a

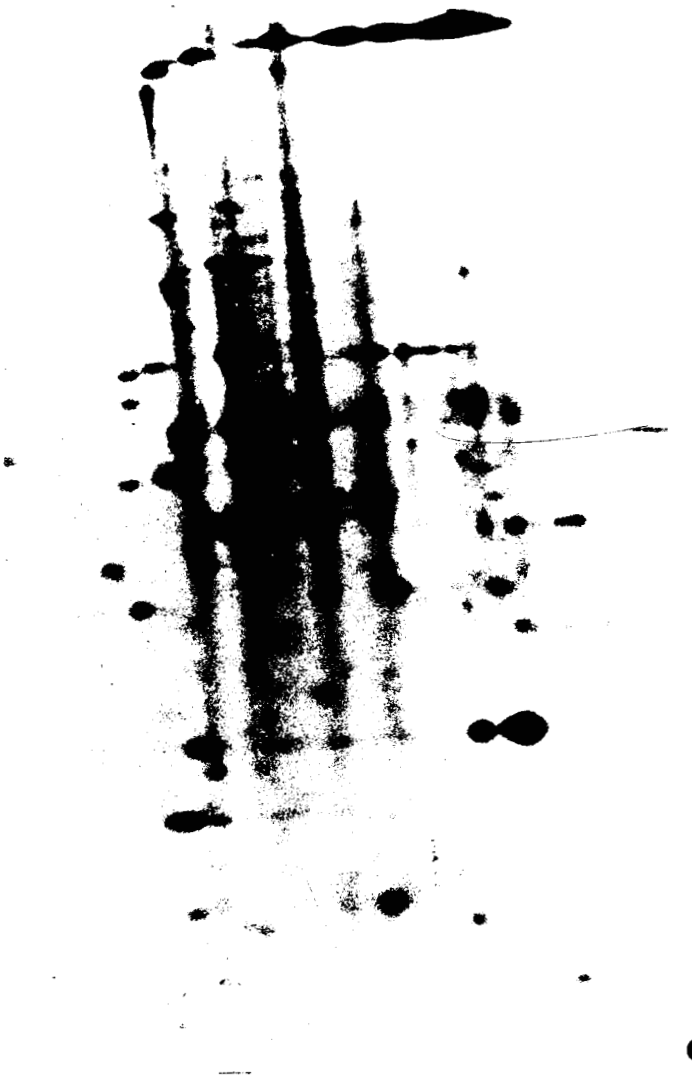
CARTE AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT TOTAL DE FEMELLE MONOSEXUEE

BU LILLE



CARTE AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT TOTAL DE MALE MONOSEXUE

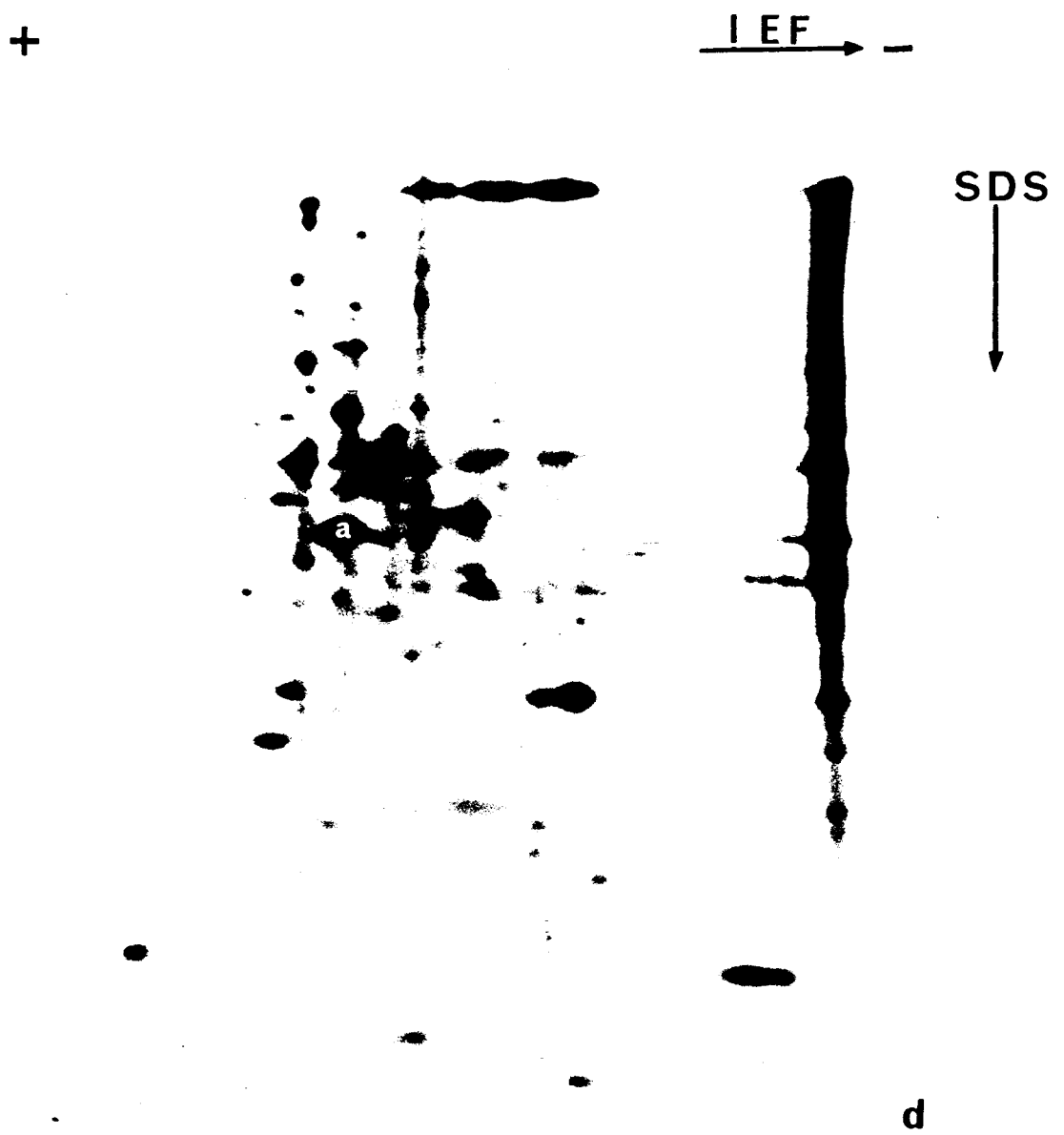
BU LILLE



C

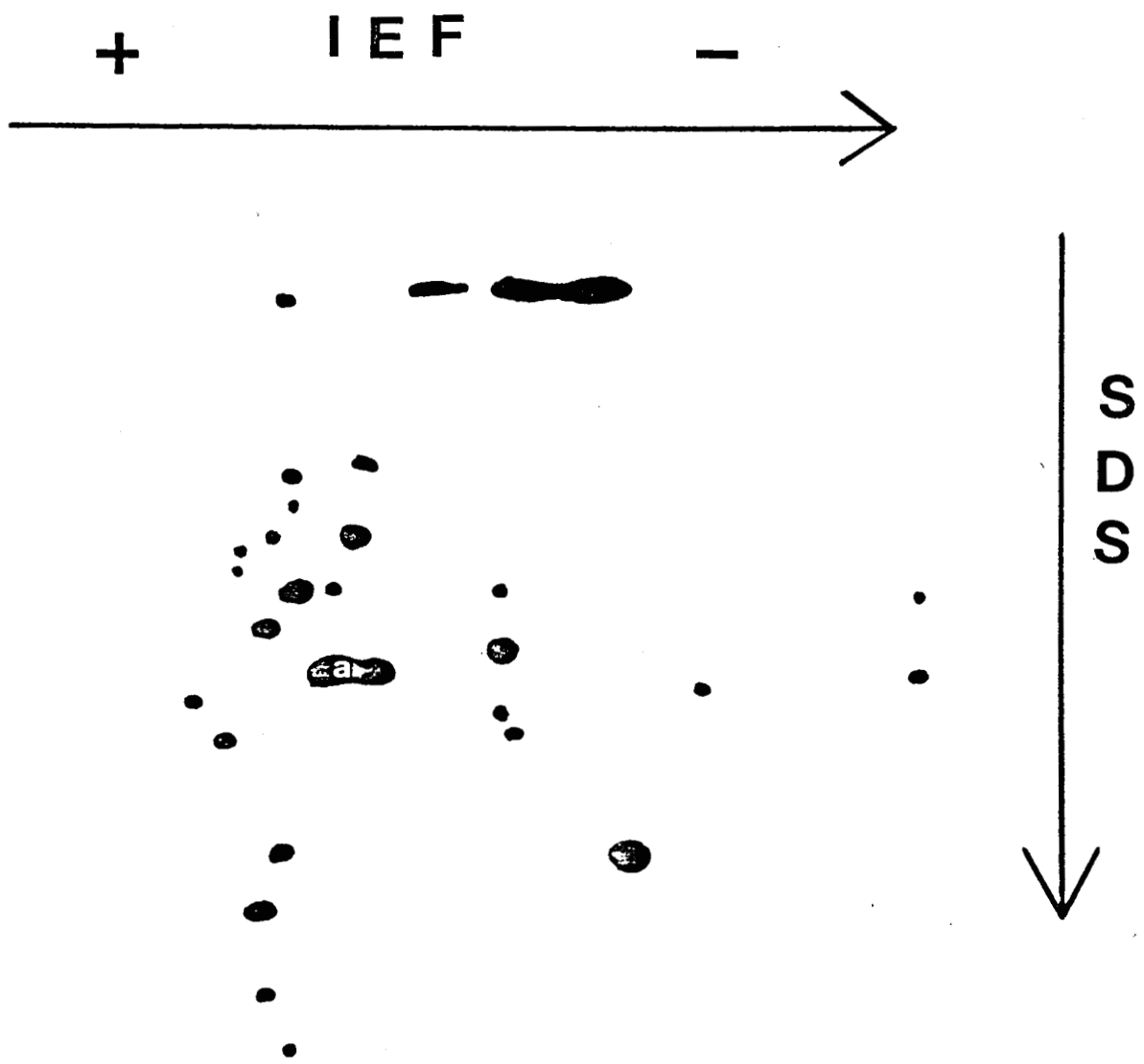
CARTE AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT TOTAL DE FEMELLE BISEXUEE

BU LILLE



CARTE AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT TOTAL DE MALE BISEXUE

BU LILLE



BU LILLE

FIGURE 13 CARTE TYPE DU SCHISTOSOME ADULTE

II.1.4. analyse électrophorétique des protéines d'extraits totaux d'oeufs de schistosomes par coloration à l'argent.

La recherche de polypeptides spécifiques de l'activation sexuelle peut aussi se réaliser par des études au niveau de l'oeuf, produit de la fécondation de l'ovule par le spermatozoide et, physiologiquement un des critères de la maturité sexuelle de la femelle.

Pour tenter d'apporter par ce biais, une nouvelle discrimination entre les femelles matures et immatures notamment, nous avons réalisé parallèlement aux autres cartes polypeptidiques d'adultes, des cartes polypeptidiques d'oeufs.

En fait, une grande similitude au niveau des cartes est encore observée : on retrouve la carte type des adultes. Cependant l'actine apparaît en quantité beaucoup plus faible que dans les cartes d'adultes. Seul, un polypeptide de poids moléculaire de 38 kDa et de point isoélectrique de 6.6 apparaît comme spécifique de ce stade "oeuf".

Puisque physiologiquement, seules, les femelles matures possèdent des oeufs, nous nous attendions à mettre en évidence cette caractéristique des protéines d'oeufs chez la femelle mature.

Or contre toute attente, ce polypeptide n'a pas été retrouvé au niveau des cartes polypeptidiques d'adultes. Plusieurs explications semblent convenir : les protéines d'oeufs présentes chez la femelle seraient soumises à un environnement différent : ainsi des modifications au niveau de ces protéines peuvent survenir telles qu'un réarrangement avec d'autres polypeptides ou une dégradation partielle qui changeraient soit le poids moléculaire, soit le point isoélectrique de la molécule.

FIGURE 14

CARTE POLYPEPTIDIQUE D'EXTRAIT TOTAL D'OEUF

Les protéines sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide à 15% et colorées par la coloration à l'argent selon Morrissey. Le polypeptide noté "a" représente le marqueur interne de ces cartes. Les cartes d'oeufs présentent un polypeptide spécifique d'environ 40 kDa et de pI 6.6 (encadré sur la figure par deux flèches).

BU LILLE

On peut aussi supposer que la quantité protéique d'oeufs chez la femelle ne représente qu'un pourcentage infime dans la quantité protéique totale de la femelle adulte et ainsi ce polypeptide ne peut être discriminé. En fait, pour étudier la présence de ce polypeptide chez la femelle mature, il faudrait l'isoler des protéines totales d'oeufs, le purifier et créer un anticorps monoclonal. Ainsi par des techniques immunoélectrophorétiques, on pourrait mettre en évidence l'existence d'un antigène possédant le même épitope que celui de l'antigène d'oeuf.

II.1.5.analyse électrophorétique d'extraits totaux de schistosomules par coloration à l'argent.

Parallèlement à la recherche de polypeptides d'activation sexuelle ou d'isolement sexuel qui concerne essentiellement les adultes, nous nous sommes intéressés à la recherche de polypeptides spécifiques d'un stade. L'analyse chez les adultes n'ayant pas mis en évidence de spécificité, nous avons étudié différents stades larvaires.

- les schistosomules mécaniques, qui imitent la cercaire transformée en schistosomule après passage à travers la peau. En effet ces larves sont obtenues par rupture mécanique de la queue ; il est d'ailleurs à peu près certain que celles-ci possèdent encore les glandes servant à la digestion des tissus lors de la pénétration.
- les schistosomules J11, qui à ce stade, semblent se desquamer, voire muer avant de devenir adulte.

FIGURE 15

CARTE POLYPEPTIDIQUE D'EXTRAIT DE SCHISTOSOMULE J11

Les protéines sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide à 15% et colorées par la coloration à l'argent selon Morrissey. Le polypeptide noté "a" représente le marqueur interne de ces cartes. Les cartes de J11 ne présentent pas de spécificité polypeptidique.

BU LILLE

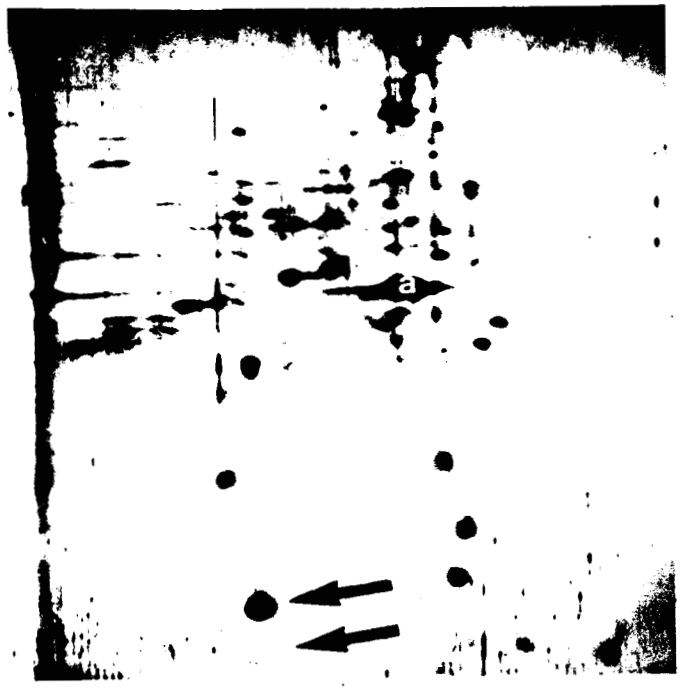


FIGURE 16

CARTE POLYPEPTIDIQUE D'EXTRAIT TOTAL DE SCHISTOSOMULE MECANIQUE

Les protéines sont séparées par électrophorèse bidimensionelle sur gel de polyacrylamide à 15% et colorées par la coloration à l'argent selon Morrissey. Le polypeptide noté "a" représente le marqueur interne de ces cartes. Les cartes de schistosomules mécaniques présentent un groupe spécifique de P.M. variant entre 20 kDa et 30 kDa.

BU LILLE

Les cartes polypeptidiques des larves ressemblent à celles des adultes. Dans ces cartes, une centaine de polypeptides a aussi été discriminée. On repère toujours l'actine, considérée comme marqueur interne, les polypeptides de bas poids moléculaires, celui de 48 kDa et le triplet de 45 kDa qui présentent les mêmes caractéristiques que chez les adultes.

Au stade J11 (figure 15), aucune spécificité polypeptidique n'a pu être mise en évidence. Par contre, au stade schistosomule mécanique (figure 16), un groupe de trois polypeptides de même point isoélectrique et de poids moléculaire variant entre 20 et 30 kDa s'avère spécifique de ce stade.

Nous pensons qu'il faut rapprocher ce résultat de ceux déjà obtenus par Balloul et col (1985) et Auriault et col (1984) qui ont mis en évidence respectivement un polypeptide de 28 kDa et de deux polypeptides de 22 et 26 kDa, antigènes de surface du schistosomule et jouant un rôle important au niveau de la protection de l'hôte.

II.1.6. Conclusion des différentes analyses électrophorétiques réalisées

La mise en évidence de polypeptides, pouvant intervenir dans le contrôle de la différenciation ou de la maturation sexuelles de par leur spécificité, n'a pu aboutir à une réelle caractérisation de ceux-ci. En effet, la reproductibilité des résultats est peu satisfaisante et bien que les techniques électrophorétiques aient prouvé leur efficacité dans la recherche de nombreuses protéines, elles ne semblent pas adaptées à l'étude de notre modèle. De ce fait, il nous a paru préférable d'orienter nos recherches vers d'autres voies, notamment immunologiques, qui devraient être encore plus sensibles au niveau de la détection de ces molécules particulières.

II.2.RECHERCHE DE MISE EN EVIDENCE DE LA PHENOLASE CHEZ LA FEMELLE AU NIVEAU DES GELS DE POLYACRYLAMIDE.

Parallèlement et toujours dans le but de différencier la femelle mature des autre stades, nous avons tenté de caractériser au niveau des cartes polypeptides monodimensionnelles, la phénolase, enzyme intervenant dans le processus du tannage des oeufs. Nos travaux sont basés sur ceux de Seed et Bennet (1980) et de Smyth (1954) pour la solubilisation de l'échantillon et sa caractérisation de l'enzyme (coloration au Fast Red). L'originalité du travail réside dans la tentative d'identification de la phénolase à partir d'un gel de polyacrylamide suivi d'un transfert sur nitrocellulose qui permet la renaturation de l'enzyme et donc sa caractérisation. Alors que dans ses travaux, Seed montre la présence de cette phénolase chez la femelle mature, nous n'avons pu la mettre en évidence par notre technique qui utilise la même méthode de solubilisation. On peut supposer que, bien que la technique de transfert soit adéquate pour ce genre ce caractérisation, la phénolase chez S. mansoni est trop fragile et s'est trouvée définitivement dénaturée et impossible à identifier.

II.3.ANALYSE IMMUNOLOGIQUE A PARTIR D'UN TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE DES PROTEINES TOTALES D'ADULTES.

Pour tester les différences immunologiques possibles de ces protéines totales, nous avons utilisé la technique d'"immunoblotting", méthode de transfert des macromolécules d'un gel à une matrice "immobilisante". En général, le transfert des protéines se réalise en deux temps :

- l'élution des polypeptides à partir du gel, basée sur le principe d'électroélution.

- et l'adsorption du matériel élué sur une matrice "immobilisante" qui est, ici, de la nitrocellulose. Cette matrice permet la renaturation des polypeptides qui pourront alors être analysés immunologiquement par rapport à des anticorps marqués à l'iode 125 ou à la péroxydase.

Les anticorps utilisés ici, sont les anticorps contenus dans les sérums d'hôte ayant été immunisés contre des mâles ou des femelles bisexués, des mâles ou des femelles monosexués ; les immunoblots de ce travail sont réalisés selon le protocole suivant : chaque source différente de protéines totales (c'est à dire provenant soit de mâle, soit de femelle, bisexués ou monosexués) subit dans un premier temps une électrophorèse monodimensionnelle puis après un transfert des protéines du gel sur nitrocellulose, est testée contre les quatre sources d'anticorps suivants : immun sérum "femelle bisexuée", immun sérum "mâle bisexué", immun sérum "femelle monosexuée", et immun sérum "mâle monosexué".

Ces différents immunoblots nous permettront ainsi de comparer le même complexe antigénique par rapport à des immuns sérums différents et parallèlement de comparer un même immun sérum par rapport à des sources antigéniques différentes.

II.3.2. Analyse des immunoblots obtenus à partir des quatre sources de protéines totales (♂bi, ♀ bi, ♂m, ♀ m) testées par rapport à l'immunsérum "antimâle bisexué" (fig. 17.2)

Poids moléculaire en kDa	complexe antigénique	♀ mono	♀ bi	♂ mono	♂ bi
200 -		140	absent	140	140
68 -					
43 -		35-40	absent	35-40	35-40
		27 kDa	absent	absent	absent
25 -		absent	absent	25 kDa	absent
18 -		absent	absent	15-20	absent

Dans ce tableau, ne sont notés que les antigènes reconnus de façon différente selon leur origine par l'immunsérum "antimâle bisexué" :

- un antigène de 140 kDa et un antigène de 35-40 kDa au niveau de tous les extraits protéiques totaux, sauf celui de la femelle bisexuée ;
- un antigène de 25 kDa et un autre de 15-20 kDa spécifiquement au niveau de l'extrait protéique total du mâle monosexué.
- un antigène de 27 kDa au niveau de l'extrait protéique total de la femelle monosexuée

BU LILLE

II.3.1. Analyse des immunoblots obtenus à partir des quatres sources de protéines totales (♂bi, ♀bi, ♂m, ♀m) testées par rapport à l'immunsérum "antifemelle bisexuée" (fig. 17.1)

Poids moléculaire en kDa	complexe antigénique	♀ mono	♀ bi	♂ mono	♂ bi
200 -					
		140	absent	140	140
68 -					
43 -					
		35-40	absent	35-40	35-40
25 -					
18 -		absent	absent	15-20	absent

Le comportement de l'immunsérum par rapport à certains antigènes est différent selon leur origine ; en effet, l'immunsérum "antifemelle bisexuée" reconnaît (cf. tableau) :

- un antigène de 140 kDa et un antigène de 35-40 kDa au niveau de tous les extraits protéiques totaux, sauf celui de la femelle bisexuée ;
- un antigène de 15-20 kDa spécifiquement au niveau de l'extrait protéique total du mâle monosexué.

BU LILLE

II.3.3. Analyse des immunoblots obtenus à partir des quatre sources de protéines totales (♂ bi, ♀ bi, ♀ m, ♂ m) testées par rapport à l'immunsérum "antifemelle monosexuée" (fig. 17.3)

Poids moléculaire en kDa	complexe antigénique	♀ mono	♀ bi	♂ mono	♂ bi
200 -					
		140	absent	140	140
68 -					
43 -					
		35-40	absent	35-40	35-40
		33	33	33	33
25 -					
18 -		18	absent	absent	absent

L'immunsérum "antifemelle monosexuée" reconnaît :

- un antigène de 33 kDa au niveau de tous les extraits protéiques
- un antigène de 140 kDa et un antigène de 35-40 kDa au niveau de tous les extraits protéiques totaux, sauf celui de la femelle bisexuée ;
- un antigène de 18 kDa spécifiquement au niveau de l'extrait protéique total de la femelle monosexuée.

BU LILLE

II.3.4. Analyse des immunoblots obtenus à partir des quatres sources de protéines totales (♂ bi, ♀ bi, ♂ m, ♀ m) testées par rapport à l'immunsérum "antimâle monosexué" (fig. 17.4)

Poids moléculaire en kDa	complexe antigénique	♀ mono	♀ bi	♂ mono	♂ bi
200 -					
		140	absent	140	140
68 -					
43 -					
		35-40	absent	35-40	35-40
		33	33	33	33
25 -					
18 -					

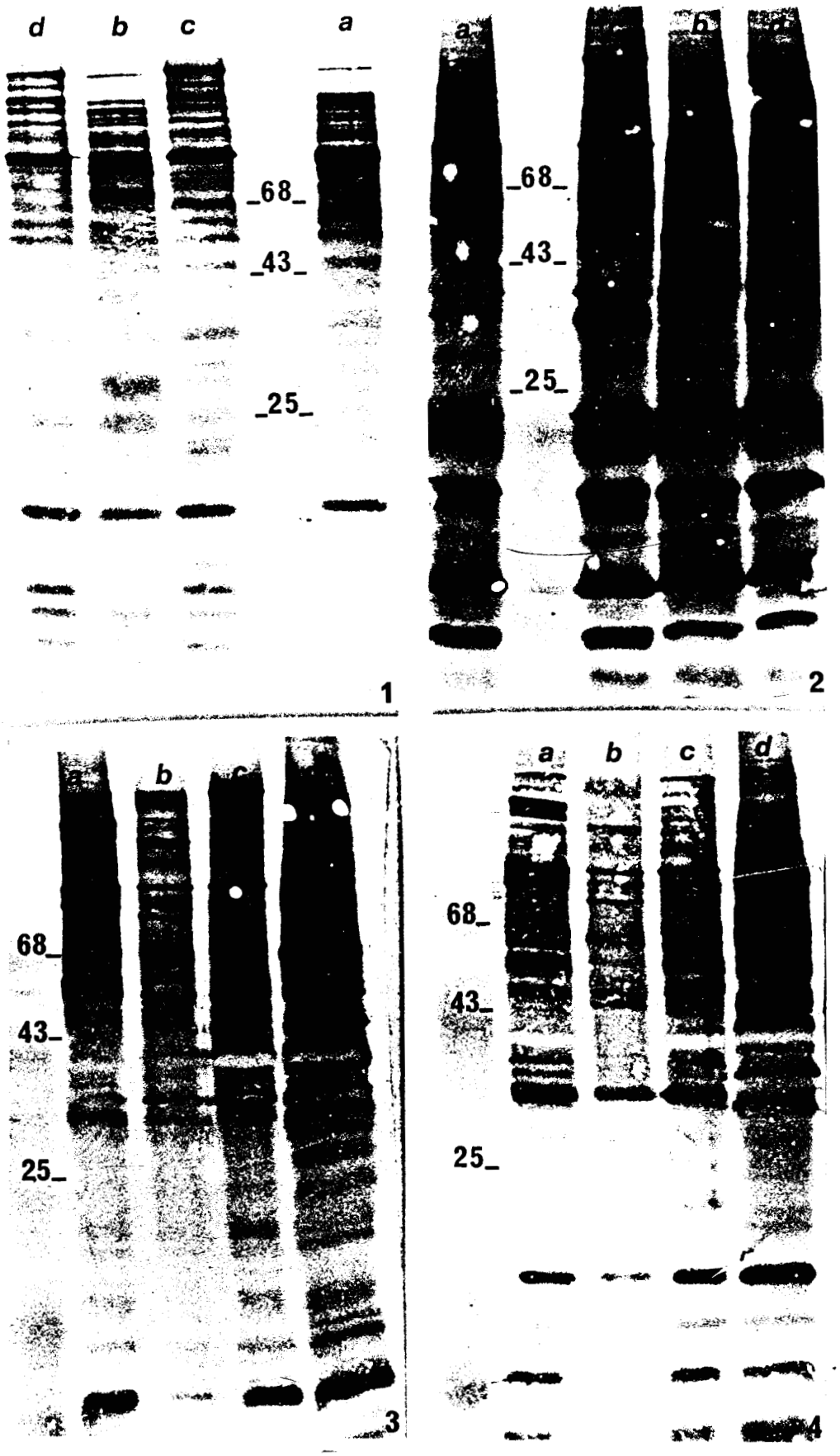
L'immunsérum "antimâle monosexué" reconnaît :

- un antigène de 33 kDa au niveau de tous les extraits protéiques
- un antigène de 140 kDa et un antigène de 35-40 kDa au niveau de tous les extraits protéiques totaux, sauf celui de la femelle bisexuée

BU LILLE

FIGURE 17

Les antigènes des différents adultes (a. mâle bisexué ; b. femelle bisexuée ; c. mâle monosexué ; d. femelle monosexuée) ont été testés par rapport à différents immuns sérums (1. sérum antifemelle bisexuée ; 2. sérum antimâle bisexué ; 3. sérum antifemelle monosexuée ; 4. sérum antimâle monosexué) à partir d'une électrophorèse monodimensionnelle suivie d'un transfert sur nitrocellulose où sont révélées les liaisons Ag.-Ac. par la méthode de révélation au D.A.B.. Les poids moléculaires témoins sont exprimés en kilodaltons (68 kDa ; 43 kDa ; 25 kDa). Cette analyse démontre une grande similitude entre les différents tests immunologiques réalisés.



BU LILLE

FIGURE 17

ANALYSE IMMUNOLOGIQUE A PARTIR
D'UN TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE
DES PROTEINES TOTALES DES DIFFERENTS ADULTES S.MANSONI

II.3.5.Discussion des résultats immunologiques obtenus

Les immunoblots ont permis de discriminer une soixantaine de bandes antigéniques ; le nombre de bandes s'explique par la nature des immuns sérums qui contiennent beaucoup d'anticorps fabriqués par l'hôte par réaction à l'immunisation de celui-ci par un organisme entier, le schistosome. L'analyse des bandes antigéniques de poids moléculaire supérieur à 30 kDa révèle une homogénéité dans les résultats obtenus, la plus grande partie de ces antigènes est reconnue de la même manière,

1°- quel que soit l'immun sérum utilisé, à part l'antigène de 33 kDa reconnu seulement par les immuns sérums "antimonosexués"

2°- quelle que soit l'origine de l'extrait protéique total, exception faite des antigènes de 140 kDa et de 35-40 kDa qui sont reconnus au niveau de tous les extraits protéiques sauf celui de la femelle bisexuée.

La cause de ces différences peut s'expliquer soit par une différence d'affinité corpale vis à vis du même antigène situé dans des conditions différentes, soit par une différence quantitative de l'antigène lui-même qui varie selon son environnement.

L'analyse des bandes inférieures à 30 kDa, par contre, révèle certaines différences de composition entre les quatre immuns sérums utilisés.

- L'immun sérum "antifemelle monosexuée" reconnaît spécifiquement l'antigène de 18 kDa, chez la femelle monosexuée.

- Les immuns sérums "antibisexués" reconnaissent spécifiquement l'antigène de poids moléculaire variant entre 15 et 20 kDa, chez le mâle monosexué.

- L'immun sérum "antimâle bisexué" reconnaît spécifiquement l'antigène de 27 kDa présent chez la femelle monosexuée et l'antigène 25 kDa présent chez le mâle monosexué.

Cette étude immunologique révèle donc quand-même une certaine homogénéité au niveau de l'immunogénicité des différentes sources protéiques utilisées. Les quelques différences antigéniques observées nous permettent, en tenant en compte les difficultés de reproductibilité des résultats, de penser que la voie immunologique permettra de créer des sondes, notamment en approfondissant l'étude de la fonction oeuf, pouvant caractériser la différenciation ou la maturation sexuelles.

II.4.DISCUSSION GENERALE.

La cause principale de la pathologie de la bilharziose étant due à une conséquence de la reproduction sexuelle (les oeufs), nous nous sommes intéressés à l'étude des protéines sexuelles et plus précisément à l'étude de polypeptides susceptibles de caractériser un état d'activation ou de différenciation sexuelles chez l'un des adultes (mature ou immature, mâle ou femelle). La finalité de cette recherche est d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes de différenciation afin de provoquer une dysrégulation dans la reproduction sexuelle du parasite Schistosoma mansoni et d'enrayer le déroulement normal du cycle parasitaire et donc de la maladie elle-même. Le choix du matériel parasitaire provenant d'infesation unisexuée plutôt que du matériel parasitaire immature s'est basé sur les études bibliographiques constatant que seule la femelle unisexuée n'a reçu aucun stimulus du mâle. Elle est donc un bon témoin à une mise en évidence d'un transfert possible de polypeptides du mâle à la femelle provenant d'infestation bisexuée. D'un point de vue technique, il faut préciser que l'obtention de parasites dits unisexués est plus délicate que celle de parasites bisexués. En effet, le rendement de récolte de parasites unisexués est beaucoup plus faible que celui obtenu pour les parasites bisexués sans que l'on puisse vraiment accorder de raison à cela, à part peut-être une mortalité chez les mollusques infestés monomiracidialement plus forte que chez les mollusques infestés de façon courante.

Notre premier objectif dans la recherche de polypeptides spécifiques de sexe ou de stade a été de comparer les cartes polypeptidiques de mâles, et de femelles bisexués, et de mâles et de femelles unisexués. De nombreux travaux déjà relatent des analyses électrophorétiques (cf. § I.2.3.d) ; l'originalité de notre travail consiste à réaliser une analyse électrophorétique suivie d'une coloration à l'argent, méthode qui n'avait pas encore été utilisée dans l'étude de notre modèle et qui est plus sensible que la coloration au bleu de Comassie. De plus, nous comparons deux techniques d'analyse électrophorétique, ce qui n'a jamais été réalisé par un auteur. En fait, l'analyse autoradiographique confirme les résultats récents obtenus par la coloration à l'argent : aucune spécificité polypeptidique n'est réellement mise en évidence, seules des différences quantitatives sont remarquées. En effet, il nous a fallu constater une difficulté dans l'obtention de résultats reproductibles, qui ne nous a pas permis de réaffirmer la spécificité de certains polypeptides. Cette anomalie se retrouve, d'ailleurs, dans la littérature et il faut certainement l'attribuer au modèle lui-même, puisque du point de vue technique, l'électrophorèse s'est révélée dans d'autres cas un outil parfaitement adapté à la recherche de protéine particulières. De même, nous considérons la coloration à l'argent comme un bon outil d'analyse dont les résultats sont comparables à ceux obtenus par autoradiographie. En effet, lorsque l'on compare les cartes obtenues par les deux types d'analyse, on observe une grande ressemblance, à part un groupe de haut poids moléculaire environnant 200 kDa et présent seulement au niveau des cartes autoradiographiques.

Dans les deux cas, nous avons conclu à une carte type du schistosome adulte (cf. figure 13) présentant une très grande similitude polypeptidique, quels que soient la maturité et le sexe du parasite. Cette constatation est importante, dans le cas où la technique du marquage métabolique se trouverait inefficace (cf. l'analyse électrophorétique de l'oeuf) car la coloration à l'argent remplace alors aisément l'autre technique.

Ainsi à partir de ces deux techniques, une centaine de polypeptides a été discriminée dans tous les cas. Cette observation rejoint celles décrites dans la littérature : Ruppel et Cioli (1977) par monodimension mettaient en évidence jusqu'à une soixantaine de bandes ; Atkinson et al (1982), et Aronstein et al (1983), par bidimension, résolvaient une centaine de polypeptides. Ces extraits protéiques totaux de S. mansoni ont été sujets de nombreux travaux et bien que la comparaison des résultats soit difficile, on peut noter que la plupart des auteurs décrivent aussi un haut degré de similitude entre les divers extraits totaux d'adultes S. mansoni (Ruppel et Cioli, 1977 ; Aronstein et Strand, 1983 ; Popiel et Basch, 1984). On peut d'ailleurs s'étonner que la synthèse abondante de protéines de coque d'oeufs, réalisée exclusivement chez la femelle mature, ne soit pas reflétée au niveau de ces cartes polypeptidiques obtenues par une technique à haut pouvoir de résolution, ainsi que les différences morphologiques et physiologiques caractérisant ces femelles matures. Nous pouvons attribuer ce résultat au fait que la quantité protéique d'oeufs ne représenterait qu'un faible pourcentage au niveau de la quantité protéique totale des femelles matures, du fait qu'une fois les vers perfusés hors de l'hôte, la production d'oeufs cesse (cf. Simpson et al., 1986).

Un des moyens à envisager pour caractériser de telles protéines serait de créer des sondes, notamment immunologiques précises pouvant caractériser une fonction telle que la vitellogénèse. L'analyse préliminaire des extraits totaux d'oeufs peut être une des techniques permettant de cerner des protéines intéressantes telles que le polypeptide de 38 kDa, qui apparaît comme spécifique du stade oeuf. Les raisons pour lesquelles les études sur les oeufs sont peu réalisées sont qu'il est difficile d'extraire les protéines d'oeufs, de par leur insolubilité. Parallèlement à cette analyse électrophorétique des protéines d'adultes, il nous a paru intéressant d'essayer de caractériser différents stades larvaires et de comparer ceux-ci aux adultes. En fait, la similitude polypeptidique entre les adultes se retrouve chez les stades larvaires schistosomules et seul, le stade schistosomule mécanique a pu être caractérisé par un groupe polypeptidique spécifique de poids moléculaires situés entre 20 et 30 kDa.

Nous pouvons donc conclure à partir de nos travaux et ceux de nombreux auteurs (Ruppel, et Cioli, 1977 ; Aronstein et Strand, 1983 ; Popiel et Basch, 1984) que l'analyse électrophorétique d'extraits totaux de parasites S.mansoni, par bidimension ou monodimension et quelle que soit la méthode de discrimination des polypeptides (Comassie, argent ou autoradiographie), ne peut à elle seule, par le manque de reproductibilité, caractériser précisément des marqueurs d'activation ou de différenciation sexuelles. C'est pourquoi, il est nécessaire d'envisager d'autres voies d'analyse qui pourront apporter des informations supplémentaires à la recherche de molécules impliquées dans le contrôle de la maturation de la femelle.

Dans nos travaux, nous avons déjà envisagé une voie immunologique en réalisant une analyse préliminaire consistant à tester ces différentes sources complexes antigéniques que représentent les différents adultes, vis à vis d'immuns sérums dirigés contre les mâles bisexués ou les femelles bisexuées ou les mâles monosexués ou les femelles monosexuées. Le but de cette analyse est d'essayer de mettre en évidence une différence d'immunogénicité entre les différents stades d'adultes. Les résultats obtenus nous laissent entrevoir la possibilité de caractériser certains adultes par des sondes antigéniques mais actuellement, de par les difficultés de reproductibilité rencontrées au niveau de l'électrophorèse, nous ne pouvons en rester qu'au stade des suppositions. Nous pensons que ces résultats de base, présentés dans ce mémoire, permettront une approche plus rationnelle d'un projet plus vaste, défini par deux objectifs :

-La poursuite des recherches de différence d'antigénicité entre les adultes, à l'aide de sondes immunologiques plus pointues, permettant de caractériser un polypeptide ou une fonction précise de la reproduction.

-La recherche, par la voie de la biologie moléculaire, de molécules associées au contrôle de la maturation sexuelle de la femelle.

CHAPITRE III

-APPENDICE TECHNIQUE-

APPENDICE TECHNIQUE

III.1.INFESTATION DES ANIMAUX DE LABORATOIRE.

Nous avons utilisé dans toutes les expériences, une souche portoricaine de Schistosoma mansoni dont le cycle biologique est maintenu au laboratoire chez le mollusque,Biomphalaria glabrata et chez le hamster doré, Mésocricetus auratus.

-Chez l'hôte intermédiaire Biomphalaria glabrata

-1°)Exposition des mollusques pendant deux heures à la lumière, à une température de 30°C dans une solution contenant les miracidies.

-pour une infestation courante, le mollusque est infesté en moyenne par sept miracidies.

-pour une infestation monomiracidiale, un mollusque est infesté par une miracidie et une seule.

-2°)Vingts jours après l'infestation, baisse de la température de l'aquarium vers 20°C et mise à l'obscurité de celui-ci.

-Chez l'hôte expérimental définitif Mésocricetus auratus.

Quelque soit le type d'infestation retenu, la transmission des cercaires à l'hôte définitif est réalisée de la façon suivante :

-anésthésie du hamster avec de l'imalgène 1000 à raison de 0,2ml pour 100g de poids.

-rasage de l'abdomen du hamster et dépôt d'un anneau sur celui-ci.

-dépôt de la suspension de cercaires dans l'anneau ; pour une infestation de 40jours (obtention d'adultes), la suspension contient 500 à 1000 cercaires ; pour une infestation de 11 jours (obtention de J11), la suspension contient 5000 à 10000 cercaires.

III.2.COLLECTE DES PARASITES.

-Cercaires

exposition des mollusques infestés depuis 27 jours entre 30mn à 2heures à la lumière, à une température de 30°C.

récupération et concentration des cercaires par ascencion vers une source lumineuse.

-Schistosomules mécaniques

répartition des cercaires dans des tubes coniques en verre à raison de 2.10 cercaires par tube.

immobilisation et sédimentation des cercaires en plaçant les tubes dans la glace pendant 15mn.

remise en suspension des cercaires dans 2ml d'eau.

agitation de cette suspension sur "Vortex" pendant 2mn et rupture des queues.

récupération des queues sur coussin isotonique de Percoll à 54% dans du milieu M.E.M non concentré.

centrifugation de 1000tours/mn pendant 10mn à +4°C.

récupération du culot contenant les têtes ; plusieurs lavages de celui-ci par du M.E.M non concentré puis par du sérum physiologique.

-Stade J11

mort des hamsters par dislocation cervicale.

isolement du foie.

perfusion des veines hépatiques par du milieu M.E.M .

purification des J11 sur gradient de Percoll par centrifugation à 2500 tours/mn pendant 20 mn.

lavages dans du sérum physiologique.

-Schistosomes adultes J40

mort des hamsters par dislocation cervicale.

récolte des parasites au niveau des veines portales et mésentériques par prélèvement du sang à l'aide d'une pipette Pasteur.

lavages des parasites ainsi récoltés dans du milieu M.E.M. puis dans du sérum physiologique.

les parasites sont triés en fonction de leur sexe, et à l'aide d'un fin pinceau.

-Oeufs (d'après Baltz et al., 1982)

broyage du foie dans du NaCl 0,15M à raison de 20ml par foie.

filtration préliminaire et grossière sur gaze de 330µm de diamètre.

filtration fine sur gradient composé de 20% de Percoll dans une solution finale de 0,25M de sucrose.

lavages des oeufs ainsi purifiés dans du sérum physiologique.

tout le travail s'effectue à +4°C pour éviter l'éclosion de ces oeufs.

-Miracidies

les oeufs récupérés par broyage du foie sont exposés à la lumière et à une température de 30°C pour provoquer l'éclosion des miracidies.

III.3.SOLUBILISATION DU MATERIEL PARASITAIRE

La solubilisation des parasites se réalise toujours par sonication mais dans des tampons différents selon le but recherché.

-pour l'electrophorèse bidimensionnelle sans marquage métabolique : tampon de lyse à raison de 5µg de protéines par ul de tampon.

-Pour 5ml final,

-5g70 d'urée ultrapure (SCHWARZMAN).

-2ml de NP40 à 10% (P/V).

-500µl d'ampholines (L.K.B.).

-0,5ml de mercaptoéthanol (Kodak) à 5%.

sonication puis traitement par de la nucléase micrococcal : pour 20µl d'échantillon, 1 à 2µl de nucléase.

-pour électrophorèse bidimensionnelle après marquage métabolique : tampon PBS/NP40 à 0,05%

-pour électrophorèse monodimensionnelle : tampon d'échantillon,

-6,25ml de TRIS HCl 62.5mM pH 6,8.

-1,5g de S.D.S. .

-5g de sucrose.

-5ml de mercaptoéthanol.

-qsp 50ml d'eau distillée.

III.4.MARQUAGE METABOLIQUE DES SCHISTOSOMES AVEC DE LA METHIONINE ^{35}S EN CULTURE IN VITRO.

-1°)-collecte stérile des parasites au niveau de la veine mésentérique

-lavages stériles des parasites avec du M.E.M. normal.

-dernier lavage dans du M.E.M. ne contenant pas de méthionine.

-2°)-incubation des parasites dans ce milieu pendant 1heure à 37°C à raison de 20 parasites par puits de culture.

-renouvellement du milieu à raison de 1,5ml de milieu pour 20 vers.

-addition de 100µCi de méthionine ^{35}S.

-incubation une nuit à 37°C.

-3°)-lavages des parasites après incubation dans du milieu M.E.M.normal.

-homogéneisation dans du tampon PBS/NP40 à 0,05%.

-4°)-détermination de la radioactivité TCA-précipitable :

-traitement de 1µl d'homogénat dans 500µl d'eau distillée par 0,25ml d'une solution de soude 1N contenant 0,68mM de méthionine froide et 0,68% d'H_2O_2.

-incubation à 37°C pendant 15mn.

-arrêt de la réaction par 1ml de TCA 25%.

-lavage de la solution sur filtre papier Wathman par du TCA 8%.

-comptage dans des fioles contenant 5ml d'Aqualyte (Becker chemical.Holland), dans un compteur ISOCAP 300 (Nuclear Chicago USA)

III.5.ELECTROPHORESES.

III.5.1.Focalisation isoélectrique (O'Farrel modifiée par Lemay).

Elle est réalisée dans des tubes de 130mm de long et 4mm de diamètre dans un gradient d'ampholines 3.5-9.5 (L.K.B.).

-composition du gel pour 5ml final :

-0,67ml de mélange d'acrylamide 24%-bisacrylamide 1,62% (B.D.H.).

-1ml de NP40 à 10% P/V.

-0.99ml d'eau stérile pure.

-250µl d'ampholines (L.K.B).

-3,5µl de T.E.M.E.D. .

-6µl de persulfate d'ammonium.

-composition des tampons de cuve :

-à la cathode : soude 20 millimolaire.

-à l'anode : acide orthophosphorique 10 millimolaire.

-migration :

-prémigration à 200volts pendant 1/4 d'heure.

-.....à 300volts pendant 1/2 heure.

-.....à 400volts pendant 1/2 heure.

-migration : à 400 volts pendant 19 heures.

-équilibration des gels après migration.

-pour un gel,

-10,5ml d'eau stérile déminéralisée.

-2,5ml de tampon TRIS HCl 1,25M pH 6,8.

-4ml de S.D.S. à 10%.

-1ml de mercaptoéthanol.

-relevé du gradient de pH.

le gel témoin est découpé cm par cm ; chaque morceau est élué dans 2ml d'eau stérile déminéralisée. Le pH des échantillons étant obtenu selon la relation linéaire suivante : pH proportionnel à la distance de migration.

III.5.2.Electrophorèse en présence de S.D.S.

Les molécules sont séparées dans un gel de polyacrylamide avec S.D.S. lors d'une migration électrique à 25 volts constants par gel pendant une nuit.

-composition du gel de réticulation à 15%.

-pour 65ml final,

-19,5ml de mélange d'acrylamide 50%-bisacrylamide 0,235%.

-8,2ml de tampon TRIS HCl 3,5M pH 8,9.

-650µl de persulfate d'ammonium à 10% (P/V).

-650µl de S.D.S à 10% (P/V).

-65µl de TEMED.

-qsp 65ml d'H_2O_2.

-tampon de recouvrement lors de la polymérisation du gel :

-1,5ml de TRIS HCL 3,5M pH 8.9.

-100µl de S.D.S. à 10%.

-qsp 10ml d'eau déminéralisée.

-composition du gel de concentration.

-pour 10ml final :

-1ml du mélange d'acrylamide 50%-bisacrylamide 1,33%.

-1ml de TRIS HCl 1,25M pH 6,8.

-100µl de S.D.S à 10% (P/V).

-100µl de persulfate d'ammonium à 10% (P/V).

-10µl de TEMED.

-tampon de cuve pour bidimension :

6g/l de TRIS.

-28,8g/l de glycocolle.

-1g/l de S.D.S. .

-tampon de cuve pour monodimension :

-3g/l de TRIS.

-14,4g/l de glycocolle.

-1g/l de S.D.S. .

III.6.ANALYSE DES GELS

-III.6.1.Coloration au bleu de Comassie.

-0,85g de bleu de Comassie.

-500ml de méthanol.

-100ml d'acide acétique.

-qsp 1litre d'eau déminéralisée.

agitation pendant 15mn à 1heure.

décoloration des gels dans une solution de méthanol à 20% et d'acide acétique à 8%.

-III.6.2.Coloration à l'argent (Morrissey, 1981).

-préfixation dans :

-1°) 50% de méthanol et 10% d'acide acétique pendant 30mn.

-2°) 5% de méthanol et 7% d'acide acétique pendant 30mn.

-3°) 10% de glutaraldéhyde pendant 30mn.

-lavages pendant deux heures dans de l'eau distillée.

-coloration dans :

-1°) DTT à 5µg/ml.

-2°) $AgNO_3$ à 0,1%.

-3°) rinçage rapide dans de l'eau distillée.

-révélation dans du NA_2CO_3 additionné de formaldéhyde à 0,05%.

-arrêt de la révélation par de l'acide citrique à 5%.

-III.6.3.Autoradiographie.

Les gels sont séchés sous vide dans un appareil HOEFFER SE 160 puis mis en contact avec un film X-OMAT AR.5 (Eastman Kodak).

-III.6.4.Immunoblotting.

les gels sont mis en contact avec de la nitrocellulose dans un tampon de transfert :

-TRIS HCl 20mM pH 8.9.

-glycine 150mM.

-méthanol à 20% .

-migration pendant trois heures à 60 volts.

-après la migration, la nitrocellulose est traitée de la façon suivante :

-saturation de la nitrocellulose par PBS/BSA à 5% toute la nuit à +4°C.

-incubation de la nitrocellulose en présence de l'anticorps (ici, du sérum d'hôte infesté) dans PBS/BSA 5% pendant 3heures à température ambiante.

-lavages pendant 10mn avec PBS/Tween à 1%. .

-incubation avec de l'antiIgG total antilapin de chèvre au 1/2000ème marqué à la péroxydase.

-lavages nombreux avec du PBS/Tween à 1%. .

-révélation avec 50mg de diaminobenzidine dans 100ml de PBS et 100µl d'H_2O_2

-rinçages abondants à l'eau.

III.7.OBTENTION D'IMMUNS SERUMS ANTISCHISTOSOMES ADULTES.

-Immunisation de lapin par voie intradermique, selon le méthode de Vaitukatis en présence d'adjuvant complet de Freund et de vaccin anticoquelucheux (Perthydral) injecté par voie sous-cutanée.

-On immunise les lapins avec un broyat de schistosomes correspondant à l'immun sérum désiré (antimâle bisexué, antimâle monosexué, antifemelle bisexuée ou antifemelle monosexuée). Ce broyat est obtenu par sonication des parasites dans du sérum physiologique.

-Les immuns sérums utilisés dans nos travaux sont récupérés chez le lapin deux mois et demi après l'immunisation.

CHAPITRE IV

-BIBLIOGRAPHIE-

BIBLIOGRAPHIE

ARMSTRONG, J.C. (1965) Mating behaviour and development of schistosomes in the mouse. Journal of Parasitology, 51, 605-616.

ARONSTEIN, W. and STRAND, M. (1983) Identification of species-specific and gender-specific proteins and glycoproteins of three human schistosomes. Journal of Parasitology, 69, 1006-1017.

ARONSTEIN, W. and STRAND, M. (1984) Gender-specific and pair-dependant glycoprotein antigens of schistosoma mansoni. Journal of Parasitology, 70, 545-557.

ATKINSON, B.G. and ATKINSON, K.H. (1982) Schistosoma mansoni : one and two dimensional electrophoresis of proteins synthesized in vitro by males, females and juveniles. Experimental Parasitology, 53, 26-38.

ATKINSON, K.H. and ATKINSON, B.G. (1980) Biochemical basis for the continuous copulation of female schistosoma mansoni. Nature, 283, 478-479.

AURIAULT, C. ; DAMMONNEVILLE, M. ; VERWAERDE, C. ; PIERCE, R.J. ; JOSEPH, M. ; CAPRON, M. and CAPRON, A. (1984) Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for Schistosoma mansoni schistosomula in vitro. European Journal of Immunology, 14, 132-138.

AWWAD, M. and BELL, D.R. (1978) Faecal extract attracts copulating schistosomes. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 72, 389-390.

BALLOUL, J.M. ; PIERCE, R.J. ; GRZYCH, J.M. and CAPRON, A. (1985) In vitro synthesis of a 28kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of Schistosoma mansoni Molecular and Biochemical Parasitology, 17, 105-114.

BALTZ, T. ; LACASSIE, I. ; TRIBOULEY, J. ; TRIBOULEY, J. (1982) Density-gradient separation of schistosoma mansoni eggs. Journal of Parasitology, 68, 963-965.

BARRABES, A. ; DUONG, T.H. and COMBESCOT, C. (1979) Effet de l'administration d'implants de testostérone ou de progestérone sur l'intensité de la parasitose expérimentale à schistosoma mansoni du hamster doré femelle. Compte-rendu de la société biologique, 173, 153-156.

BELL, E.J. and SMYTH, J.D. (1958) Cytological and histochemical criteria for evaluation of development of trematodes and pseudophyllidian cestodes in vivo and in vitro. Parasitology, 48, 131-149.

BERG, E. (1957) Effect of castration and testosterone in male mice on schistosoma mansoni. Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 51, 353_358.

BURTON, P.R. (1967) Fine structure of the reproductive system of a frog lung fluke. II. Penetration of the ovum by a spermatozoon. Journal of Parasitology, 53, 994-999.

CLOUGH, E.R. (1981) Morphology of reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature schistosoma mansoni. Journal of Parasitology, 67, 535-539.

CORNFORD, E.M. and HUNT, M.E. (1981) Glucose transfer from male to female schistosomes. Sciences, 213, 1269-1271.

DAVIES, P. and JACKSON, H. (1970) Experimental studies on the chemosterilization of schistosoma mansoni .
Parasitology,61,167-176.

DEN HOLLANDER, J.E. and ERASMUS, D.A. (1985) Schistosoma mansoni : male stimulation and DNA synthesis by the female. Parasitology, 91, 449-457.

DUNN, M.J. and BURGHES, A.H.M. (1983) High resolution two dimensional polyacryamide gel electrophoresis. Trends in analytical chemistry, 9, 211-214.

ERASMUS, D.A. (1973) A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual female schistosoma mansoni. Parasitology, 67, 165-183.

ERASMUS, D.A. (1975) Schistosoma mansoni : Development of the vitellin cell, its role in drug sequestration, and changes induced by Astiban. Experimental Parasitology, 38, 240-256.

ERASMUS, D.A. and DAVIES, T.W. (1979) Schistosoma mansoni and S.haematobium : Calcium metabolism of the vitellin cell. Experimental Parasitology, 47, 91-106.

ERASMUS, D.A. and POPIEL, I. (1980) Shistosoma mansoni : Drug induced changes in the cell population of the vitellin gland. Experimental Parasitology, 50, 171-187.

ERASMUS, D.A. ; POPIEL, I. and SHAW, J.R. (1982) A comparative study of the vitellin cells in schistosoma mansoni, schistosoma haematobium and schistosoma matthei. Parasitology, 84, 283-287.

FAIRLEY, N.H. (1920) A comparative study of experimental bilharziasis in monkeys contrasted to the hitherto described lesions in man. Journal of Pathology and Bacteriology, 23, 289-314.

FAUST, E.C. ; JONES, C.A. and HOFFMAN, W.A. (1930) Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. II. Biological studies. 2. the mammalian phase of the life cycle Puerto Rican. Journal of Public Health and Tropical Medicine, 10, 133-196.

FLOYD, R.D. and NOLLEN, P.M. (1977) Effects of stressfull conditions on the development and movement of reproductive cells in schistosoma mansoni. Journal of Parasitology, 63, 87-90.

GONNERT, R. (1955) Schistosomiasis. Studien. I Beitrage zur anatomie und histologie von schistosoma mansoni. Zeitschrift fÜr Tropenmedicin und Parasitology, 6, 16-33.

HIGGINS-OPITZ, S.B. (1983) Observations by scanning electron microscopy of miracidial hatching from schistosoma mansoni ova. Journal of Parasitology, 69, 432-433.

HOCKLEY, D.J. (1968) Scanning and transmission electron microscopy of schistosoma mansoni eggs, cercariae and adults. Annales of journal tropical medicine hygiene,20, 914-920.

IMPERIA, P.S. ; FRIED, B. and EVELAND, L.K. (1980) Pheromonal action of Schistosoma mansoni females toward mâles in the absence of worm tactile behavior. Journal of Parasitology, 66, 682-684.

JUSTINE, J.L. and MATTEI, X. (1981) Etude ultrastructurale du flagelle spermatique des schistosomes (Trematoda : Digenea). Journal of ultrastructural research, 76, 89-95.

KITAJIMA, E.W. ; PARAENSE, W.L. and CORREA, L.R. (1976) The fine structure of schistosoma mansoni. Journal of Parasitology, 62, 215-221.

KNIGHT, M. ; SIMPSON, A.J.G., KELLY, C. and SMITHERS, S.R. (1986) The cloning of schistosome genes encoding antigenic and maturation-linked polypeptides. Parasitology, 91, 539-551.

LENNOX, R.W. and SCHILLER, E.L. (1972) Changes in dry weight and glycogen content as criteria for measuring the post-cercarial growth and development of schistosoma mansoni. Journal of Parasitology, 58, 489-494.

LEVERT, R.M. and LEE, C.L. (1954) Studies on the passage of helminth larvae trough tissues. I. Histochemical studies of extracellular changes caused by penetration larvae. II. Enzymatic activity of larvae in vitro and in vivo. Journal of infectious diseases, 95, 13-25.

MACHADO, A.B.M. ; HENRIQUES DA SILVA, M.L. and PELLEGRINO, J. (1970) Mechanism of action of thiosinamine, an egg suppressive agent in schistosomiasis. Journal of parasitology, 56, 392-393.

MICHAELS, R.M. (1969) Mating of schistosoma mansoni in vitro. Experimental Parasitology, 25, 58-71.

MOORE, D.V., YOLLES, T.K. and MELENEY, H.E. (1954) The relationship of male worms to the sexual developmentof female schistosoma mansoni. Journal of Parasitology, 40, 166-185.

MORRISSEY, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Analytical biochemistry, 117, 307-310.

NOLLEN, P.M. ; FLOYD, R.D. ; KOLZOW, R.G. and DETERS, D.L. (1976) The timing of reproductive cell development and movement in schistosoma mansoni, shistosoma japonicum and schistosoma haematobium using techniques of autoradiography and transplantation. Journal of Parasitology, 62, 227-231.

O'Farrel, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of biological chemistry, 250, 4007-4021.

OLIVIER, L. and MAO, C.P. (1949) The early larval stages of schistosoma mansoni (Sambon, 1907) in the snail host, australorbis glabratus (Say, 1818). Journal of Parasitology, 35, 267-270.

O.M.S. : note d'information O.M.S. n°18, mai 1982.

OTUBANJO, O.A. (1980) Schistosoma mansoni : the ultrastructure of the ducts of the male reproductive system. Parasitology, 81, 565-571.

POPIEL, I. and BASCH, P. (1984) Putative polypeptide transfer from male to female schistosoma mansoni. Molecular and Biochemical Parasitology, 11, 179-188.

POPIEL, I. ; CIOLI, D. and ERASMUS, D.A. (1984) The morphology and reproductive status of female schistosoma mansoni following separation from male worms. International Journal for Parasitology, 14, 183-190.

POPIEL, I. and ERASMUS, D.A. (1981. a) Schistosoma mansoni : Niridazole induced damage to the vitellin gland. Experimental Parasitology, 552, 35-48.

POPIEL, I. and ERASMUS, D.A. (1981. b) Schistosoma mansoni : changes in the rate of tyrosine uptake by unisexual females after stimulation by males extract. Journal of Helminthology, 55, 33-37.

RUPPEL, A. and CIOLI, D. (1977) A comparative analysis of various developmental stages of schistosoma mansoni with respect to their protein composition. Parasitology, 75, 339-343.

RUPPEL, A. ; ROTHER, U. ; VONGERICHTEN, H. ; LUCIUS, R. and DIESFIELD, H.J. (1985) Schistosoma mansoni : Immunoblot analysis of adult worm proteins. Experimental Parasitology, 60, 195-206.

SEED, J. and BENNET, J. (1980) Schistosoma mansoni : Phenol oxydase's role in eggshell formation. Experimental Parasitology, 49, 430-441.

SEED, J. ; BOFF, M. and BENNET, J. (1978) Phenol oxydase activity : induction in female schistosome by in vitro incubation. Journal of parasitology, 64, 283-289.

SEVERINGHAUS, A.E. (1982) Sex studies on schistosoma japonicum. Quaterly journal of microscopical sciences, 71, 635-702.

SHAW, J.R. (1977) Schistosoma mansoni : pairing in vitro and development of females from single sex infections. Experimental parasitology, 41, 54-65.

Shaw, J.R. and ERASMUS, D.A. (1981) S.mansoni : an examination of the reproductive status of females from single sex infections. Parasitology, 82, 121-124.

SHAW, J.R. ; MARSHALL, I. and ERASMUS, D.A. (1977) Schistosoma mansoni : in vitro stimulation of vitellin cell development by extract of male worms. Experimental Parasitology, 42, 14-20.

SHIRAZIAN, D. and SCHILLER, E.L. (1982) Mating recognition by Schistosoma mansoni in vitro. Journal of Parasitology, 68, 650-652.

SHORT and GROSSMANN, (1981) Conventional Giemsa and C.banded karyotypes of S.mansoni and S.Rodhaini. Journal of Parasitology, 67, 661-671.

SIMPSON, A.J.G. and KNIGHT, M. (1986) Cloning of a major developmentally regulated gene expressed in mature females of Schistosoma mansoni Molecular and biochemical Parasitology, 18, 25-35.

SIMPSON, A.J.G. ; SHER, A. and Mc CUTCHAN, T.F. (1982) The genome of Schistosoma mansoni : isolation of D.N.A., its size, bases and repetitives sequences. Molecular and Biochemical Parasitology, 6, 125-137.

SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1976) The immunology of schistosomiasis. Advances in Parasitology, 14, 399-422.

SMYTH,J.D. (1954) A technique for the histochemical demonstration of polyphenol oxydase and its application to eggshell formation in helminths and byssus formation in mytilus. Quaterly journal of microscopical science, **95**, 139-152.

STIREWALT, M.A. and KRUIDENER, F.J. (1961) Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of schistosoma mansoni under experimental conditions. Experimental Parasitology, 11, 191-211.

TORPIER, G. ; CAPRON, M. and CAPRON, A. (1977) Structural changes of the tegumental membrane complex in relation to developmental stages of S.mansoni Journal of ultrastructural research, 61, 309-324.

TORPIER, G. ; HIRN, M.H. ; NIRDE, P. ; DE REGGI, M.L. and CAPRON, A. (1982) Detection of ecdysteroids in the human trematode, S.mansoni. Parasitology, 84, 123-130.

WARREN, (1982) The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis in vivo models. Immunological reviews, 61, 190-213

WILSON, R.A. and COULSON, P. (1986) Schistosoma mansoni : dynamics of migration through the vascular system of the mouse. Parasitology, **92**, 83-100.

WILSON, R.A. ; DRASKAU, T. ; MILLER, P. and LAWSON, J.R. (1978) Schistosoma mansoni : the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. Parasitology, **77**, 57-73.

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE