

50376
1990
19

69907

50376
1990
19

N° d'ordre:491

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FLANDRES-ARTOIS

THESE DE DOCTORAT

Présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du
titre

de Docteur en SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Philippe BOUTIN

IDENTIFICATION D'UN ALLERGENE MAJEUR DE SCHISTOSOMA
MANSONI : LA PARAMYOSINE (Sm 97)



Présentée le 16 Janvier 1990 devant la commission
d'examen:



030 024158 8

Président: M. J. MONTREUIL

Rapporteurs: Mlle G. SPIK

M. S. BALL

Examineurs: M. A. CAPRON

M. R.J. PIERCE

L'ensemble de ce travail a été réalisé au centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624 (1, rue du Pr. Calmette, 59019 LILLE Cedex) sous la direction de Monsieur le Professeur André CAPRON.

Je tiens à remercier chaleureusement M. le Professeur A.CAPRON pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je souhaite que cette thèse soit l'occasion de lui témoigner ma reconnaissance.

J'exprime mes vifs remerciements à R.J. PIERCE pour la formation scientifique qu'il m'a apportée et pour sa disponibilité tout au long de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à:

T. LEPRESLE pour sa collaboration technique.

P. MARTIN et A. JOUBEL pour leurs conseils concernant les techniques de séquençage et l'utilisation du séquenceur automatique 370 A (Applied Biosystems) ainsi que toute l'équipe du Professeur D. STEHELIN pour son accueil.

S. LAFFITE qui m'a appris la culture de cellules hybrides et la production d'anticorps monoclonaux.

M.F. CESBRON pour ses précieux conseils.

M. DAMONNEVILLE, T. THOREL, B. MARTY, D. MONTE et J. KHALIFE pour la lecture critique de ce manuscrit.

Et toutes les personnes du SIBP qui m'ont aidé au cours des dernières années.

Que M^{lle} et M^{rs} les Professeurs G.SPIK, J. MONTREUIL et S.BALL
soient assurés de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger l'ensemble des
travaux présentés dans cette thèse.

RESUME

Les anticorps IgE en coopération avec des cellules inflammatoires jouent un rôle important lors des mécanismes effecteurs et protecteurs développés vis-à-vis d'une infection à *Schistosoma mansoni*. Le clonage moléculaire des antigènes cibles de cette réponse humorale s'avère donc nécessaire, afin de caractériser les antigènes potentiellement protecteurs. A partir d'une banque d'ADNc réalisée dans le vecteur lambda gt11 à partir d'ARNm de ver adulte, trois clones ont été sélectionnés comme fortement reconnus par les anticorps IgE des serums d'infection de rats.

Le travail, présenté dans cette thèse concerne la caractérisation et le séquençage de l'un de ces clones, nommé 3.2. Celui-ci possède un insert de 2553 pb et synthétise une protéine recombinante fusionnée à la β -galactosidase de 190 kDa. L'insert contient deux sites EcoRI internes. Les trois fragments EcoRI s'hybrident avec un ARNm de 4 kb. Le fragment interne de 1317 pb est homologue à la séquence partielle de la paramyosine de *S.mansoni* décrite comme une molécule potentiellement vaccinante (Lanar *et al.*, 1986). Le clone 3.2 présente une séquence presque complète de la paramyosine, les extrémités N et C terminales étant absentes. Par comparaison avec la séquence complète de la paramyosine de *Caenorhabditis elegans*, nous pouvons supposer qu'il manque environ de 15 à 20 acides aminés. La séquence protéique déduite du clone 3.2 présente une périodicité structurale caractéristique d'une super hélice : (abcdefg)_n où les résidus a et d sont préférentiellement hydrophobes. La protéine de fusion exprimée est reconnue par les anticorps IgE de serums d'infection de rats et humains et induit chez le rat une réponse humorale IgG et IgE dirigée contre la protéine native de *S.mansoni*.

Ces travaux montrent que la paramyosine est une cible majeure de la réponse humorale anaphylactique chez le rat et l'homme, soulignant son importance potentielle dans l'immunoprophylaxie de la schistosomiase.

L'ensemble des travaux, présentés dans cette thèse ont fait l'objet des publications suivantes:

Pierce, R.J., Trottein, F., Boutin, P., Facon, B., Balloul, J.M. and Capron, A. (1987)

Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* allergens in Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites . Austin J. McInnis ed. pp 119-128, Alan R. Liss, Inc., New York.

Boutin, P., Pierce, R.J., LePresle, T. and Capron, A. Paramyosin is a target of the IgE response in rat and human *Schistosoma mansoni* infection (Soumis).

Boutin, P., Pierce, R.J. and Capron, A. (1989) Paramyosin is a target of the IgE response in rat and human *Schistosoma mansoni* infection. Joint Spring Meeting 1989 (The British, Netherland and Belgian societies for Parasitology with the Belgian society of Protozoology) 20-22th March. University of Southampton (Abstract).

ABREVIATIONS

- IPTG : Isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside.
XGal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside.
PEG : Polyéthylène Glycol 8000.
TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.
TAE : Tris Acétate EDTA.
TBE : Tris Borate EDTA.
PMSF : Phenylmethanesulfonyle fluorure.
PBS : Tampon Phosphate NaCl.
Bq : Becquerel (1 Curie = 37 GBq).
pb : Paires de bases.
kDa : Kilo Dalton.

GENERALITES

I SCHISTOSOMIASE, BIOLOGIE, LES MOYENS DE LUTTE.

1. Importance.

La schistosomiase ou bilharziose est une infection parasitaire par un ver trématode de la famille des schistosomatidae. Cette parasitose atteint plus de 200 millions de personnes en Amérique du sud, aux Caraïbes, en Afrique, en Egypte et au Moyen Orient mais aussi en Chine, au sud-est de l'Asie et aux Philippines. Quatre espèces sont pathogéniques pour l'homme:

Schistosoma haematobium (Bilharz,1852):pathologie uro-génitale.

Schistosoma mansoni (Manson,1904): pathologie hépato-splénique.

Schistosoma japonicum (Katsurada,1904):pathologie artério-veineuse.

Schistosoma intercalatum (Fisher,1934): pathologie uro-génitale

Dans les zones de haute transmission, 5-10 % de la population infectée meurt alors que la plupart des individus sont plus ou moins gravement atteints, la petite enfance et l'adolescence étant particulièrement touchées. Les différences de sévérité de la maladie ne sont pas seulement dues aux espèces, mais il existe des foyers privilégiés d'infection sévère. Par exemple les zones d'irrigation sont à hauts risques (Nil bleu au Soudan) alors que l'incidence de la bilharziose est moins importante dans les régions du sub-Sahara.

2. Cycle biologique de *Schistosoma mansoni* (Figure 1).

Les oeufs libérés par l'hôte définitif (l'homme par exemple) s'ils se trouvent en contact avec l'eau éclosent et libèrent une larve ciliée: le miracidium. Les miracidia vont pénétrer dans une planorbe du genre *Biomphalaria*, vivant dans une eau peu profonde à 25-30°C. La forme larvaire se transforme alors en sporocystes primaires. A partir de cette forme, bourgeonnent les sporocystes secondaires qui produisent des cercaires. Celles-ci sortent du mollusque en général aux heures chaudes de la journée (10-16 heures). Les cercaires vont pénétrer l'épiderme de l'homme lors de passages répétés dans les eaux douces et calmes. La cercaire perd sa partie caudale et se transforme en schistosomule.

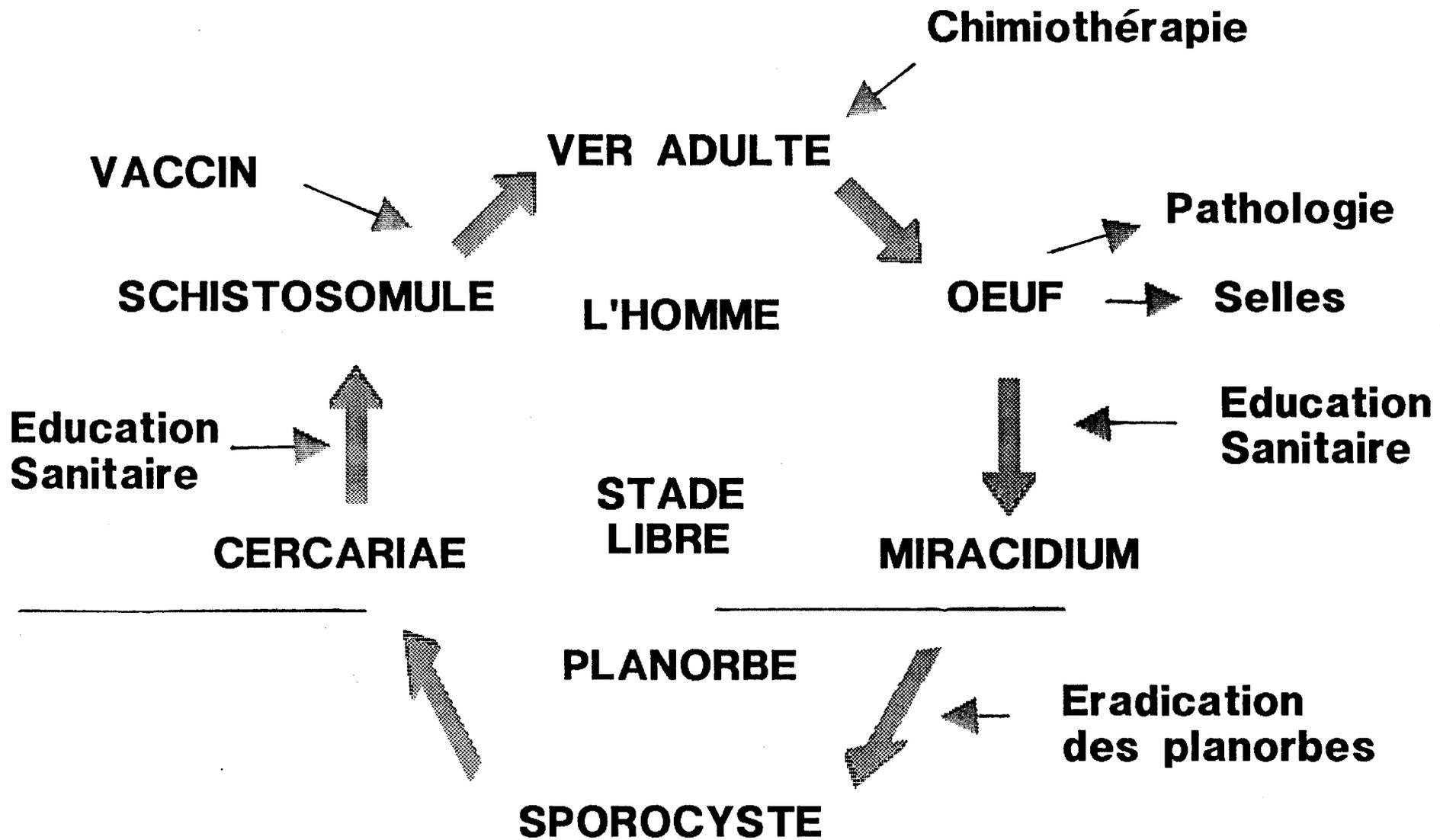


Figure 1: Cycle biologique de *S.mansoni*. Niveaux d'interventions possibles,

d'après Butterworth (1988).

Quatre jours après la pénétration, les parasites migrent vers les poumons où ils s'allongent. A J 10-21 les schistosomules se trouvent au niveau des veinules du système porte, et poursuivent leur maturation sexuelle pendant trois semaines. Après l'accouplement les vers migrent vers les capillaires mésentériques pour pondre des oeufs qui grâce à leurs éperons peuvent migrer vers la lumière intestinale et sont relâchés dans les selles. Les oeufs peuvent être emportés dans le courant veineux vers le foie et le poumon pour y provoquer des granulomes.

3. Aspects cliniques de la bilharziose intestinale.

3.1 Epiderme: A ce niveau, il peut y avoir une infiltration inflammatoire consécutive à un afflux d'éosinophiles, de neutrophiles et de cellules mononuclées (Mac Farlane,1949).

3.2 Phase d'invasion: Les schistosomules peuvent induire l'infiltration des poumons par des éosinophiles (Von Lichtenberg *et al.*,1977). Les symptômes se manifestent par des fièvres et des troubles respiratoires.

3.3 Conséquences de la ponte: Les larves atteignent le stade adulte et pondent. Une partie des oeufs viennent thromboser la veine porte. A partir de la thrombose, les oeufs provoquent la formation d'un granulome constitué d'un infiltrat lymphoplasmocytaire éosinophilique. Au niveau du foie, la présence des granulomes déclenche une fibrose hépatique, qui génère une hypertension portale. Le foie et la rate augmentent de volume (Hépto-splénomégalie). Il existe un risque d'hémorragie digestive. Des complications pulmonaires surviennent parfois, par une endartérite fibreuse se formant autour des oeufs embolisés dans les branches des artères pulmonaires. La présence d'oeufs ou de vers adultes au niveau du système nerveux central peuvent engendrer une néoformation intracrânienne ou une compression médullaire. Les formes aiguës prennent l'aspect d'une encéphalite ou d'une myélite transverse. La mort est provoquée par la formation de varices au niveau de l'oesophage et leurs ruptures dues à l'hypertension portale. Ces graves complications ne concernent qu'un faible pourcentage de la population infectée.

4. Méthodes de contrôle.

4.1 Education sanitaire: Etant donné le mode de contamination, l'idéal serait l'installation de l'eau courante dans toutes les maisons. Bien sûr cette mesure se heurte à des coûts élevés. Un compromis peut être trouvé en installant des pompes communales, des douches et des toilettes publiques. D'autre part un grand effort d'éducation, concernant la santé et la biologie, doit être réalisé vis-à-vis des enfants. Cette mesure est liée à une meilleure scolarisation.

4.2 Contrôle des planorbes: Les molluscicides peuvent être employés en un seul point d'un cours d'eau. Dans le cas du Nil, le molluscicide a été efficace jusqu'à 100 km de l'endroit traité. Un traitement en un point peut affecter 40000 km de canaux et digues de drainage. L'incidence parasitaire est tombée de 42% à 7% dans cette région de l'Egypte (Fenwick 1987). L'avantage de ce traitement est son indépendance de tout mouvement de population. Par contre il nécessite de nombreux contrôles de toxicité des molluscicides, de plus il peut apparaître des souches de planorbes résistantes. En Chine pour lutter contre *S.japonicum*, un système de drainage de l'eau des digues d'irrigation a été instauré avec succès simultanément avec la chimiothérapie (Shou-Pai et Bao-Ruo,1982). Néanmoins cette technique est lourde et requiert une importante responsabilisation de tous les individus.

4.3 La chimiothérapie: Celle-ci a pour objectif la réduction du nombre de vers adultes. L'utilisation de la chimiothérapie a permis la réalisation d'énormes progrès. En particulier au Brésil, il a pu être observé une réduction à long terme de la morbidité (Pugh et Teesdale,1984; Sleight *et al.*,1986). Les deux drogues les plus utilisées sont le praziquantel et l'oxamniquine. Cependant, une injection peut se révéler inefficace dans les zones de haute transmission, la réinfection pouvant être très rapide. Les sujets les plus jeunes peuvent regagner jusqu'à 40% du taux d'oeufs initial en un an (Polderman et Manshande,1981), même si ce traitement est joint à l'utilisation de molluscicides. Alors que les enfants les plus âgés et les adultes développent une immunité à la réinfection, les plus jeunes restent susceptibles et subissent durement et rapidement une réinfection (Butterworth *et al.*,1985). De plus, les contraintes qui régulent le nombre de parasites dans les foyer d'intense transmission n'inclue

pas uniquement des facteurs de transmission mais aussi divers processus opérant au niveau de chaque individu. Par exemple, certaines personnes sont prédisposées à une infection sévère (Anderson et Medley, 1985). Enfin, il ne faut pas négliger l'éventuelle émergence de souches résistantes. Ce phénomène a été montré pour l'oxamniquine (Dias *et al.*, 1982). En ce qui concerne le praziquantel, une telle résistance n'a pas été mise en évidence, mais ne peut être exclue. La chimiothérapie est une mesure utile à court terme, mais non une solution définitive. Comme le montre l'exemple de la malaria, un tel traitement associé aux insecticides a un impact considérable mais transitoire. Enfin, il apparaît préférable de prévenir la maladie en stimulant l'immunité plutôt que de lutter contre elle.

4.4 Vaccin: Le développement d'un vaccin peut être proposé comme alternative à la chimiothérapie. L'instauration d'une immunité partielle non-stérilisante diminuerait à la fois le taux de transmission dans les zones endémiques et l'incidence de la pathologie causée par le dépôt d'oeufs dans les tissus hôtes (Phillips et Colley, 1978). De plus la vaccination ne nécessiterait pas un suivi soutenu des populations. Enfin, l'Organisation Mondiale de la Santé a déjà mis en place un Programme Elargi de Vaccination (PEV) auquel l'immunisation contre la schistosomiase pourrait être incluse.

Pour développer un programme vaccinal chez l'homme, il faut d'abord déterminer dans les différents modèles animaux, le mode d'administration, le nombre d'injections et l'adjuvant à utiliser. De plus est-il préférable d'utiliser un mélange antigènes plutôt qu'une seule composante. Bien sûr, ces choix devront dépendre de l'immunité que l'on veut induire chez l'homme. L'étude de l'immunité des divers hôtes à *S.mansoni* s'avère donc importante.

II IMMUNITE VIS-A-VIS DE SCHISTOSOMA MANSONI.

Dans la schistosomiase, le type d'immunité exprimée est caractéristique de l'hôte. Les différents critères utilisés sont:

- le rapport cercaires pénétrant dans l'organisme / cercaires en contact.
- le nombre de vers adultes présents dans l'organisme.
- le nombre d'oeufs présents et leurs localisations.

1. Immunité naturelle.

L'immunité naturelle est liée à la résistance à l'infection. Kagan (1958) repartit les populations hôtes en trois groupes:

1.1 Hôtes résistants: Chat, pigeon, lapin et cobaye.

1.2 Hôtes permissifs: Souris et hamster. Le hamster est utilisé pour l'entretien du cycle au laboratoire, car il permet l'obtention d'un grand nombre de vers adultes et d'oeufs viables.

1.3 Hôtes semi-permissifs: Rat, singe Rhesus. En ce qui concerne le rat, les vers adultes sont éliminés après 4-5 semaines, les vers persistants étant infertiles.

L'homme est un hôte permissif. Les vers peuvent survivre en moyenne de 2 à 5 ans (Butterworth, 1988)

L'élimination des vers se ferait d'abord dans la peau, 50% de morts pour le rat, 30% pour la souris et 10% chez le hamster lors d'une primo-infection (Clegg et Smithers, 1968).

2. Immunité acquise (immunité à la réinfection).

La stimulation des mécanismes immunitaires peut rendre l'hôte résistant à la réinfection. Mais les vers adultes ne sont pas éliminés alors que les schistosomules sont vulnérables. Cette observation chez le modèle murin, de Smithers et Terry (1969) est connue sous le nom d'immunité concomittante. Un épitope, défini par un anticorps monoclonal IgG2a (Dissous *et al.*, 1982), est présent à la surface du schistosomule (38 kDa) et parmi les produits métaboliques du ver adulte (115 kDa) (Dissous et Capron, 1983). Cet épitope exprimé également aux stades cercaires et miracidium et surtout chez l'hôte intermédiaire *Biomphalaria glabrata* (Dissous *et al.*, 1982 et 1986), permet une approche moléculaire de l'immunité concomitante.

Toutefois, des travaux récents ont montré que la résistance induite chez la souris par une infection chronique est due non pas aux mécanismes immunitaires mais à la présence d'oeufs dans le foie, qui modifie la circulation portale (Wilson *et al.*, 1983). Pour cette raison, la souris immunisée par des cercaires irradiées est le modèle de choix pour de nombreuses équipes. Le développement des cercaires est limité. Celles-ci ne parviennent pas au stade adulte. De plus, l'injection répétée de cercaires irradiées induit une solide résistance à l'infection par les cercaires normales (Mangold et Dean, 1984; Mastin *et al.*, 1983). Cette immunité peut être transférée passivement à des souris naïves par des anticorps ou des lymphocytes (Sher *et al.*, 1982).

Le rat développe une importante résistance à la réinfection, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de l'immunité acquise. De même que pour les souris vaccinées par des cercaires irradiées, la résistance à la réinfection chez le rat est due à la réponse immunitaire. L'immunité est thymodépendante et dépend de la production d'anticorps (M. Capron et A. Capron, 1986 pour revue). Ceci a été démontré par le fait que des rats traités par un serum anti- ne produisent pas d'anticorps et ne développent pas de réponse immune (Bazin *et al.*, 1980). La même observation est faite avec des rats thymectomisés (Cioli *et al.*, 1980) ou athymiques (Phillips *et al.*, 1983). L'immunité à l'infection peut être transférée par des anticorps (Capron *et al.*, 1982; Ford *et al.*, 1984) ou par des lymphocytes T spécifiques (Phillips *et al.*, 1975).

III MECANISMES EFFECTEURS (A.Capron et Dessaint,1985 pour revue).

1. Mécanismes non spécifiques.

Le complément: celui-ci semble intervenir à deux niveaux. Il peut être activé directement au niveau de la membrane du schistosomule et induire la destruction de la larve (Santoro *et al.*,1979). Le parasite possède des récepteurs spécifiques pour les composantes du complément (Ouassi *et al.*,1980). Cette activité peut être amplifiée en présence de cellules portant le récepteur C₃b tels que les éosinophiles normaux (Ramalho-Pinto *et al.*,1978).

2. Immunité à médiation cellulaire.

La production de lymphokines par les cellules T est la forme d'immunité à médiation cellulaire semblant jouer un rôle important lors de l'immunité antiparasitaire. Notamment, les macrophages matures, activés par des lymphokines peuvent tuer *in vitro* des schistosomules (Mahmoud *et al.*,1979; Bout *et al.*,1981). La principale lymphokine responsable de cette activation cellulaire est l'interferon gamma (Nathan *et al.*,1983; James *et al.*,1984). Les souches de souris dont la production d'interferon gamma et l'activation des macrophages est défectueuse, ne peuvent développer une immunité à l'infection (James et Sher,1983; James *et al.*,1984; Correa-Oliveira *et al.*,1986). Les macrophages de souris peuvent tuer les larves aussi bien au niveau de la peau qu'à un stade plus tardif, en absence d'anticorps si les macrophages ont été pré-incubés avec l'interféron gamma (Pearce *et al.*,1986; James,1986). Les lymphocytes T de souris infectées ou vaccinées par des cercaires irradiées produisent de l'interféron gamma *in vitro* lorsqu'ils sont incubés en présence d'antigènes parasitaires (James,1986). Le rôle *in vivo* des macrophages activés a été démontré lors d'études génétiques impliquant des souches de souris mauvaises ou bonnes répondeuses aux cercaires irradiées.

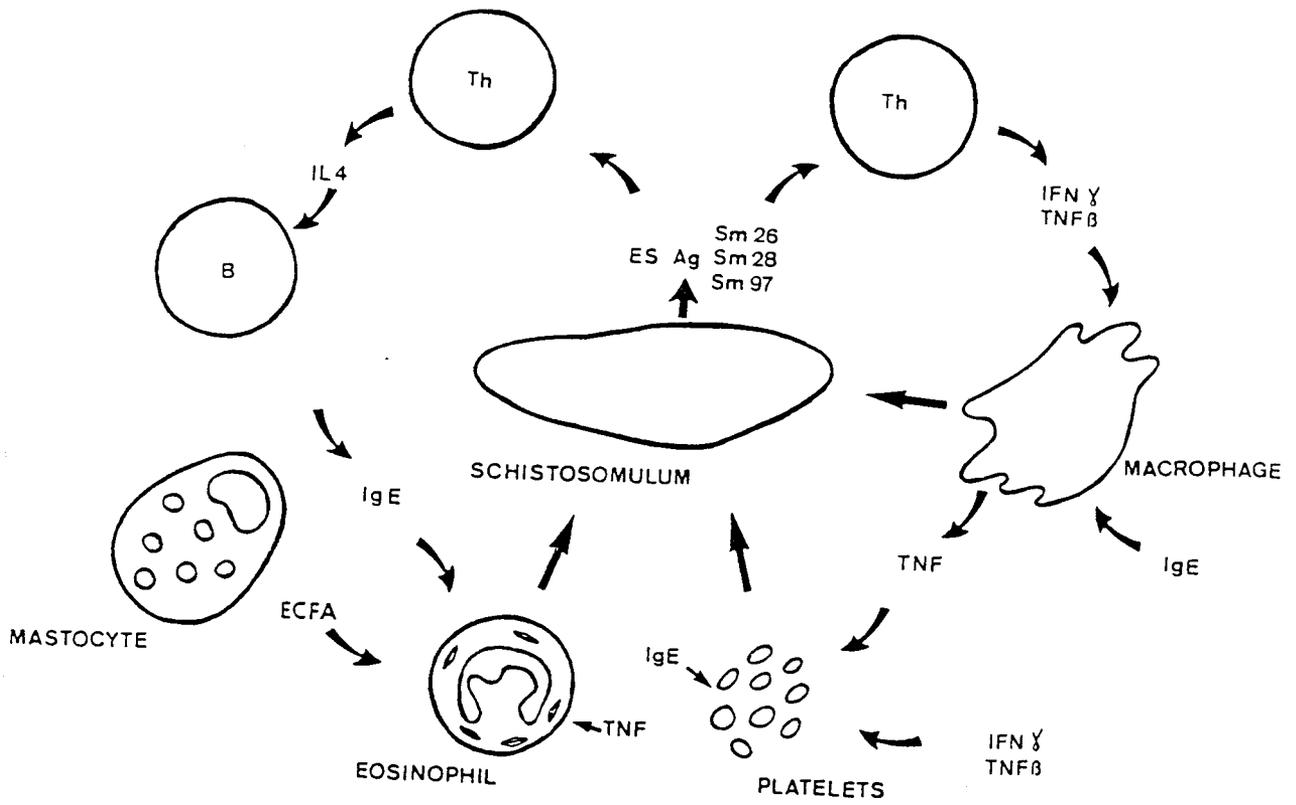


Figure 2: Mécanismes effecteurs vis-à-vis de *S.mansoni*, d'après R.J. Pierce.

Dans ce modèle, l'immunité à médiation cellulaire est favorisée par immunisation intradermique en présence de BCG (bacille de Calmette-Guérin), connu pour promouvoir la réponse cellulaire T (James *et al.*, 1984).

3. Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC).

L'immunité à la réinfection est clairement thymo-dépendante comme le montrent la réduction de l'immunité chez les animaux athymiques. Cependant si les cellules T cytotoxiques peuvent adhérer aux schistosomules *in vitro*, elles ne peuvent les tuer. Si la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps joue un rôle dans l'immunité anti-schistosome, des cellules effectrices non lymphoïdes sont impliquées: les monocytes, macrophages, éosinophiles et plaquettes. Ces cellules purifiées à partir de populations non infectées sont mises en présence de sérums et de schistosomules. Si les sérums contiennent certains isotypes d'anticorps spécifiques d'antigènes parasitaires, on observe la mort des larves.

3.1 Macrophages: Les macrophages de rats normaux en présence de sérums de rat immun à *S.mansoni* adhèrent fortement et tuent les schistosomules (Capron *et al.*, 1975). La mise en évidence de la thermolabilité du facteur sérique (56°C) ainsi que l'adsorption sélective des IgE des sérums ont permis de montrer la coopération des macrophages avec des IgE spécifiques des schistosomes (Dessaint *et al.*, 1979). Différentes expériences d'inhibition ont écarté la participation d'autres isotypes comme les IgG ou les IgM. Ce mécanisme fait donc intervenir d'une part, la fixation des IgE à la membrane des macrophages par un récepteur spécifique pour cet isotype, d'autre part l'activation du métabolisme cellulaire après contact avec l'antigène cible. En effet c'est le contact des IgE sous forme agrégée ou complexée à leur antigène qui stimule les mécanismes cytotoxiques des phagocytes vis-à-vis des schistosomes. D'abord décrit chez le rat, ce mécanisme a pu être confirmé chez l'homme (Joseph *et al.*, 1978).

3.2 Eosinophiles: Butterworth *et al.* (1975) avait préalablement montré que des éosinophiles humains peuvent être cytotoxiques vis-à-vis des schistosomules en présence d'anticorps spécifiques en absence d'une source de complément. Les isotypes impliqués sont les IgG1 et IgG3 (Khalife *et al.*,1989) et les IgE (M.Capron *et al.*,1984b). M. Capron *et al.* (1981a) précisa que les anticorps impliqués chez la rat sont les IgE et IgG2a. Une coopération des éosinophiles avec les mastocytes est essentielle. Les mastocytes ne peuvent tuer les larves mais jouent le rôle de cellules accessoires. Les éosinophiles sont stimulés par leurs produits de dégranulation parmi lesquels ont été identifiés des tetrapeptides à activité chimiotactique comme l'ECF-A (M.Capron *et al.*, 1981b).

3.3 Plaquettes: Lorsque des plaquettes sont prélevées entre le 40^{ème} et 60^{ème} jour de l'infection du rat, elles sont capables de tuer les schistosomules *in vitro* (Joseph *et al.*,1983). Le facteur humoral impliqué dans ce processus est thermolabile et retenu sur immunoabsorbant anti-IgE, alors qu'il ne l'est pas sur colonne anti-IgG. L'observation a pu être reproduite chez l'homme puisqu'un serum de patient bilharzien stimule les plaquettes d'un donneur sain et les rend cytotoxiques pour les schistosomules. L'utilisation d'un anticorps monoclonal de rat, de classe IgE (Verwaerde *et al.*,1987) a permis d'obtenir une cytotoxicité en présence de plaquettes, mais aussi de macrophages de rat sain, confirmant ainsi le rôle des anticorps IgE lors de l'activation des cellules effectrices.

3.4 Rôle des cellules effectrices identifiées *in vitro*: Il est suggéré par les observations histologiques qui montrent l'accumulation d'éosinophiles et macrophages autour de schistosomules morts chez l'animal immun. De plus le transfert d'éosinophiles recueillis chez des rats immuns, ou armés *in vitro* avec des anticorps IgE dirigés contre *S.mansoni* provoquent la destruction des schistosomules (Capron M. *et al.*,1984a). Des expériences analogues ont été réalisées en présence de plaquettes (Joseph *et al.*,1983) et de macrophages (Pestel *et al.*,1988).

3.5 Existence d'un second récepteur pour les IgE:

Les interactions entre les IgE et des cellules inflammatoires non-mastocytaires implique l'existence d'un récepteur spécifique Fc RII au niveau de ces populations cellulaires (A.Capron *et al.*,1986). Ce récepteur possède une faible affinité par rapport au Fc RI présent sur les cellules mastocytaires et les basophiles (Metzger,1983). L'étude des réactions d'ADCC a permis l'identification à la surface des cellules précédemment décrites d'un récepteur pour les IgE d'une affinité de 10^{-7} à 10^{-8} M^{-1} (Dessaint *et al.*,1979; Anderson et Spiegelberg,1981; Jouault *et al.*,1988).

IV IMPORTANCE DE LA REPOSE IgE LORS DE LA SCHISTOSOMIASE.

1. Rôle des IgE.

Sadun et Gore (1970) ont montré l'existence d'une relation directe entre la résistance aux schistosomes de différentes espèces animales et leur taux en IgE. Si les taux sont élevés lors d'infections par les helminthes (Ogilvie,1964; Jarett et Bazin,1974), cependant 5 à 10% seulement des IgE totales des serums de bilharziens sont spécifiques d'antigènes de *S.mansoni* (Dessaint *et al.*, 1975). Chez le rat, des résultats similaires sont observés aussi bien pour les souches génétiquement bonnes ou mauvaises répondeuses en IgE (Rousseaux-Prevost *et al.*,1977). De plus, la forte production d'anticorps IgE correspond au développement de l'immunité à la réinfection (Rousseaux-Prevost *et al.*,1978). Le transfert de l'immunité humorale est réduite après passage des serums d'infection sur colonne d'immunoabsorbant retenant les IgE (Ford *et al.*,1987).

2. Allergènes des stades oeuf et ver adulte.

Au cours de l'infection, une grande variété de molécules induit une réponse humorale IgE. Les anticorps IgE de bilharziens reconnaissent des antigènes d'oeufs de masses moléculaires comprises entre 70 et 150 kDa, et 15-25 kDa de pI 4,5-6,5 (Damonville *et al.*, 1984).

Dès le 28^{ème} jour, le rat Fischer développe une réponse IgE vis-à-vis des antigènes du stade ver adulte : 100-150 kDa, pI 4,9-5,2 (Pierce *et al.*, 1983). La réponse IgE augmente jusqu'au 60^{ème} jour. Les serums de bilharziens reconnaissent une fraction antigénique plus hétérogène: 20-150 kDa.

3. Produits sécrétés-excrétés par les schistosomules (SRP-A).

L'injection de ces produits libérés par le schistosomule, chez le rat sans adjuvant, induit une réponse IgE cytotoxique *in vitro* contre les larves. Les anticorps IgE reconnaissent principalement deux antigènes de 22 et 26 kDa (Auriault *et al.*, 1984). Des expériences d'immunisation directe avec du SRP-A sans adjuvant a permis de protéger les rats jusqu'à un taux de 83% contre une infection à *S.mansoni* (Damonville *et al.*, 1986). Cette protection est due en grande partie à la réponse humorale IgE. En effet, les macrophages et les plaquettes d'animaux immunisés avec les SRP-A possèdent des IgE à leur surface. Ces cellules tuent *in vitro* les larves. La purification d'une fraction antigénique de 25-30 kDa a montré que celle-ci est principalement responsable de la protection (Auriault *et al.*, 1985a). De plus, l'immunisation de singes *Erythrocebus patas* induit une réponse immune IgE cytotoxique. Un anticorps monoclonal IgE reproduit les propriétés protectrices des IgE dirigés contre les SRP-A. Cet anticorps reconnaît un antigène de 26 kDa (Verwaerde *et al.*, 1987).

V MECANISMES D'EVASION.

Malgré les différents mécanismes de défense immunitaires précédemment décrits, les parasites parviennent par de nombreux moyens à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

1. Acquisition d'antigènes d'hôtes.

Damian (1964) et Capron A. *et al.* (1965) ont démontré l'existence de déterminants communs au schistosome et à l'hôte. Des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité K,I de la souris ont été détectés à la surface du parasite (Sher *et al.*,1978).

Les vers peuvent fixer les immunoglobulines de l'hôte par leur fragment Fc (Torpier *et al.*,1979). Les anticorps ainsi captés sont dégradés par une serine protéase excrétée par la larve (Auriault *et al.*,1981). Les peptides libérés, notamment un tripeptide TKP (thréonine-lysine-proline), inhibent l'activité des cellules effectrices (Auriault *et al.*,1985b). Lorsque les macrophages sont incubés en présence de TKP, la cytotoxicité IgE-dépendante est inhibée.

2. Facteurs d'origine parasitaire.

Le schistosome adulte relargue le SDIF (Schistosome Derived Inhibitory Factor) qui inhibe la prolifération lymphocytaire dépendante d'antigène (Dessaint *et al.*,1977). Cet effet a été observé chez le rat, la souris et l'homme. Ce facteur possède un PM de 500 à 1000 Da. Le SDIF n'a aucun effet sur l'activation des lymphocytes T et sur la production de lymphokines régulatrices, mais peut bloquer *in vivo* l'expansion clonale T (Mazingue *et al.*,1986). Le SDIF est capable d'inhiber la réponse IgE d'animaux immunisés avec l'ovalbumine (Langlet *et al.*,1984) et la dégranulation mastocytaire (Mazingue *et al.*,1980). Les propriétés immunologiques du SDIF en font un potentiel agent immunosuppresseur.

3. Anticorps bloquants.

Chez le rat, un anticorps monoclonal IgG_{2c} s'est avéré capable de bloquer l'activité cytotoxique IgG_{2a} (Grzych *et al.*,1984). Cet anticorps monoclonal reconnaît l'antigène de 38 kDa présent à la surface du schistosomule et exerce un effet inhibiteur *in vivo*. L'existence de tels anticorps bloquants, en particulier de nature IgM (Khalife *et al.*,1986) et IgG2 et IgG4 (Khalife *et al.*,1989) a été montré chez l'homme.

VI APPORT DU CLONAGE MOLECULAIRE A L'ETUDE DES ANTIGENES DE S.MANSONI.

De nombreuses molécules de *S.mansoni* ont été clonées (Tableau I). Certains de ces antigènes ont une importance pour l'immunodiagnostic (les hémoglobinasés et la cathepsine B) alors qu'une molécule comme l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase est une cible potentielle de la chimiothérapie. La plupart de ces molécules ont été clonées dans le but de produire un vaccin. Souvent le clonage moléculaire a précédé la connaissance de la fonction de l'antigène. Beaucoup des protéines clonées se sont avérées être des enzymes (glutathion-S-transférase, superoxide dismutase, haémoglobinasé, élastase, cathepsine B,...) ou des protéines structurales (myosine, paramyosine, tropomyosine). Le clonage par expression favorise la caractérisation de molécules exprimées majoritairement, par rapport aux protéines à "turnover" réduit.

TABLE I - LES PROTEINES CLONEES DE SCHISTOSOMES

PROTEINE	POIDS MOLECULAIRE	AUTEURS
<u>Enzymes</u>		
Glutathion-S-transférase	26 kDa	Smith <i>et al.</i> (1986)
	28 kDa	Balloul <i>et al.</i> (1987b)
Superoxide dismutase	20 kDa	Simurda <i>et al.</i> (1988)
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase	26 kDa	Craig <i>et al.</i> (1988)
"Haemoglobinase"	31 kDa	Davis <i>et al.</i> (1988)
	32 kDa	Klinkert <i>et al.</i> (1989)
Cathepsine B	31 kDa	Klinkert <i>et al.</i> (1989)
Elastase	31 kDa	Newport <i>et al.</i> (1988)
<u>Protéines structurales</u>		
Myosine	200 kDa	Newport <i>et al.</i> (1987)
Paramyosine	97 kDa	Lanar <i>et al.</i> (1986)
Tropomyosine	40 kDa	Xu <i>et al.</i> (1989)
Protéine de la paroi de l'oeuf (Egg-shell protein)	28 kDa	Bobek <i>et al.</i> (1986) Simpson <i>et al.</i> (1987) Köster <i>et al.</i> (1988)
<u>Autres molécules fonctionelles</u>		
Heat-shock protein	70 kDa	Hedstrom <i>et al.</i> (1988)
alpha -crystalline/Heat shock protein	40 kDa	Nene <i>et al.</i> (1986)
Ca ²⁺ -binding protein	11.5 kDa	Ram <i>et al.</i> (1989)
<u>Molécules de surface du schistosomule</u>		
	18 kDa	Dalton <i>et al.</i> (1987)
	50 kDa	Havercroft <i>et al.</i> (1987)
	23 kDa	Stein & David (1986)

VII ANTIGENES IMPLIQUES DANS LA PROTECTION VIS-A-VIS DE DES SCHISTOSOMES.

A ce jour, peu d'antigènes de schistosome purifiés ou recombinants ont été décrits comme protecteurs. Le tableau II résume les principaux travaux. En ce qui concerne les antigènes protecteurs clonés, ils ont été caractérisés comme potentiellement vaccinant avant leur clonage moléculaire.

1. GP38.

Cet antigène majeur est présent à la surface du schistosomule (Dissous *et al.*,1981) et a été caractérisé par un anticorps monoclonal IgG2a (IPLSm 1) produit chez le rat (Dissous *et al.*,1982). Cet anticorps s'est révélé cytotoxique vis-à-vis des larves en présence d'éosinophiles, et protège le rat par transfert passif (Grzych *et al.*,1982). Cependant, la GP38 induit également une réponse anticorps bloquante IgG2c (Grzych *et al.*,1984) (V 3.). De plus un épitope glycanique est impliqué dans la protection, excluant les techniques de clonage moléculaire. Pour ces raisons Grzych *et al.* (1985) ont développé une stratégie anti-idiotypique à partir d'IPLSm 1. Des rats immunisés avec un anticorps monoclonal anti-idiotypique (AB2) dirigé contre le site de fixation à l'antigène de IPLSm1, produisent des anticorps AB3 qui sont cytotoxiques pour les schistosomules *in vitro* en présence d'éosinophiles et protecteurs par transfert passif. La KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), utilisée comme molécule "carrier" , induit une réponse anticorps reconnaissant la surface du schistosomule (Grzych *et al.*,1987). Ces anticorps immunoprécipitent la GP38 des extraits membranaires larvaires radiomarqués. Des expériences de déglycosylation ont montré que la KLH possède un épitope carbohydre.Ces expériences montrent l'existence d'une communauté antigénique avec la GP38.

TABLEAU II - ANTIGENES PURIFIES OU RECOMBINANTS IMPLIQUES DANS LA PROTECTION VIS-A-VIS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Antigènes	Preparation	Dose	Modèle animal	Adjuvant	Degré de protection	Auteur
38 kDa	Anti-idiotypic AB2 anticorps monoclonal	2 mg	Rat Lou/M	-	50 - 75 %	Grzych <i>et al.</i> (1985)
	KLH	200 µg	Rat Lou/M	-	50 - 75 %	Grzych <i>et al.</i> (1987)
155 kDa or 53 kDa	Protéines natives	2 - 50 µg	B6D2 F1 (souris)	Al(OH) ₃	25 %	Smith & Clegg (1985)
		400 µg	Macaque	Al(OH) ₃	40 %	Smith & Clegg (1985)
26 kDa <i>S. japonicum</i> glutathion-S-transférase	Protéine recombinante	30 - 100 µg	BALB.K or BALB.C (Souris)	CFA	30 %	Smith <i>et al.</i> (1986)
28 kDa <i>S. mansoni</i> glutathion-S-transférase	Protéine recombinante	100 µg	Rat Fischer	Al(OH) ₃	67 %	Balloul <i>et al.</i> (1987b)
		100 µg	Hamster	Al(OH) ₃	50 %	Balloul <i>et al.</i> (1987b)
		200 µg	Babouin	Al(OH) ₃	40 %	Balloul <i>et al.</i> (1987c)
Paramyosine (97 kDa)	Protéine native	4 µg	Souris C57 Bl/6J	BCG	39 %	Pearce <i>et al.</i> (1988)
	Protéine recombinante	40 µg	Souris C57 Bl/6J	BCG	25 - 30 %	Pearce <i>et al.</i> (1988)
	Protéine native	10 µg	Souris CF1	BCG	25 - 50 %	Flanigan <i>et al.</i> (1989)

2. Glutathion-S-Transférases.

Chez les schistosomes, il existe deux familles de Glutathion-S-transférases de poids moléculaires de 26 et 28 kDa.

2.1 Sm28: Chez *Schistosoma mansoni*, une protéine de 28 kDa a été caractérisée parmi les produits de traduction d'ARNm des vers adultes et les antigènes de surface du schistosomule radio-marqués à ^{125}I (Balloul *et al.*,1985). Une fraction électroéluee de P28 protège le rat à 65-70% et la souris à 43% contre une infection par le schistosome (Balloul *et al.*,1987b). Cet antigène a été cloné et caractérisé comme une glutathion-S-transférase (Balloul *et al.*,1987c). L'antigène recombinant exprimé chez *E.coli* induit une protection de 65 et 50 % chez le rat et le hamster. La P28 recombinante protège les babouins de 40 à 80% avec une grande variation individuelle (Balloul *et al.*,1987a). Aucune réactivité croisée avec les GST de rat et de l'homme n'a été observée en immunoblot ou en microscopie électronique. Les régions immunogéniques des GST du schistosome ne seraient pas localisées dans les régions conservées (Taylor *et al.*,1988).

2.2 Sj26: Une souche de souris WEHI 129/J, résistante à une infection à *Schistosoma japonicum*, présente une forte réponse à l'antigène Sj26 caractérisé comme une Glutathion-S-Transférase (Smith D.B. *et al.*,1986). Smith *et al.* montrent également que l'antigène recombinant fusionné avec la β -galactosidase, protège partiellement des souches de souris susceptibles (Balb/c ou Balb/k) à 30% contre une infection à *S.japonicum*.

2.3 Rôle des GST pour la survie parasitaire. Trois voies sont possibles (Mitchell *et al.*,1989).

-Au niveau de la veine porte, les GST interviennent dans la détoxification.

-Protection des dommages membranaires induits par les produits de peroxydation lipidique.

-Solubilisation de l'hématine au niveau de l'intestin.

3. Paramyosine.

Afin de déterminer les antigènes cibles de l'immunité à médiation cellulaire (IV, 3) des souris ont été immunisées avec de l'antigène total du stade ver adulte de *S.mansoni* en présence de BCG. Ces animaux développent une faible réponse humorale, presque exclusivement dirigée contre une molécule de 97 kDa (Pearce *et al.*, 1986), clonée et identifiée comme une paramyosine (Lanar *et al.*, 1986). La paramyosine native purifiée ou la molécule clonée induisent une réponse cellulaire T protectrice (Pearce *et al.*, 1988). La paramyosine recombinante protège les souris à 30% contre une infection à *S.mansoni*.

Rôle biologique de la paramyosine: Cette protéine musculaire possède une structure en alpha-hélice (Cohen et Holmes, 1963). La paramyosine fait partie du "coeur" des filaments de myosine. Impliquée dans la contraction musculaire, elle permettrait au muscle de soutenir de grandes tensions avec une dépense d'énergie minimale (Cohen, 1982).

En plus de son potentiel immunogène, Sm 97 comme paramyosine participerait aux fonctions physiologiques parasitaires. En tant que composante musculaire, elle permettrait le maintien du schistosome contre la paroi de la veinule et lui éviterait d'être emporté par le flux sanguin (Lanar *et al.*, 1986).

4. Antigènes de 155 kDa et 53 kDa.

Ces deux antigènes décrits par Smith M.A. and Clegg (1985), sont présents à la surface du schistosomule et du schistosome adulte. La purification de ces deux antigènes par immuno-affinité a permis d'obtenir un taux de protection de 25% chez la souris et de 40% chez le singe macaque.

VI OBJECTIFS DU TRAVAIL.

Les résultats d'immunisation par les glutathion-S-transférases semblent encourageants. Cependant, l'obtention d'une protection partielle et l'existence d'une variation individuelle de la réponse immunitaire nous a conduit à caractériser et cloner d'autres antigènes, susceptibles d'être impliqués dans l'immunité protectrice vis-à-vis de la schistosomiase.

Les anticorps IgE jouent un rôle important lors des mécanismes effecteurs et protecteurs vis-à-vis d'une infection à *Schistosoma mansoni* (A.Capron *et al.*,1987). Le clonage moléculaire des antigènes cibles de cette réponse anticorps nous a semblé une étape importante dans l'étude d'antigènes potentiellement protecteurs. Pour cela, à partir d'une banque d'ADNc du stade ver adultes, trois clones recombinants fortement reconnus par les IgE de serums d'infection de rat ont été sélectionnés (Pierce *et al.*,1987). Le travail présenté, concerne la caractérisation et le séquençage de l'un de ces clones (3.2).

RESULTATS

I UTILISATION D'UNE BANQUE D'ADNc.

Une banque d'ADNc du stade ver adulte a été construite dans le vecteur phagique lambda gt11. A partir de 100 ng d'ADNc, 5×10^5 phages recombinants ont été obtenus. Pour 10^5 phages recombinants, 30 clones phagiques ont été d'abord sélectionnés comme étant reconnus par un serum de lapin hyperimmun dirigé contre un homogénat de vers adultes. Ces clones, après avoir été purifiés ont été criblés avec un serum de rat infecté (J 78) selon la méthode de Young et Davis (1983). Trois clones phagiques, 3.13; 3.2 et 3.3 ont été fortement reconnus par les IgE de ce sérum (Pierce *et al*, 1987). Le travail présenté concerne la caractérisation et le séquençage du clone 3.2.

II ANALYSE DE LA PROTEINE DE FUSION DU CLONE 3.2.

Après purification, les bactériophages du clone 3.2 ont été utilisés pour infecter une souche d'*E.coli* Y1089 (lysogène pour le phage lambda). Les clones lysogènes se développant à 32°C et non à 42°C ont été sélectionnés. Un choc thermique (destruction du répresseur du gène de la β -galactosidase) et une induction par l'IPTG permettent l'expression de la protéine recombinante, fusionnée avec la β -galactosidase. Le culot bactérien, traité selon la méthode de Collins *et al* (1986), est ensuite analysé sur gel SDS-polyacrylamide 8%. Ceci a permis la caractérisation d'une protéine de fusion de 190 kDa (figure 3). La fraction du gène β -galactosidase code pour une molécule de 114 kDa, l'insert 3.2 code environ 76 kDa. Le poids moléculaire élevé de la protéine de fusion peut expliquer la présence de produits de dégradation entre 170 et 180 kDa malgré l'utilisation d'inhibiteurs de protéase. Afin de tester la reconnaissance de la protéine recombinante par différents serums, le culot bactérien après séparation sur gel d'acrylamide est transféré sur nitrocellulose. Les bandes de nitrocellulose sont mises en contact avec les serums, préalablement épuisés contre un homogénat d'*E.coli* (figure 4). La protéine de fusion est reconnue par les IgG de serums d'infection de rat et humains. La réponse IgE des serums d'infection de rats, faible à J 52 et

Figure 3: Caractérisation de la protéine de fusion du clone 3.2.

1. Lysogène lambda gt11 sans insert.
2. Lysogène 3.2.

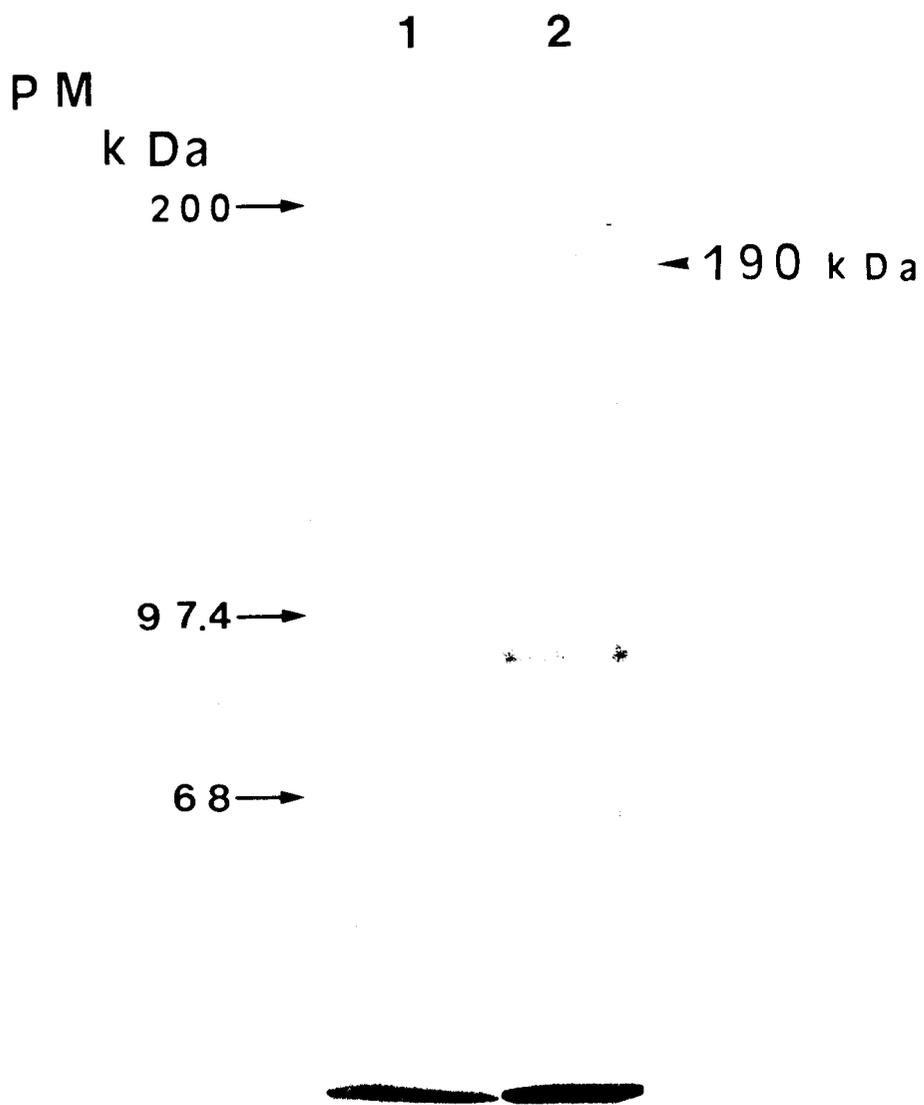


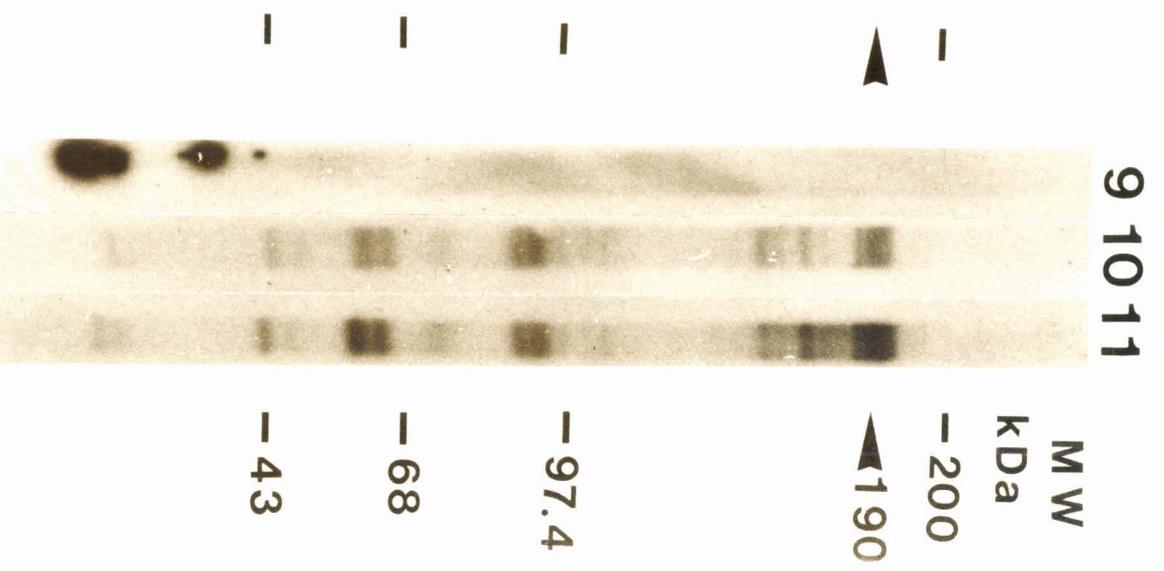
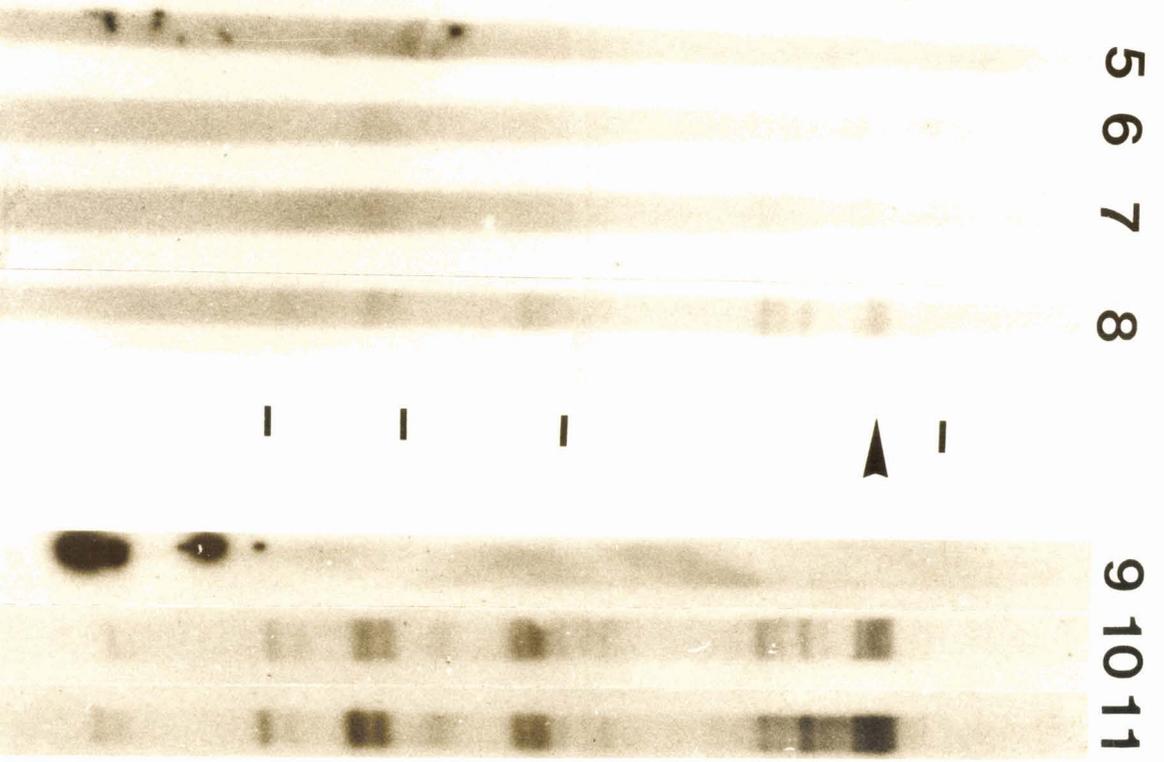
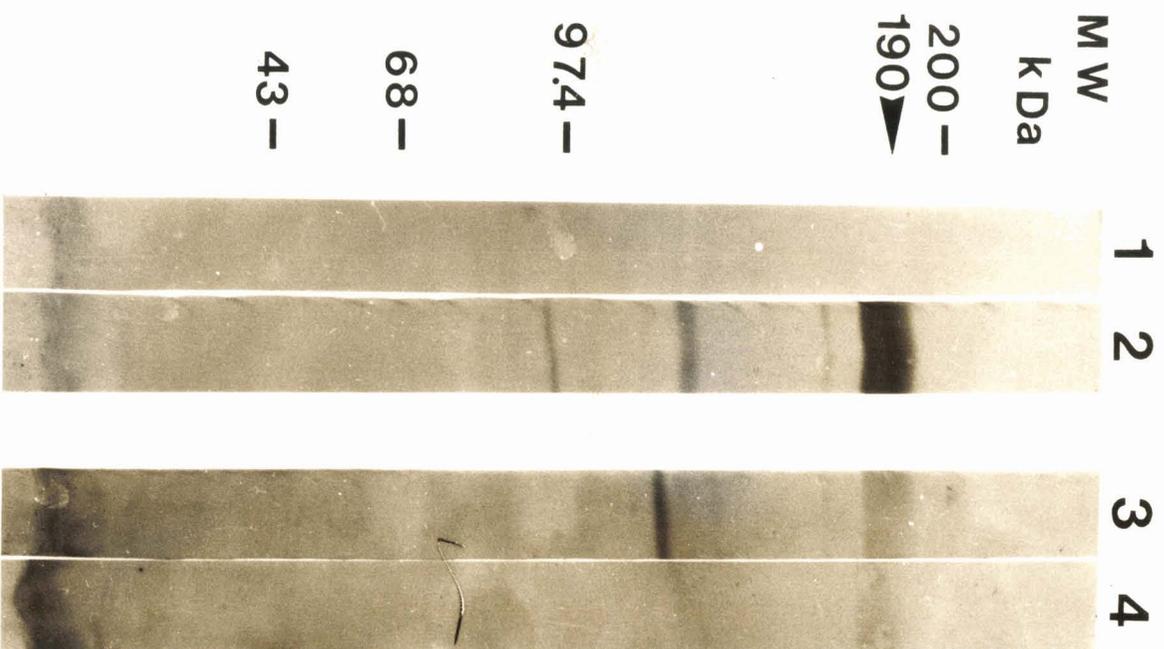
Figure 4: Analyse en Western blot du culot bactérien
obtenu à partir du lysogène du clone 3.2.

Pistes 1 à 4: Reconnaissance par les IgG.

1. Serum de rat sain.
2. Serum de rat infecté J78.
3. Serum de bilharzien.
4. Serum humain sain.

Pistes 5 à 11: Reconnaissance par les IgE.

5. Serum de rat sain.
6. Serum de rat infecté J52.
7. Serum de rat infecté J78.
8. Serum de rat infecté J98.
9. Serum humain sain.
10. Serum de bilharzien.
11. Mélange de serums de bilharziens.



MW
kDa
200—
190▲

1 2 3 4

5 6 7 8

9 10 11

MW
kDa
—200
▲190
—97.4
—68
—43

J 78 est plus forte à J 98. De plus un serum de bilharzien sur les quatre testés contient des anticorps IgE spécifiques dirigés contre la protéine de fusion. La présence de bandes de dégradation est montrée par la non reconnaissance d'un lysogène sans insert par les sérums d'infection (non montré). D'autre part, parmi les sérums de 13 enfants bilharziens en provenance du Kenya, un seul reconnaît la protéine de fusion par les IgE et IgG. Les 12 autres sérums ne possèdent que très peu ou pas du tout d'anticorps IgG dirigés contre la protéine de fusion.

III RECONNAISSANCE DE LA PROTEINE NATIVE PAR DES SERUM DIRIGES CONTRE LE CLONE 3.2.

La protéine de fusion a été partiellement purifiée du culot bactérien comme l'ont décrit Collins *et al* (1986). La fraction ainsi obtenue est injectée deux fois en présence d'hydroxide d'alumine. Ces sérums immunoprécipitent une molécule de 88 kDa parmi les produits de marquage métabolique du ver adulte (figure 5). D'autre part, une préparation antigénique totale du stade ver adulte a été réalisée, puis transférée sur nitrocellulose. Les anticorps IgE de sérums dirigés contre le clone 3.2 reconnaissent la protéine native (figure 5).

Des tests de cytotoxicité cellulaire dépendante d'éosinophiles et de plaquettes ont été réalisés en présence de sérums dirigés contre le clone 3.2. Aucune cytotoxicité significative n'a pu être mise en évidence. Ceci est dû à un taux élevé de cytotoxicité non spécifique. Notamment les sérums dirigés contre la β -galactosidase se sont révélés également cytotoxiques. Malgré un épuisement des sérums, des protéines inflammatoires d' *E.coli* seraient responsables de ce phénomène. Le problème pourrait être résolu, d'une part en purifiant la protéine recombinante, mais aussi en exprimant la protéine recombinante non fusionnée.

Figure 5: A Immunoprécipitation des produits de marquage métabolique du stade ver adulte.

1 Serum de rat infecté J78.

2 Serum de rat sain.

3 Serum de rat immunisés avec la protéine de fusion du clone 3.2.

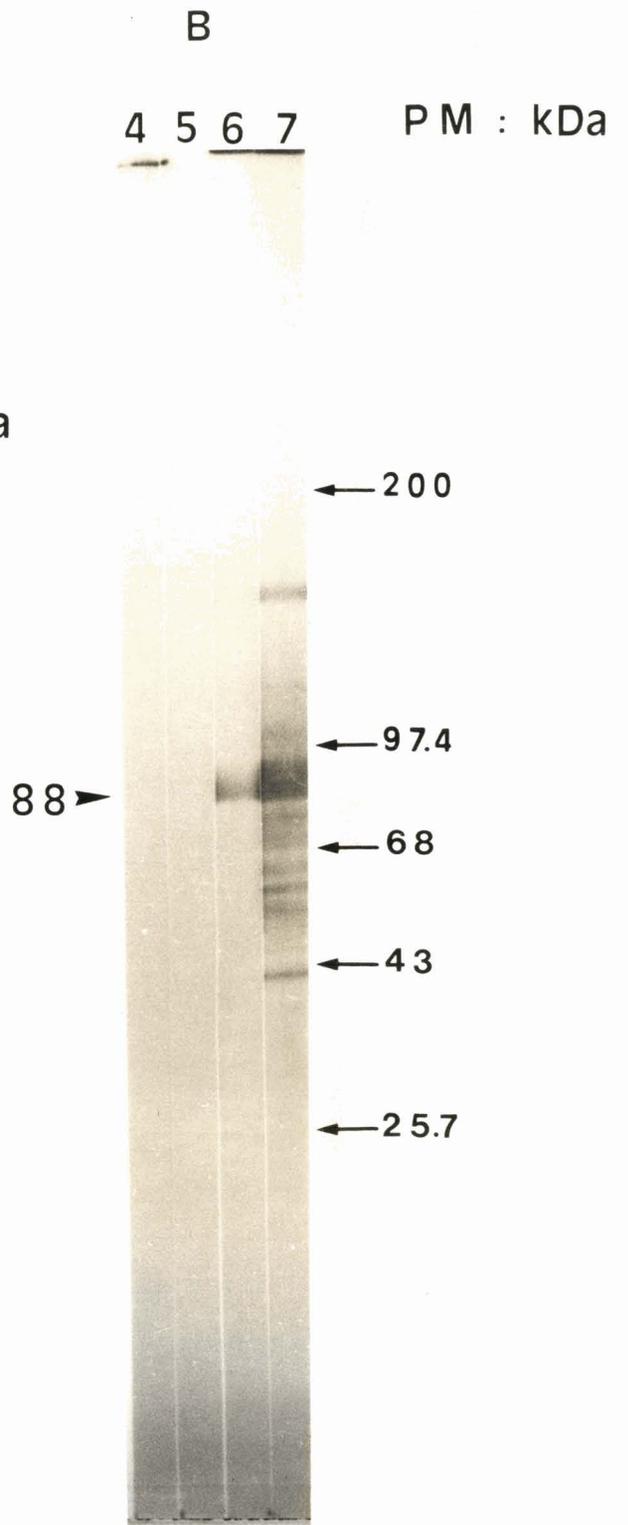
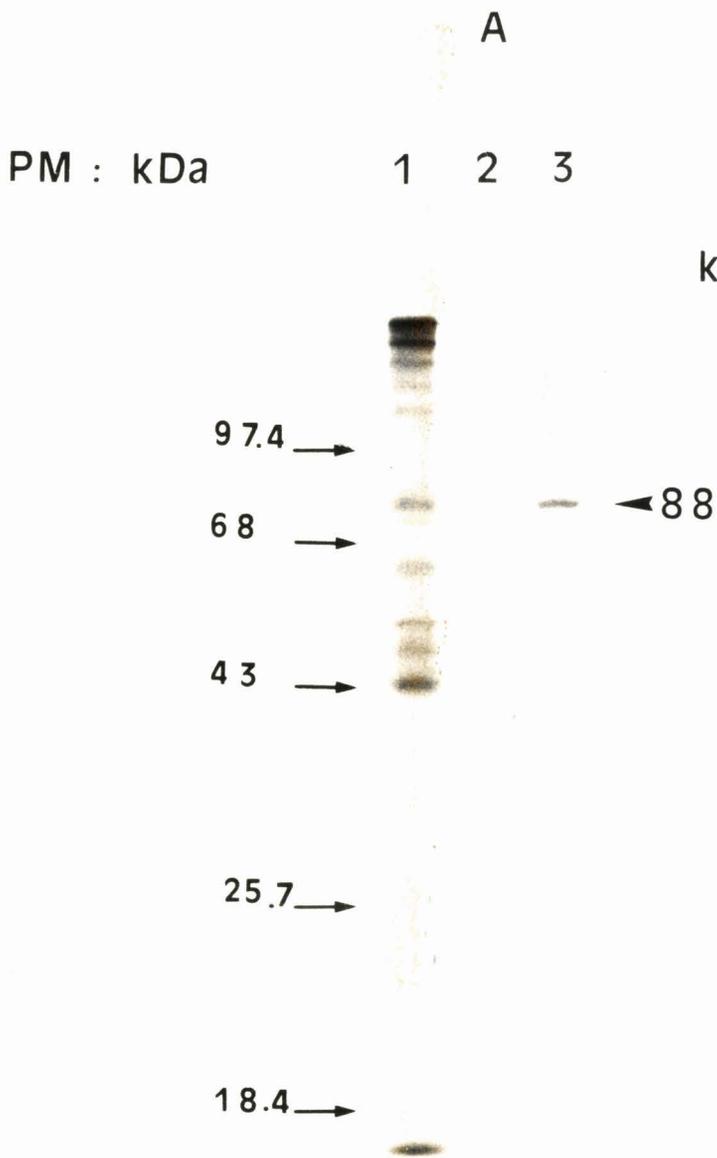
B Reconnaissance des antigènes de S.mansoni par les IgE.

4 Serum de rat sain.

5 Serum de rat dirigé contre le clone 3.2. Révélation avec un conjugué anti IgG de souris.

6 Serum de rat dirigé contre le clone 3.2. Les IgE présents sont reconnus par un anticorps monoclonal spécifique de souris. Révélation avec un conjugué anti IgG de souris.

7 Serum de rat infecté.



IV ANALYSE ET SEQUENCAGE DE L'INSERT DU CLONE 3.2.

Le clone 3.2 possède un insert de 2553 pb contenant deux sites de restriction Eco RI internes. L'insert en entier et les trois fragments de 1317, 879 et 366 pb ont été sous clonés dans le plasmide pUC13 (figure 6). Cette étape est nécessaire afin de préparer l'insert en quantités suffisantes pour l'analyse de l'ARNm et son séquençage. En ce qui concerne la caractérisation du message, 10 g d'ARN total du stade ver adulte ont été dénaturés selon la méthode de Thomas (1980) puis transférés sur nitrocellulose. Les trois fragments EcoRI s'hybrident avec un ARNm de 4kb chez le ver adulte (figure 6). Cet ARNm est présent à tous les stades du cycle parasitaire (miracidium, cercaire) (non montré).

Une carte de restriction de l'insert a pu être réalisée (figure 7). Seuls les enzymes du "polylinker" de pUC 13, M13 mp10 et M13 mp11 (Voir Matériel et méthodes Fig15) ont été testés afin de sous cloner les fragments de restriction dans le phage M13 et les séquencer. La stratégie de séquençage est représentée dans la figure 7. Les fragments à séquencer sont produits sous forme de matrice M13 simple brin. Ensuite une amorce nucléotidique est hybridée au niveau de la région 3' du fragment à séquencer. L'élongation à partir de l'amorce peut avoir lieu en présence de sequenase (ADN polymérase du phage T7 modifiée selon Tabor et Richardson, 1987) et de déoxynucléotides par la technique des inhibiteurs d'élongation de chaîne (didéoxynucléotides) (Sanger *et al*, 1977). Des amorces fluorescentes ont été utilisées comme marqueurs de la réaction de séquence. La lecture est réalisée automatiquement par un faisceau laser. L'utilisation du séquenceur automatique 370 A (Applied Biosystems) permet l'analyse de 16 clones par gel et la lecture d'environ 500 pb par migration.

L'ADN simple brin des phages M13 contenant les fragments de restriction Eco RI-HindIII de 1100 pb et EcoRI-SalI de 600 pb ont été analysés par la technique de "cyclone" (Fig16, Matériel et méthodes). Pour l'insert de 1100 pb, des fragments d'environ 850, 700 et 550 pb ont pu être analysés, après digestion exonucléasique. La séquence du clone a donc pu être entièrement recouverte. La séquence du clone 3.2 est décrite dans la figure 8.

Figure 6: A Sous clonage de l'insert 3.2 (2553 pb)
dans pUC 13; digestion du plasmide par
EcoRI.

B Analyse en Northern blot. le fragment de
866 pb a été utilisé comme sonde.

1 ARN total de S.mansoni.

2 ARN total de foie de hamster.

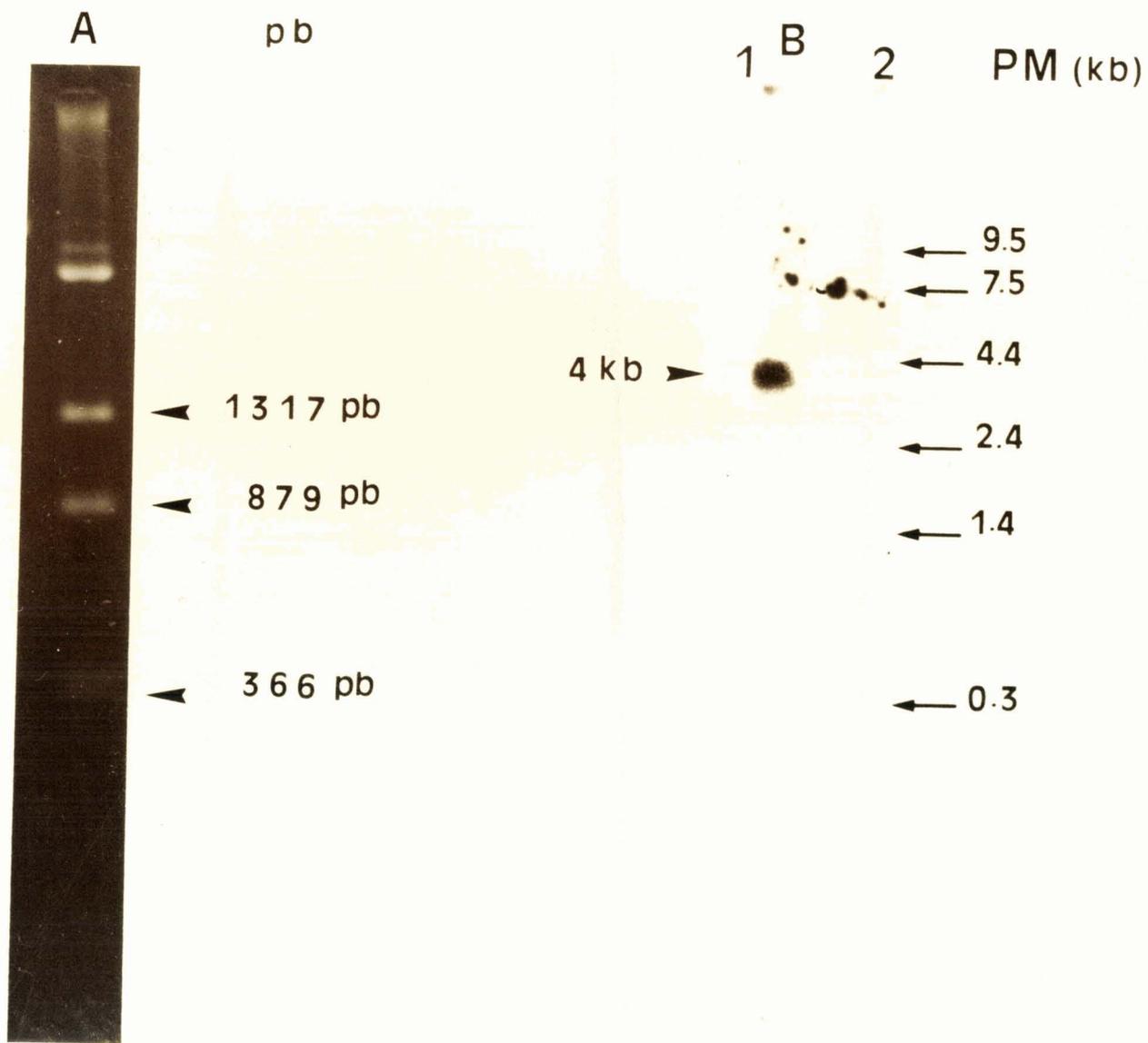
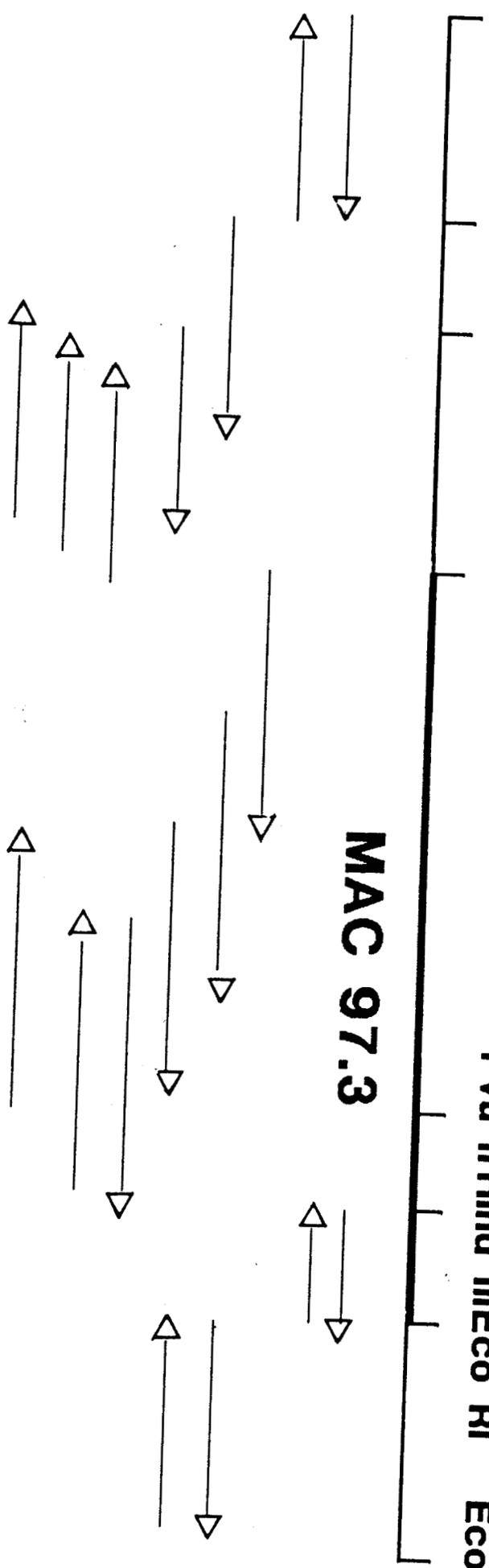


Figure 7: Carte de restriction et stratégie de
séquençage du clone 3.2.

MAC 97.3 : clone lambda gt11 décrit par
Lanar et al (1986).

Eco RI Sal I Pvu II Eco RI Pvu II Hind III Eco RI Eco RI

MAC 97.3



250 bp



Figure 8: Séquence nucléotidique du clone 3.2 (2553pb). Les sites de restriction EcoRI internes sont soulignés. La séquence protéique déduite du clone 3.2 possède un cadre de lecture ouvert sur toute sa longueur en phase avec la β -galactosidase de lambda gt11.

TCAAGAACTATTTATCGAGGAGTATCACCAAGTACAACAAGACTTGAGAGTCGAGTACGG 60
S R T I Y R G V S P S T T R L E S R V R
GAATTAGAGATCTTTTGGATTTAGAACGTGATGCAAGAGTTCGAGCTGAACGACATGCT 120
E L E D L L D L E R D A R V R A E R H A
GCTGATTTAGGTTTTCAAGTGGATGCATTATCAGAACGTTTAGATGAAGCTGGAGGTTCT 180
A D L G F Q V D A L S E R L D E A G G S
ACAACACAAACTCAAGAATTATTAACACGTCGTAATGGAATCAATAAACTACGTAA 240
T T Q T Q E L L K R R R E M E I N K L R
GATTTAGAAAATGCTAATGCATCACTTGTACTAGCTGAAACATCAATGAGACGTCGACAT 300
D L E N A N A S L V L A E T S M R R R
CAAACAGCATTGAATGATTTGGAAGTTGAAAATTTACAAAAACAAAAGGAAAG 360
Q T A L N E L A L E V E N L Q K Q K G
GCTGAAAAGACAAAAGTCATTTGATTATGGAAGTGGATAATGTTCTAGGACAATTAGAT 420
A E K D K S H L I M E V D N V L G Q L D
GGTGCCTTAAAGCTAAGCAATCAGTGAATCAAAATTTAGAAGGATTAGATAGTCAATTA 480
G A L K A K Q S A E S N L E G L D S Q L
AATCGTTTAAATCATTAAACCGACGATTTACAAAGACAATTACCTGAATTAATAATGCT 540
N R L K S L T D D L Q R Q L P E L N N A
AAATCAAGATTAACATCAGAAAATTTGAATTATTACATATAAATCAAGATTATGAAGCA 600
K S R L T S E N F E L L H I N Q D Y E A
CAAATATTAATTTCTAAAGCTAATCATCACTTGAAGTCAAGTAGATGGTTTTAAA 660
Q I L N Y S K A K S S L E S Q V D G F K
AGATCATTAGATGATGAAGCTAAAATCGTTTTAATCTTCAAGCTCAACTTACATCACTT 720
R S L D D E A K N R F N L Q A Q L T S L
CAAATGGATTATGATAATTTACCAGCTAAATATGATGAAGAAAGTGAAGAGCTAGTAAT 780
Q M D Y D N L P A K Y D E E S E E A S N
TTACGTAGTCAAGTATCTAAATTTAAGCGTGATATTGCTGCATTAATAATCGAAATTTGAA 840
L R S Q V S K F N A D I A A L K S K F E
CGTGTACTTATGATGATAAAGCAAGTTCGAAGAAATGAAGAGGAAATTCATATGAGA 900
R V L M S K T E F E E M K R K F T M R
ATTACCGAECTTGAAGTACTGCTGAAAGAGAACGATTAAGCGGTATCATTAGAAAAA 960
I T E L E D T A E R E R L K A V S L E K
CTTAAAAACAAAATTAACATTAGAAAATTAAGATTTACAACTGAAATAGAAAGCTTTTCA 1020
L K T K L T L E I K D L Q S E I E S L S
TTAGAAAATAGTGAATTAATTCGTCGTGCTAAAGCTGCTGAATCATTAGCTTCTGATTTA 1080
L E N S E L I R R A K A A E S L A S D L
CAACGTCGTGTTGATGAATTAACAATTTGAAGTGAATACATTAACATCACAAAATAGTCAA 1140
Q R R V D E L T I E V N T L T S Q N S O
TTAGAAAGTGAATACTACGTTTAAAAGTTTGTAAATGATTTAAGCGGATAAAAAATAAT 1200
L E S E N L R L K S L V N D L T D K N N
TTATTAGAACGTGAAAATCGTCAATGAATGATCAAGTCAAAGAATTAAGAAGTTCATTT 1260
L L E R E N R Q M N D Q V K E L K S S C L
CGTGTGCTAATCGTCGTCCTTACTGATTTAGAAGCATTAAAGATCGCAATTAGAGGCTGAA 1320
R D A N R R L T D L E A L R S Q L E A E
AGAGATAATCTTGCATCAGCTTACATGATGCTGAAGAGCATTACATGATATGGATCAA 1380
R D N L A S A L H D A E E A L H D M D Q
AAGTATCAAGCATCAAGCTGCATTAATCATTGAAATCTGAAATGGAACAAGGCTT 1440
K Y Q A S Q A A L N H L K S E M E Q R L
AGAGAAAGAGATGAGAATTAGAAGTTTAAAGAAAAGTACTACTAGAACAATTGAAGAA 1500
R E R D E E L E S L R K S T T R T I E E
TTAAGTGTACAATAACTGAAATGGAAGTAAATATAAATCAGAATTATCACGTTTAAAA 1560
L T V T I T E M E V K Y K S E L S R L K
AAACGTTATGAATCAATATTGCTGATTTAGAAAATTCAACTTGATACAGCTAATAAAGCT 1620
K R Y E S N I A D L E I Q L D T A N K A
AATGCAAAATCTTATGAAAGAGAATAAAAATTTATCACACGTTTAAAGATTTAGAAAACA 1680
N A N L M K E N K N L S Q R V K D L E T
TTTTTAGATGAAGAACGTCGTCCTCGTGAAGCAGCTGAAAATAATTTACAAATTAAGTAA 1740
F L D E E R R L R E A A E N N L Q I T E
CATAACGTTTACAATTAGCAAAATGAAATGGAAGAAATTCGTAGTACATTAGAAAATTTA 1800
H K R L Q L A N E I E E I R S T L E N L
GAACGTTTACGTAAACATGCTGAAACAGAAGCTGAAAGAGCTCAATCACGTTTGTAGTAA 1860
E R L R K H A E T E L E E A Q S R V S E
TTAAGTATTCAACTAATATATTAAGTAAATGATAAAGCTGCTGTTGAAAGGTGATATTGGT 1920
L T I Q L N I L T N D K R R L E G D I G
GTAATGCAGGCTGATATGGATGATGCTATTAATGCTAAAACAAGCTTCTGAAGATCGAGCA 1980
V M D A D M D A I N A K Q A S E D R A
ATTAGATTAATAATGAAGTATTACGTTTACGCTGATGAATTACGTCAGAACAAGAAAAT 2040
I R L N N E V L R L A D E L R Q E Q E N
TATAAACATGCTGAAGCATTAGAAAACAATTAAGAAATGAAATACGTTGAAATACAGTT 2100
Y K H A E A L R K Q L E I E I T V
AAATTAGAAGAAGCTGAAGCATTGCTACACGTTGAAAGGTCGTCGTTGGTACAAAAATTA 2160
K L E E A E A F A T R E G R R M V Q K L
CAGGCTCGTACGTTGAACTGAAATCAGAATTCGATGGTGAATCAAGAAGATGTAAGAT 2220
Q A R V R E L E S E F D G E S R R C K D
GCATTAGCTCAAGCACGTAATTTGAACGTCATATAAAGAATTACAAACACAAGCTGAA 2280
A L A Q A R K F E R Q Y K E L Q T Q A E
GATGATCGTATGGTATTAGAAGTTCAGATTTATTAGATAAACTCAAAATGAAATG 2340
D D R R M V L E L Q D L L D K T Q M R M
AAAGCCTATAAAGCTCAATTTGGAAGAAATGGAAGAAGTATCTCAAAATCAATGAATAAA 2400
K A Y K R Q L E E M E E V S Q I T M N K
TATCGTAAAGCCCAACAATAATGAAGAAGCTGAACATCGTGCAGATATGGCTGAACGCT 2460
Y R R A Q Q Q I E E A E H R A D M A E R
ACAGTCACTGTACGTCGTTGGTCCAGGTGGACGTCGTTCTGTAGCACGCTGAATTA 2520
T V T V R R V G P G R A V S V A R E L
TCTGTACATCAATAGAGGAATGATAGCAACA 2583
S V T S N R G M I A T

Le fragment de 879 pb possède une partie de la séquence de l'adaptateur EcoRI (GGG) d'insertion de l'ADNc. Ce fragment correspond à l'extrémité 5' de l'insert. La séquence terminale du fragment de 366 pb CCC, indique l'extrémité 3' de l'insert. Le cadre de lecture unique est ouvert sur les 2553 pb.

V COMPARAISON DE LA SEQUENCE PROTEIQUE DEDUITE DU CLONE 3.2 AVEC UNE BANQUE DE DONNEES.

Les fragments de restriction de 879 et 366 pb ont d'abord été séquencés. L'interrogation de la banque de donnée Swissprot a mis en évidence une homologie globale de 37% des séquences en aminoacides déduites des deux fragments avec la chaîne lourde de la myosine de *Caenorhabditis elegans* (figure 9). La taille de la molécule native (88 kDa) est plus proche de celle de la paramyosine (97kDa) de *S.mansoni* partiellement clonée par Lanar (1987) (clone MAC 97.3) que de la myosine (200 kDa). En fait, la séquence du fragment interne EcoRI s'est révélée identique à celle du clone MAC 97.3. Il existe cependant une légère différence. Une guanine est absente de notre séquence au niveau de la position 1232. L'insertion d'une cytosine en position 1252 rétablit le cadre de lecture. Cette erreur a été préalablement mise en évidence par I. Schechter (communication personnelle). Les deux séquences diffèrent donc de 9 acides aminés.

L'équipe d'Alan Sher (NIH, Bethesda MD, USA) nous a fourni la souche cellulaire MBL-Sm-4DI produisant un anticorps monoclonal IgG2a dirigé contre Sm97. A partir de cette souche, de l'ascite a été produit chez des souris C57 B1/6J afin de purifier 20 mg pour 12ml d'ascite. 5µg de cet anticorps reconnaît la protéine recombinante du clone 3.2 (figure 10). De plus, cette dernière est également reconnue, mais faiblement, par un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la paramyosine de l'annélide marin *Owenia fusiformis*, aimablement fourni par M.Diano *et al* (figure 10).

Figure 9: Homologie de séquence en acides aminés correspondant au fragment EcoRI du clone 3.2 (1) des résidus 1-292 avec les résidus 1106-1398 de la chaîne lourde de la myosine d'un nématode Caenorhabditis elegans (2). Une homologie globale de 37% a été observée comme pour le fragment EcoRI interne correspondant au clone MAC 97.3 de Lanar et al (1986), et le fragment EcoRI 3'. Les identités sont encadrées. * indique une homologie par groupe d'acides aminés (HKR), (LIVM), (AGST), (YFM), (DEQN), (P) et (C)

1 E F G S R T I Y R G V S P S T T R L E S R V R E L E D L L D
* * * * *
2 L E D E Q A L V S K L Q R Q I K D G Q S R I S E L E E E L E

1 L E R D A R V R A E R H A A D L G F Q V D A L S E R L D E A
* * * * *
2 N E R Q S R S K A D R A K S D L Q R E L E E L G E K L D E Q

1 G G S T T Q T Q E L L K R R E M E I N K L R K D L E I N A N
* * * * *
2 G G A T A A Q V E V N K K R E A E L A K L R R D L E - E A N

1 A S L V L A E T S M R R R H Q T A L N E L A L E V E N L Q K
* * * * *
2 M N H E N Q L G G L R K K H T D A V A E L T D Q L D Q L N K

1 G K A - - E K D K S H L I M E V D N V L G Q L D G A L K A K
* * * * *
2 A K A K V E K D K A Q A V R D A E D L A A Q L D Q E T S G K

1 Q S I A E S N L E G L D S Q L N R L K S L T D D L Q R Q L P
* * * * *
2 L N - N E K L A K Q F E L Q L T E L Q S K A D E Q S R Q L Q

1 N - - N A K S R L T S E N F E L L H I N Q D Y E A Q I L N Y
* * * * *
2 D F T S L K G R L H S E N G D L V R Q L E D A E S Q V N Q L

1 S K A K S S L E S Q V D G F K R S L D D E A K N R F N L Q A
* * * * *
2 T R L K S Q L T S Q L E E A R R T A D E E A R E R Q T V A A

1 Q L T S L Q M D Y D N L P A K Y D E E S E E A S N L R S Q V
* * * * *
2 Q A K N Y Q H E A E Q L Q E S L E E E I E G K N E I L R Q L

1 S K F N A D I A A L K S K F E R V K M S K T E E F
* * * * *
2 S K A N A D I Q Q W K A R F E G E G L L K A D E L

Figure 10: Reconnaissance de la protéine recombinante du clone 3.2 par différents anticorps spécifiques de paramyosines.

1 Anticorps monoclonal MBL-Sm-4DI

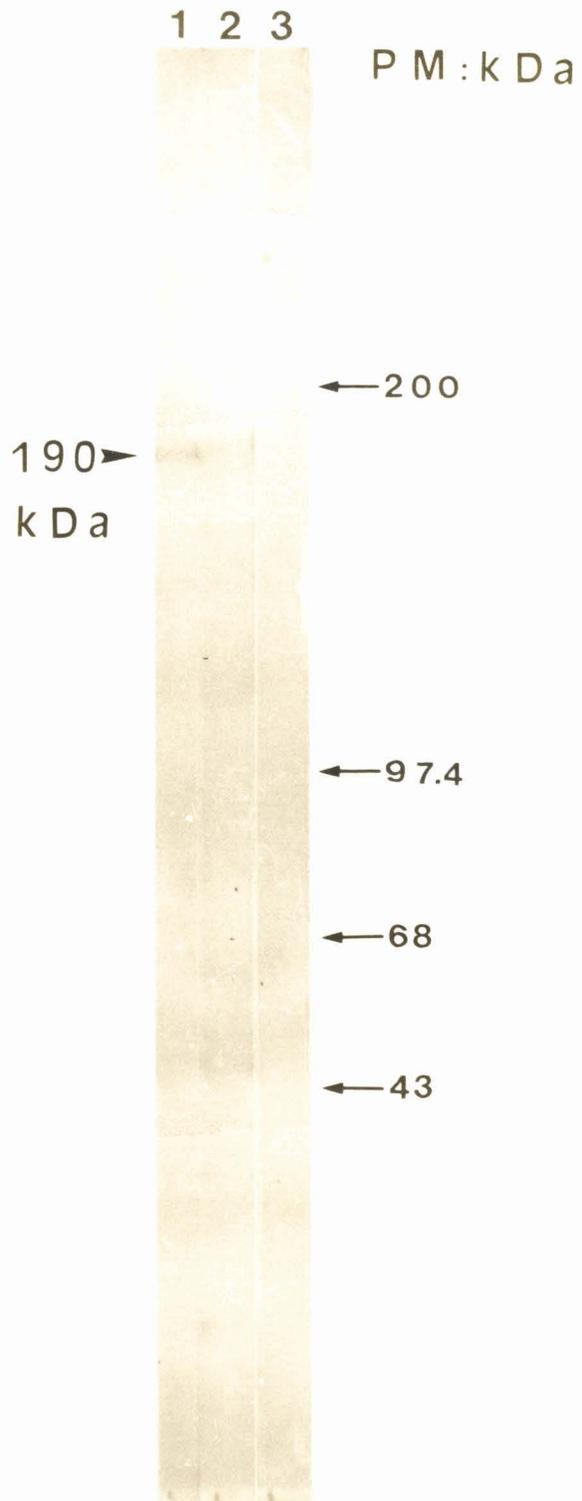
dirigé contre Sm 97 (Pearce et al, 1986).

2 Anticorps polyclonal de lapin (dilué

au 1/200) dirigé contre la paramyosine d'Owenia fusiformis

(Diano et al, 1988).

3 Ascite de myélome SP20.



Récemment la paramyosine de *C.elegans* a été clonée et séquencée entièrement (Kagawa *et al*,1989). Un alignement des deux séquences (figure 11) a permis de montrer une homologie globale de 35%. L'homologie porte sur 820 acides aminés. Kagawa *et al* (1989) ont montré une homologie similaire (34%) entre la paramyosine de *C.elegans* et celle partiellement clonée par Lanar *et al* (1986) chez *S.mansoni*. La paramyosine clonée de *C.elegans* comprend 866 amino acides. Le clone 3.2 (851 acides aminés) représente donc une copie presque complète de la paramyosine de *Schistosoma mansoni*. La séquence du clone 3.2 se poursuit sur 8 acides aminés par rapport à la terminaison du clone de *C.elegans*. Afin d'obtenir les extrémités Nt et Ct de la molécule, la banque d'ADNc d'origine amplifiée, a été criblée à l'aide des fragments de 879 et 366 pb. Cependant aucun clone n'a pu être caractérisé.

VI STRUCTURE REPETEE DE LA PARAMYOSINE. RELATION : STRUCTURE-FONCTION.

La paramyosine possède une structure en super hélice (Cohen et Holmes, 1963). Cette protéine (Lanar *et al* ,1986; Cohen *et al*,1987), comme la tropomyosine (McLachlan et Stewart, 1975) et les filaments de myosine (McLachlan et Karn,1982), possèdent une organisation en heptapeptide. Les résidus hydrophobes, concentrés aux positions a et d forment des "boucles" et des "cavités" (knobs and holes) entre les chaînes des hélices. La surface de l'hélice étant très chargée par la présence de résidus acides et basiques. De plus ces protéines fibreuses possèdent des unités de répétition de 28 acides aminés qui sont importantes pour l'assemblage et la fonction de ces molécules (Elzinga et Collins, 1977; Parry, 1981). Ces unités de répétition sont interrompues par des résidus "skip" ou sauteurs.

Figure 11: Homologies de séquence protéiques déduites des paramyosines recombinantes de C.elegans, CEPM (Kagawa et al, 1989) et S.mansoni, SMPM (clone 3.2). Les identités sont encadrées. * indique une homologie par groupe d'acides aminés: (HKR), (LIVM), (AGST), (YFM), (DEQN) (P) et (C).

CEPM 372 A R E Q L E R Q V G E L K V R I D E I T V E L E A
 SMPM 350 A K A A - E S L A S D L Q R R V D E L T I E V N T

CEPM 397 A Q R E L R A V N A E L Q K M K H L Y E K A V E Q
 SMPM 374 L T S Q N S Q L E S E N L R L K S L V N D L T D K

CEPM 422 K E A L A R E N K K L H D E L H E A K E A L A D A
 SMPM 399 N N L L E R E N R Q M N D Q V K E L K S S L R D A

CEPM 447 N R K L H E L D L E N A R L A G E I R E L Q T A L
 SMPM 424 N R R L T D L E A L R S Q L E A E R D N L A S A L

CEPM 472 K E A D A Q R R D A E N R A Q R A L A E L Q A L R
 SMPM 449 H D A E E A L H D M D Q K Y Q A S Q A A L N H L K

CEPM 497 I E M E R R L Q E K E E E M E A L R K N L Q F E I
 SMPM 474 S E M E Q R L R E R D E E L E S L R K S T T R T I

CEPM 522 D R L I A A L A D A E A R M K S E I S R L K K K Y
 SMPM 499 E E L T V T I T E M E V K Y K S E L S R L K K R Y

CEPM 547 Q A E I A E L E M T V D N L N R A N I E A Q K T I
 SMPM 524 E S N I A D L E I Q L D T A N K A N A N L M K E N

CEPM 572 K K Q S E Q L K I L Q A S L E D T Q R Q L Q Q V L
 SMPM 549 K N L S Q R V K D L E T F L D E E R R L R E A A E

CEPM 597 D Q Y A L A O R K V A A L S A E L E E C K T A L D
 SMPM 574 N N L Q I T E H K R L Q L A N E I E E I R S T L E

CEPM 622 N A I R A R K Q A E V D L E E A N G R I S D L I S
 SMPM 599 N L E R L R K H A E T E L E E A Q S R V S E L T I

CEPM 647 I N N N L T S I K N K L E T E L S T A Q A D L D E
 SMPM 624 Q L N I L T N D K R R L E G D I G V M Q A D M D D

CEPM 672 V T K E L H A A D E R A N R A L A D A A R A V E Q
 SMPM 649 A I N A K Q A S E D R A I R L N N E V L R L A D E

CEPM 697 L H E E Q E H S M K I D A L R K S L E E Q V K Q L
 SMPM 674 L R Q E Q E N Y K H A E A L R K Q L E I E I R E I

CEPM 722 Q V Q I Q E A E A A A L L G G K R V I A K L E T R
 SMPM 699 T V K L E E A E A F A T R E G R R M V Q K L Q A R

CEPM 1 M S L Y R S P S A A L L K S P S Q A A F G A P F G
SMPM 1 S R

CEPM 26 S M S V A D L G S L T R L E D K I R L L Q E D L E
SMPM 3 T I Y R G V S P S T T R L E S R V R E L E D L L D

CEPM 51 S E R E L R N R V E R E R A D L S V Q V I A L T D
SMPM 28 L E R D A R V R A E R H A A D L G F Q V D A L S E

CEPM 76 R L E D A E G - T T D S Q I E S N R K R E G E L S
SMPM 53 R L D E A G G S T T Q T Q - E L L K R R E M E I N

CEPM 100 K L R K L L E E S Q L E S E D A M N V L R K K H Q
SMPM 77 K L R K D L E N A N A S L V L A E T S M R R R H Q

CEPM 125 D S C L D Y Q D Q I E Q L Q K - K - N A K I D R E
SMPM 102 T A L N E L A L E V E N L Q K Q K G K A E K D K S

CEPM 148 R Q R V Q H E V I E L T A T I D Q L Q K D K H T A
SMPM 127 H L I M E V D N V - L - G Q L D G A L K A K Q S A

CEPM 173 E K A A E R F E A Q A N E L A N K V E D L N K H V
SMPM 150 E S N L E G L D S Q L N R L K S L T D D L Q R Q L

CEPM 198 N D L A Q Q R Q R L Q A E N N D L L K E V H D Q K
SMPM 175 P E L N N A K S R L T S E N F E L L H I N Q D Y E

CEPM 223 V Q L D N L Q H V K Y T L A Q Q L E E A R R R L E
SMPM 200 A Q I L N Y S K A K S S L E S Q V D G F K R S L D

CEPM 248 D A E R E R S Q L Q S Q L H Q V Q L E L D S V R T
SMPM 225 D E A K N R F N L Q A Q L T S L Q M D Y D N L P A

CEPM 273 A L D E E S I A R S D A E H K L N L A N T E I T Q
SMPM 250 K Y D E E S E E A S N L R S Q V S K F N A D I A A

CEPM 298 W K S K F D A E V A L H H E E V E D L R K K M L Q
SMPM 275 L K S K F E R V L M S K T E E F E E M K R K F T M

CEPM 323 K Q A E Y E E Q I E I M L Q K I S Q L E K A K S R
SMPM 300 R I T E L E D T A E R E R L K A V S L E K L K T K

CEPM 348 L Q S E V E V L I V D L E K - A Q N T I A L L E R
SMPM 325 L T L E I K D L Q S E I E S L S L E N S E L I R R

CEPM 747 I R D L E T A L D E E T R R H K E T Q N A L R K K
 * * * * *
 SMPM 724 V R E L E S E F D G E S R R C K D A L A Q A R K F

CEPM 772 D R R I K E V Q - Q L V D E E H K N F V M A Q D T
 * * * * *
 SMPM 748 E R Q Y K E L Q T Q A E D D R R M V L E L - Q D L

CEPM 794 A D R L T E K L N I Q K R Q L A E S E S V T M Q N
 * * * * *
 SMPM 773 L D K T Q M K M K A Y K R Q L E E M E E V S Q I T

CEPM 819 L Q R V R R Y Q H E L E D A E G R A D Q A E S S L
 * * * * *
 SMPM 798 M N K Y R K A Q Q Q I E E A E H R A D M A E R T V

CEPM 845 H L I R A K H R S S V V T G K S S S K V F
 SMPM 823 T V R R V G P G G R A V S V A R E L S V T S N R G

SMPM 848 M I A T

La séquence protéique déduite du clone 3.2 présente ces caractéristiques d'organisation (figure 12) déterminés d'après McLachlan et Stewart (1975), McLachlan et Karn (1982) et Lanar *et al* (1986). Les résidus "skip" sont localisés aux positions 92, 289, 486, 515, 712. Ces résidus sont séparés par 7X28 acides aminés, excepté les résidus 486 et 515. La présence d'un résidu "skip" supplémentaire démontré également par Kagawa *et al* (1989) semble être une caractéristique des séquences de paramyosine. Cependant, les régions N-terminale (29 premier acides aminés) et C-terminale (13 derniers acides aminés) de la paramyosine de *C.elegans* ne présentent pas de structure en super hélice. Le clone 3.2 quand à lui, présente cette structure répétée sur toute sa séquence. Ceci peut s'expliquer par le fait que la séquence du clone 3.2 est incomplète. En ce qui concerne la composition en acides aminés (Figure 13), aucun résidu Tryptophane n'est présent dans la séquence du clone 3.2 contre un résidu pour *C.elegans*. Les rapports en acides aminés sont similaires à ceux de *C.elegans* :

	<i>S.mansoni</i>	<i>C.elegans</i>
A.A hydrophobes (A I L M V F Y W)	298	302
A.A acides (E D)	175	175
A.A basiques (K R H)	155	162

Par analyse de la séquence protéique (PCGENE, Genofit) déduite du clone 3.2, nous avons pu déterminer les sites potentiels de N-glycosylation et de phosphorylation (figure 14). On peut remarquer la présence de 16 sites potentiels de phosphorylation. Ces sites n'ont qu'une signification biologique potentielle. En ce qui concerne les sites de glycosylation, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences entre les poids moléculaires de la molécule produite lors d'une traduction d'ARN de ver adulte et celle de marquage métabolique, immunoprécipités à partir de serums dirigés contre le clone 3.2.

Figure 12: Structure répétée de la séquence du clone 3.2. a et d sont essentiellement des résidus hydrophobes. Cette organisation est interrompue par des résidus sauteurs ou "skip" aux positions 92, 289, 486, 515 et 712.

d e f g a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g a b c
* * * * *

1
8
36
64
93
121
149
177
205
233
261
290
318
346
374
402
430
458
487
516
544
572
600
628
656
684
713
741
769
797
825

V	S	P	S	T	T	R	L	E	S	R	V	R	E	L	E	D	L	D	L	S	R	T	Y	R	G
A	E	R	H	A	A	D	L	G	F	Q	V	D	A	L	S	E	L	E	N	A	N	A	R	T	R
T	Q	E	L	L	K	R	R	E	M	E	I	N	K	L	R	K	L	E	N	G	A	Q	S	T	Q
E	S	M	R	K	R	R	H	Q	T	A	N	N	E	L	L	D	E	N	N	L	Q	K	K	L	Q
A	E	K	D	K	S	H	L	I	M	V	D	N	N	L	V	L	G	D	D	L	K	S	Q	K	K
A	E	K	N	N	S	E	L	D	S	N	N	R	N	V	L	L	S	D	D	Q	K	Q	Q	K	S
L	N	S	A	K	S	R	L	T	S	V	D	F	G	N	L	K	H	Q	D	D	E	A	K	N	N
Y	S	K	A	K	S	S	L	E	S	Q	D	N	A	L	P	A	K	S	D	D	E	A	K	N	N
L	R	S	Q	V	S	K	F	N	A	D	I	A	A	L	K	S	K	T	F	E	R	V	L	M	S
F	E	E	M	K	R	K	F	T	M	R	I	I	K	D	L	Q	S	E	I	E	S	L	E	K	A
L	L	E	R	R	A	K	A	E	S	L	A	S	D	L	Q	R	R	V	D	E	L	T	I	E	V
L	L	T	S	Q	N	S	Q	L	E	S	E	N	L	R	L	K	S	S	L	V	N	R	D	L	N
402	L	E	A	L	R	S	Q	M	N	D	Q	V	K	E	L	K	S	S	A	L	H	D	A	E	R
430	M	D	Q	L	Y	Q	A	S	T	A	A	L	N	H	L	K	S	S	E	M	E	T	M	E	V
458	L	E	S	R	L	K	K	R	Y	L	I	A	D	L	E	I	T	Q	I	L	D	E	T	E	K
487	L	M	K	E	N	L	Q	I	T	E	H	K	L	E	L	A	N	E	R	I	V	S	D	E	R
516	L	A	E	N	N	L	Q	I	T	E	H	K	L	E	L	A	N	E	R	I	V	S	D	E	R
544	L	A	E	R	L	R	K	R	R	L	E	G	N	E	V	L	R	R	L	E	M	L	R	Q	E
600	L	T	N	D	K	R	R	L	E	G	N	E	V	L	R	R	L	E	M	L	R	Q	E	E	A
628	L	S	E	D	R	A	R	L	L	E	I	E	V	L	R	R	L	E	M	L	R	Q	E	E	A
656	S	A	E	A	L	R	V	Q	K	L	Q	R	V	R	E	L	E	S	T	Q	R	V	A	E	E
684	A	G	R	R	M	V	Q	K	L	Q	R	V	R	E	L	E	S	T	Q	R	V	A	E	E	E
713	A	G	R	R	M	V	Q	K	L	Q	R	V	R	E	L	E	S	T	Q	R	V	A	E	E	E
741	L	Q	D	L	L	Y	P	G	G	A	R	A	R	E	L	E	S	T	Q	R	V	A	E	E	E
769	L	Q	D	L	L	Y	P	G	G	A	R	A	R	E	L	E	S	T	Q	R	V	A	E	E	E
797	T	M	N	K	G	G	A	R	A	R	A	R	E	L	E	S	T	Q	R	V	A	E	E	E	E
825	R	R	V	G	P	G	A	R	A	R	A	R	E	L	E	S	T	Q	R	V	A	E	E	E	E

AA	Nombre	%	AA	Nombre	%
Glu(E)	118	13,8	Val(V)	33	3,8
Leu(L)	116	13,6	Ile(I)	29	3,4
Arg(R)	83	9,7	Met(M)	22	2,5
Ala(A)	74	8,6	Gly(G)	17	1,9
Lys(K)	61	7,1	Tyr(Y)	12	1,4
Ser(S)	60	7	Phe(F)	12	1,4
Gln(Q)	53	6,2	His(H)	11	1,2
Asp(D)	53	6,2	Pro(P)	4	0,4
Asn(N)	48	5,6	Cys(C)	1	0,1
Thr(T)	44	5,1	Trp(W)	0	0

Figure 13: Composition totale en acides aminés de la protéine produite par le clone 3.2. Pourcentage pour chaque acide aminé.

Sites potentiels de N- glycosylation

position 86: dlana N aslvl.

position 204: eaqil N yskak.

position 550: mkenk N lsqrv.

Sites potentiels de phosphorylation par kinase dépendante

AMPC/GMPc:

position 298: mkrkf T mrite.

position 428: anrri T dleal.

position 494: slrks T trtie.

Sites potentiels de phosphorylation par protéine kinase C.

position 12: gvspS T trles.

position 51: qvdal S erlde.

position 95: vlaet S mrrrh.

position 298: mkrkf T mrite.

position 396: lvndl T dknnl.

position 419: kelks S lrdan.

position 489: deele S lrkst.

position 494: slrks T trtie.

position 552: enknl S qrvkd.

position 699: eirei T vklee.

position 735: efdge S rrckd.

position 823: aertv T vrrvg.

position 844: elsvt S nrgmi.

Figure 14: Sites potentiels de N-glycosylation et de phosphorylation de la séquence protéique déduite du clone 3.2.

CONCLUSION DISCUSSION

Le criblage d'une banque d'expression d'ADNc de *Schistosoma mansoni* par les anticorps de classe IgE d'un serum d'infection de rat nous a permis de caractériser notamment le clone 3.2. Ce clone s'est avéré être une copie plus complète de la paramyosine de *S.mansoni* (Sm97), précédemment caractérisée par Pearce *et al.* (1986) et Lanar *et al.* (1986). Ces auteurs ont montré que des souris vaccinées avec un extrait antigénique de ver adulte en présence de BCG, présentent une réponse anticorps presque exclusivement dirigée contre Sm97. Lanar *et al.* ont cloné et séquencé un fragment de 1317 pb (clone MAC 97.3). Le clone 3.2 possède deux sites EcoRI internes et la séquence du fragment EcoRI interne est identique à celle du clone MAC 97.3, excepté 9 acides aminés (Voir le chap. résultats). La présence des trois fragments EcoRI n'est pas un artefact de clonage dû à la ligation de trois molécules d'ADNc. En effet:

1. Un seul cadre de lecture est ouvert sur les 2553 pb.
2. La séquence protéique déduite des trois fragments présentent une homologie de 37% avec la chaîne lourde de la myosine de *C.elegans* comme l'a décrit Lanar *et al.* (1986). De plus la séquence protéique du clone 3.2 présente une homologie de 34% avec la paramyosine de *C.elegans* récemment clonée (Kagawa *et al.*,1989). L'homologie est présente sur presque toute la longueur du clone (820/851 AA).
3. La périodicité (abcdefg)_n avec des résidus hydrophobiques en position a et d se retrouve sur toute la longueur de la séquence. Cette organisation est caractéristique d'une structure en super hélice .
4. Les trois fragments EcoRI hybrident un ARNm de 4 kb chez le ver adulte.
5. La protéine de fusion du clone 3.2 est reconnue par deux anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine native Sm 97: MBL-Sm-4DI et MBL-Sm-4BI, gracieusement fournis par E.Pearce, S.James et A.Sher (NIH,Bethesda MD,USA). Seul l'anticorps MBL-Sm-4BI reconnaît le clone MAC 97.3. Le clone 3.2 possède donc au moins un épitope supplémentaire.
6. Enfin, la protéine recombinante est reconnue par un serum polyclonal de lapin dirigé contre la paramyosine d'*Owenia fusiformis* (Diano *et al.*,1987).

La paramyosine a donc été décrite comme possédant un poids moléculaire de 97 kDa. Or les serums dirigés contre le clone 3.2 reconnaissent une molécule de 88 kDa. Nous pouvons exclure un problème de dégradation, la préparation antigénique étant réalisée en présence de PMSF et d'EDTA. En absence de ces inhibiteurs de protéase Pearce *et al.* (1986) ont décrit la présence de deux produits de dégradation de Sm 97 à 95 et 78 kDa. Ces produits de dégradation n'ont jamais été mis en évidence lors de nos expériences. Les auteurs ont caractérisé Sm 97 en utilisant un gel d'acrylamide en gradient (7-15%). Dans les mêmes conditions, les serums anti-clone reconnaissent effectivement une molécule co-migrant avec le témoin de poids moléculaire 97 kDa. Cependant les serums dirigés contre le clone 3.2 reconnaissent par la technique de Western blot plus ou moins faiblement une molécule de poids moléculaire proche de 200 kDa. Grandea *et al.* (1989) ont observé le même phénomène avec la paramyosine recombinante de *Dirofilaria immitis*. D'autres protéines, certainement des myosines, possèdent les mêmes épitopes que la paramyosine. Ceci n'a pas été observé avec les anticorps monoclonaux dirigés contre Sm97 (Western blot) et par immunoprécipitation avec les serums anti-clone.

Le clone 3.2, codant pour 851 acides aminés ne permet pas de connaître la séquence entière de la paramyosine de *S.mansoni*. La séquence entière de la paramyosine de *C.elegans* contient 866 acides aminés. On peut donc estimer qu'il nous manque environ 15-20 acides aminés, à la fois de l'extrémité Nt et Ct pour recouvrir la séquence en entier. Le résidu de méthionine en position 73 ne représente probablement pas l'initiation de la molécule, car la structure répétée et les homologies avec les myosines et paramyosine de *C.elegans* sont maintenues en amont de ce résidu. Pour déterminer la séquence entière de la paramyosine trois voies peuvent être envisagées. Tout d'abord, un clone génomique pourra être isolé. Pour cela il faudra approfondir l'étude du gène codant pour la paramyosine, par des méthodes de Southern blot. Des résultats préliminaires indiqueraient qu'une seule copie du gène de la paramyosine serait présent dans le génome de *S.mansoni*. La même observation a été faite pour *C.elegans* par Kagawa *et al.* (1989). Une autre voie consisterait à utiliser la technique de "primer extension" à partir de l'ARNm du stade ver adulte. Enfin on peut

envisager une amplification du gène ou de L'ARNm par la technique de PCR (Polymerase chain reaction) et son séquençage. Enfin la paramyosine native devra être purifiée et séquencée partiellement. Ces fragments séquencés seront comparés avec la séquence protéique déduite du clone 3.2.

En ce qui concerne l'homologie de séquences des paramyosines de *C.elegans* (nématode) et *S.mansoni* (trématode), on peut s'étonner de son faible taux (35%). La séquence partielle (82 acides aminés) de la paramyosine de *Dirofilaria immitis* (nématode) a été déterminée (Grande et al,1989). Cette séquence est homologue à 90% avec celle de *C.elegans* et à 50% avec celle de *S.mansoni*. Ceci confirme la divergence entre les paramyosines de trématodes et nématodes, bien qu'une réactivité croisée entre les paramyosines de différentes espèces existe.

D'autres protéines musculaires de *S.mansoni* ont été caractérisées et clonées. La tropomyosine est fortement reconnue par des serums de souris vaccinées avec des cercaires irradiées (Xu et al,1989) malgré son expression réduite au stade cercaire. La tropomyosine de *S.mansoni* partage des déterminants antigéniques avec *Biomphalaria glabrata* (Dissous, communication personnelle) et semble être à la base d'une mimicrie moléculaire (Dissous et Capron,1989). Comme la paramyosine, cette molécule présente une structure en hélice et est homologue à 50% avec les tropomyosines de mammifère. Une partie de la myosine de *S.mansoni* a également été clonée (Newport et al,1987).

La séquence du clone 3.2 présente des sites potentiels de phosphorylation. Un rôle important de la phosphorylation des protéines impliquées dans le mécanisme de contraction musculaire, la paramyosine et la myosine, a été rapporté (Cohen,1982; Castellani et Cohen,1987). Schriefer et Waterston (1989) ont montré que des sérines localisées à l'extrémité Nt (non hélicoidale) de la paramyosine de *C.elegans* sont la cible de la phosphorylation. Les sérines impliquées présentent le motif suivant: S-S-A. Cependant la relevance *in vivo* de cette phosphorylation reste à déterminer. Le motif S-S-A n'a pas été retrouvé dans la séquence du clone 3.2 qui n'est pas complète et ne possède pas de régions non hélicoïdales.

Le message important de ce travail est que le même antigène peut induire différentes réponses immunes dans différents modèles. Chez le rat la paramyosine peut induire une réponse IgE. Chez la souris, l'injection d'antigènes solubles du stade ver adulte de *S.mansoni* en présence de BCG par voie intradermique, induit une réponse anticorps essentiellement dirigée contre Sm 97 (paramyosine). Cette molécule stimule les lymphocytes T des souris vaccinées à produire de l'interféron gamma qui active les macrophages à tuer les schistosomules (James et al,1988; Pearce et al,1988). Nos travaux montrent que la paramyosine recombinante et native est la cible de la réponse anticorps IgG et IgE chez le rat et l'homme. Les serums d'infection de rat et d'homme contiennent notamment des anticorps IgE qui reconnaissent la protéine de fusion. Une réponse humorale IgE vis-à-vis de l'antigène natif est induite si la protéine recombinante est injectée chez le rat Fischer par voie intra-péritonéale.

Comment une protéine musculaire peut-elle être accessible au système immunitaire? Les lymphocytes de souris vaccinées par la paramyosine produisent de l'IFN gamma en présence de schistosomules. Cette observation suggère que lors d'une infection, la paramyosine (non présente à la surface du parasite) peut induire une réponse cellulaire T protectrice à la suite de son relargage par les larves. De plus Matsumoto *et al* (1988) en utilisant des sondes anticorps polyclonales produites chez le lapin et dirigées contre la paramyosine de *Limulus* et d'*Owenia*, ont mis en évidence la présence de paramyosine au niveau du tégument parasitaire. Plus précisément la paramyosine a été localisée au niveau des "elongate bodies". Cette observation impliquerait une distribution et des fonctions jusqu'alors inconnues pour la paramyosine. Notamment cette protéine pourrait être secrétée par *S.mansoni*. Cette observation devra être confirmée avec des sondes spécifiques de *S.mansoni*.

Alors que les mécanismes de relargage de la paramyosine ne sont pas très compris, Masterson *et al.* (soumis) ont mis en évidence des épitopes présentant une homologie avec la myosine pour une GP38 de surface des schistosomules. Ceci pourrait suggérer que le "turnover" de cette molécule de surface et sa possible réactivité croisée avec la paramyosine au niveau lymphocytaire T expliquerait l'induction d'une réponse anti-paramyosine.

Afin de tester le rôle des différents mécanismes effecteurs, il apparaît nécessaire d'obtenir une meilleure expression pour purifier la protéine recombinante. Des essais d'électroélution de la protéine de fusion ont été réalisés sans succès. Une molécule de 190 kDa est difficilement éluée d'un gel d'acrylamide 8%. C'est pourquoi nous envisageons la purification par immunoaffinité. Pour cela, 20 mg d'anticorps monoclonaux spécifiques de la paramyosine de *S.mansoni* ont été produits à partir d'une souche cellulaire hybride MBL-Sm-4DI chez des souris CB6 F1. En ce qui concerne le rôle biologique de la paramyosine, sa meilleure compréhension sera possible lorsque la protéine recombinante sera bien exprimée chez *E.coli* ou d'autres systèmes comme la levure. Il sera ainsi possible de quantifier les réponses IgG et IgE chez le rat et l'homme par ELISA. Notamment il est prévu de tester des serums de bilharziens en provenance du Brésil, ayant déjà fait l'objet d'une étude par Corrêa-Oliveira *et al.* (1989). Les auteurs ont montré qu'après traitement à l'oxamniquine, seuls les patients guéris présentent un taux élevé constant en anticorps dirigés contre la paramyosine. Quand aux individus présentant toujours les symptômes, leur réponse en anticorps dirigés contre la paramyosine baisse rapidement. Nous pourrions tester la réponse IgE spécifique de la paramyosine chez les différents patients.

Une collaboration a été mise en place avec l'équipe d'Alan Sher afin d'exprimer le clone 3.2 dans des vecteurs tels que Salmonelle ou le BCG. La production de protéine recombinante purifiée ou exprimée sous forme de vaccin vivant permettra d'engager des expériences de vaccination contre un challenge à *S.mansoni*. Il faudra confirmer avec le clone 3.2 la protection obtenue avec le clone MAC 97.3 chez la souris (en présence de BCG) et étudier son rôle potentiellement protecteur chez le rat.

Les essais de vaccination utilisant une seule protéine ont montré les limites de cette approche: Les taux de protection sont partiels, 40% chez la souris, 70% chez le rat (Balloul *et al.*, 1987b et c; Pearce *et al.*, 1988). Chez des animaux non-congéniques comme le babouin, les taux de protection sont très variables (Balloul *et al.*, 1987a). Enfin l'utilisation d'un seul antigène peut induire des problèmes de restriction par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Wolowczuck *et al.*, 1989). Il semble donc indispensable d'envisager l'utilisation de plusieurs antigènes. D'autres molécules potentiellement protectrices ont été

clonées dans le laboratoire: il s'agit de deux glutathion-S-transférases Sm 28 (Balloul *et al*,1987c) et Sm 26 (Trottein *et al*,soumis). Il restera à déterminer le mode optimal d'administration des antigènes (ensemble ou séparément) et le choix de l'adjuvant approprié. Cependant, un mélange d'antigènes posera des problèmes de production et de coûts industriels élevés.

L'expression de la paramyosine permettra son utilisation avec les GST. Il reste à déterminer si l'immunité à médiation cellulaire, dirigée contre la paramyosine, constatée chez la souris ou la réponse humorale anaphylactique telle qu'on la constate chez le rat provoque le meilleur niveau de protection chez l'homme.

MATERIEL ET METHODES

I MATERIEL BIOLOGIQUE.

1. Parasites.

1.1 Obtention de l'antigène de ver adulte: le cycle d'une souche porto-ricaine de *Schistosoma mansoni* a été maintenue chez *Biomphalaria glabrata* et le hamster doré: *Mesocricetus auratus*. Six semaines après l'infection des hamsters par 1000 cercaires, les vers adultes sont récupérés par perfusion totale. Les vers sont lavés plusieurs fois dans du MEM (Milieu minimum Eagle) (Gibco, U.K.) puis homogénéisés en ultra-turrax (Janke and Kunkel) dans du PBS (Phosphate de sodium 0,01 M à pH 7,4 et NaCl 0,15 M) en présence de PMSF 1 mM et d'EDTA 10 mM. la préparation antigénique est conservée à -20°C.

1.2 Marquage métabolique: 20 vers adultes sont incubés dans 1,5 ml de MEM sans méthionine ni cystéine pendant 1 heure à 37°C. Après avoir changé le milieu MEM, 1,8 GBq de méthionine ³⁵S (4,77 TBq/mmol) (Amersham, U.K.) est ajouté. L'incubation, 6 heures à 37°C, est réalisée dans une atmosphère à 5% en CO₂. Les vers sont alors lavés dans du MEM, puis homogénéisés en TNSTE: Tris HCl 5 mM; NaCl 0,15 M; SDS 0,3%; Triton X100 1,7% et EDTA 2 mM en présence de PMSF 1mM.

2. Serums.

2.1 Origine, obtention: les serums de rats infectés sont obtenus après avoir infesté des rats Fischer ou "Brown Norway" par 1000 cercaires. Une saignée est effectuée chaque semaine.

Les serums de rats dirigés contre la protéine de fusion du clone 3.2 sont obtenus par injection intrapéritonéale de 50µg de matériel bactérien enrichi en protéine recombinante (II 3.) en présence d'hydroxide d'alun. Deux nouvelles injections sont effectuées à deux semaines d'intervalle. Les serums sont recueillis toutes les semaines après la seconde injection.

2.2 Conjugués anticorps: Des conjugués couplés à la peroxydase, dirigés contre les IgG de lapin, de rat ou humain (Institut Pasteur Production) détectent les IgG des différents serums étudiés. Les conjugués anti IgE de rat et humain utilisés sont ceux de MIAB (Uppsala, Suède), marqués à l' ^{125}I par la méthode à la chloramine T (Greenwood *et al*, 1963). Un anticorps monoclonal de souris (IgG1) dirigé contre la chaîne lourde des IgE de rat (Biosys, France) a également été utilisé. La révélation est réalisée grâce à un conjugué dirigé contre les IgG de souris (Institut Pasteur Production).

2.3 Western Blot: L'échantillon à analyser est d'abord séparé selon la méthode des tampons discontinus de Laemmli (1970) sur gel de polyacrylamide. Le gel de séparation est réalisé dans un tampon Tris HCl 0,375 M à pH 8,8, le gel de concentration dans du Tris HCl 125 mM pH 6,8 et contiennent tous les deux du SDS 0,1%. L'échantillon est alors solubilisé dans du: Tris HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 3%; glycérol 10%; β -mercaptoéthanol 2,5% et bleu de bromophénol. La migration est réalisée en présence de Tris Glycine pH 8,3; SDS 0,1%. Les protéines ainsi séparées sont transférées sur nitrocellulose selon Towbin *et al* (1979). Le tampon de transfert est le suivant: Glycine 150 mM; Tris 20 mM; méthanol 20%. Pour un voltage de 6V/cm le transfert dure 3 heures à 4°C. L'incubation de la membrane avec les serums s'effectue selon la méthode de Tsang *et al* (1983). La membrane est lavée deux fois pendant 15 minutes à température ambiante dans du PBS-Tween (Phosphate de sodium 0,01 M à pH 7,4; NaCl 0,15 M et Tween 20 0,05%). La feuille est ensuite incubée 30 minutes sous agitation dans du PBS contenant du lait écrémé à 5%. Une dilution (1/200 à 1/500) du sérum à tester peut alors être ajoutée. L'incubation s'effectue 3 heures à température ambiante sous agitation. Les membranes sont lavées trois fois avec le PBS-Tween. Un anticorps conjugué à la peroxydase, dirigé contre les anticorps totaux d'une espèce (rat, souris, lapin et homme) permettra l'immunodétection. Le conjugué est dilué au 1/1000 dans du PBS-lait et incubé avec les membranes une heure à température ambiante. Avant la révélation, trois lavages de 10 minutes dans du PBS-Tween et un rinçage dans le PBS sont nécessaires. Le substrat utilisé est le 4-chloro-1-naphthol (60mg/100ml de PBS) en présence de H_2O_2 (60 μl de H_2O_2 30% /100ml de PBS).

2.4 Immunoprécipitation: Les antigènes marqués (100000-500000cpm) sont repris dans du TNSTE (voir I 1.). Ils sont ensuite incubés en présence de 10 μ l de sérum pendant 3 heures à température ambiante. Les échantillons sont transférés sur 10 mg de protéine A Sepharose CL-4B (Pharmacia, Suède), préalablement équilibrée dans du TNSTE, pendant 3 heures. Le contact entre les complexes immuns et la protéine A peut avoir lieu une nuit à 4°C. Ensuite le culot est lavé 9 fois dans du TNSTE et une fois dans du Tris HCl 10 mM pH 7,4 et EDTA 2 mM. Les antigènes sont élués à 100°C pendant 3 minutes avec 40 μ l de tampon échantillon (paragraphe précédent).

3. Production d'anticorps monoclonaux.

3.1 Culture de la souche hybride, production d'ascites: Pour produire un anticorps monoclonal dirigé contre la paramyosine de *S. mansoni*, une souche hybride MBL 4DI réalisée par Pearce *et al.* (1986) à partir de souris C57 B1/6J a été utilisée. Cette souche a été cultivée en milieu A contenant 15 % de sérum de veau foetal (DMEM, NaHCO₃ 4 mM, AA non essentiels 3,5%, Glutamine; Pénicilline 100 UI/ml, Streptomycine 50 μ g/ml). Pour obtenir de l'ascite, 5 millions de cellules sont injectées par voie intrapéritonéale chez des souris ayant reçues 1 semaine auparavant 0,5 ml de pristane (2,6,10,4 tétraméthyl pentécane). Les liquides d'ascites prélevés sont centrifugés à 800 g pour séparer les cellules hybrides qui peuvent être de nouveau injectées aux animaux. L'ascite peut être conservé à -20°C.

3.2 Purification de l'anticorps monoclonal à partir des liquides d'ascites: L'ascite dilué au demi dans une solution d'eau physiologique est précipité en présence de sulfate d'ammonium 50% pendant 30 minutes. Un précipité contenant la fraction IgG est obtenu après centrifugation à 200 g 15 minutes. La précipitation est renouvelée. Le culot final est repris dans de l'eau physiologique correspondant à la moitié du volume initial en ascite. Une première dialyse de 24 heures contre du NaCl 0,9% et une seconde de 48 heures contre du Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 sont réalisées. Ensuite, une colonne DEAE Trisacryl (IBF, France) de 16X10 mm est équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. Le dialysat est passé sur la colonne, les IgG chargées positivement sont d'abord éluées puis dialysées contre du PBS 0,01 M pH 7,4. Les autres protéines sont décrochées par du Tris-HCl

0,05 M pH 8 NaCl 0,5 M. Un dosage des protéines est réalisé selon la technique de Bradford (1976).

4. Souches bactériennes et vecteurs de clonage.

4.1 Milieux de culture

LB pour 1 litre: Bactotryptone 10 g;Extrait de levure 5 g;NaCl 10 g. Le pH est ajusté à 7,5 avec de la soude. Pour les boîtes LB 15 g de bactoagar sont ajoutés.

SOC pour 1 litre: Tryptone 20 g;Extrait de levure 5 g;NaCl 0,58 g; KCl 0,18g; MgCl₂ 10 mM;MgSO₄ 10 mM;Glucose 20 mM. Le pH est ajusté à 6,8-7.

TFB: K MES 10 mM pH 6,2; RbCl 100 mM; MnCl₂ 45 mM; CaCl₂ 10 mM; HgCOCl₂ 3mM.

2 TY pour 1 litre: Bactotryptone 10 g; Extrait de levure 10 g;NaCl 5 g.

H pour 1 litre: Bactryptone 10 g; NaCl 8 g. 8g et 12g d'agar sont ajoutés respectivement pour le milieu agar molle et solide.

4.2 Souches bactériennes: Y1090 est la souche d' *E.coli* utilisée comme hôte pour le phage lambda gt11: (*E.coli* lacU169 proA+ lonaraD139 strA sup F [trpC22::Tn10] (pMC9)). Pour l'obtention de lysogènes on utilise *E.coli* Y1089: (*E.Coli* lacU169 proA+ lon araD139 strA hflA150 [chr::Tn10] (pMC9)). La souche E.Coli JM 107 (*E.Coli* lacpro, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17, sup E44, rel A1,F'traD36, proAB, lac lq M15) a été choisie pour la transformation par le plasmide pUC 13. La souche TG1 est utilisée pour le sous-clonage en phage M13: K12, lacpro, sup E,thi,hsd D5/F' traD36. proA⁺ B⁺, lac I^q lacZ M15.

4.3 Vecteurs de clonage: lambda gt11: lac5 (shindIII 2-3) srl 3° cl857 srl 4° nin5 srl 5° Sam100

pUC 13: lacZ Amp+ pMB1+

II CLONAGE MOLECULAIRE, CARACTERISATION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE.

1. Généralités.

L'ADN étranger est inséré au niveau d'un "polylinker" qui est en phase avec le fragment du gene lacZ codant pour la β -galactosidase. Les phages recombinants sont sélectionnés ainsi: si l'insert est présent, la β -galactosidase phagique ne peut cliver un substrat le Xgal, en composé chromophore bleu. Les phages recombinants induisent des plages de lyse blanches, contrairement aux phages non recombinants (plages de lyse bleues).

Le phage lambda gt11 peut développer selon son hôte bactérien un cycle lytique ou lysogénique.

2. Utilisation d'une banque d'ADNc.

La banque d'ADNc du stade vers adulte de *S.mansoni* et son criblage par des sérums d'infection ont été réalisés par Pierce *et al.*(1987). Un premier criblage avec un sérum de lapin hyperimmun a permis de sélectionner trente clones. Ces derniers ont été repiqués puis sélectionnés selon leurs aptitude à fixer les IgE d'un sérum de rat infecté (rat "Brown Norway").

3. Lysogènes.

3.1 Obtention de lysogènes: Les cellules *E.coli* Y1089 sont cultivées dans du milieu LB en présence d'ampiciline (30 μ g/ml) jusqu'à ce que la densité optique (DO) soit égale à 0,7 (600nm). Après une centrifugation les cellules sont reprises dans 1/3 de volume de MgSO₄ 10mM et incubées une heure à 37°C. Les cellules Y1089 et les phages recombinants dans un rapport phage/bactérie: 10/1 sont mis en contact 20 minutes dans du milieu LB auquel on a ajouté du MgCl₂ 10mM. 1000 cellules sont ensuite étalées sur boîte. Les colonies obtenues sont repiquées en double, une boîte étant incubée à 32°C, l'autre à 42°C. Les clones lysogènes se développent à 32°C mais non à 42°C.

3.2 Préparation d'antigènes recombinants: Une colonie lysogène est mise en culture dans du milieu LB en présence d'ampiciline (30 µg/ml) jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,5-0,7 à 600nm. La température est alors élevée à 42°C pendant 20 minutes. Après l'addition d'IPTG 10mM finale, la culture est incubée une heure à 37°C. Le culot bactérien est ensuite repris dans le tampon de lyse: Triton X-100 2%, MgCl₂ 10mM, Déoxyribonucléase 100ng/ml, Lysozyme 250ng/ml. 30 minutes après, une première centrifugation à 200g est effectuée. D'après la méthode de Collins *et al.* (1986). Le surnageant est repris à 100000g pendant 10 minutes (Beckman TL 100, rotor TLA 100-2). Le dernier culot est resuspendu dans une solution de PBS, SDS 2% et DTT 20mM en présence de PMSF 1 mM. Chaque fraction est analysée sur gel de polyacrylamide.

III ACIDES NUCLEIQUES: EXTRACTIONS, HYBRIDATIONS.

1. Amplification, extraction des inserts.

1.1 Obtention de L'ADN phagique: Les bactériophages recombinants sélectionnés, sont stockés dans du SM (NaCl 100 mM; MgSO₄ 7H₂O 8 mM; Tris 50 mM à pH 7,5; Gélatine 0,01%). Pour extraire l'ADN phagique, il est préférable de faire pousser sur boîte LB en présence d'ampiciline (30 µg/ml) la solution phagique. En effet il peut apparaître des révertants. 1 colonie recombinante est mis en culture en présence d'*E.coli* Y1090. on utilise 4 ml d'une culture bactérienne effectuée sur la nuit, diluée au 1/1000. Après 6-7 heures, lorsqu'on observe une lyse bactérienne, quelques gouttes de chloroforme sont alors ajoutées. Les phages sont récupérés par centrifugation par élimination des débris bactériens. L'ADN bactérien est éliminé par de la DNase I (5 µg/ml de culture) 1 heure à 37°C. Les phages sont ensuite précipités dans un volume de PEG 20%, NaCl 2,5 M 30 minutes sur la glace. Le culot phagique, après élimination du PEG, est repris dans une solution d'EDTA 20 mM; SDS 0,5% et de protéinase K 50 µg/ml pendant une heure à 65°C. Deux extractions phénol-chloroforme sont réalisées avant de précipiter l'ADN à l'éthanol. L'ADN phagique est repris dans du TE (Tris HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1mM pH 8) et est

prêt à être digéré par EcoRI, à raison de 10 U pour 1 μ g d'ADN phagique en présence du tampon fourni par le fabricant (Boehringer, RFA).

1.2 Extraction de l'insert: La digestion est stoppée dans une solution d'urée 4 M, sucrose 50%, EDTA 50 mM, bleu de bromophénol 0,02%. L'insert est séparé sur un gel d'agarose à bas point de fusion (BRL, USA) 0,8 à 1,2% en tampon TAE (Tris 4 mM; acétate de sodium 2 mM et EDTA 0,2 mM pH 7,9), permet de séparer l'ADN phagique de l'insert. Les fragments sous-clonés sont visualisés sous U.V. par le bromure d'éthidium. La bande correspondant à l'insert est découpée au scalpel et extrait d'après les instructions du fabricant (Bio 101, LaJolla) par la méthode Geneclean. Au fragment d'agarose contenant l'insert 2-3 volumes d'une solution de NaI sont ajoutés. Après une incubation à 45°C-55°C Jusqu'à dissolution complète, une solution de silice permet la fixation de l'ADN. L'insert ainsi fixé est lavé plusieurs fois dans de l'éthanol 50% et Tris pH 7-8,3 et élué dans de l'eau bidistillée à 45°C-55°C pendant 2-3 minutes. La qualité de la préparation est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose.

1.3 Sous clonage de l'insert dans pUC 13: Le plasmide pUC 13 (Pharmacia, Suède) est linéarisé par digestion en présence d'EcoRI. Pour minimiser la recirculation du plasmide, son extrémité 5' phosphate est déplacée par la phosphatase alcaline bovine une heure à 60°C dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 10 mM. La réaction de ligation entre pUC 13 et l'insert est effectuée en utilisant l'ADN ligase du phage T4 (1U) avec un rapport molaire vecteur/insert de l'ordre de 1 dans un volume réactionnel de 10 μ l. Le temps de réaction est de 16 heures à 14°C dans le tampon suivant: Tris 50 mM pH 7,8; ATP 1mM; Dithiothréitol 20 mM et MgCl₂ 10 mM. La solution plasmidique est alors diluée 4 fois avec de l'eau bidistillée pour la transformation de E.Coli JM 107 selon la méthode proposée par Hanahan (1983). Elles sont cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent une concentration de 5 à 7 10^7 cellules/ml. Les JM 107 sont rendues compétentes par traitement au TFB (I 4.) en présence de diméthyl-sulfoxyde et de dithiothréitol. A 210 μ l de JM 107 (4 10^6 bactéries environ). 50 ng de plasmide sont ajoutés. Après 30 minutes sur la glace, la préparation est mise à 42°C 90 secondes puis refroidie à nouveau 2 minutes sur la glace. 800

μ l de SOC sont ajoutés avant d'incuber 1 heure à 37°C. 200 μ l de solution bactérienne sont étalés sur agar LB en présence d'ampiciline, de Xgal 2% et d'IPTG 100 mM. Le mode de sélection des clones recombinants est le même que pour lambda gt11 (II 1.). le lendemain les colonies blanches sont repiquées, cultivées puis amplifiées. L'efficacité de transformation est d'environ 10^7 colonies/ μ g de plasmide natif.

1.4 Amplification de l'insert. Les inserts peuvent être amplifiés et extraits par centrifugation en gradient isopycnique de CsCl selon la méthode de Bulher et Treich (CEN Saclay) communiquée par Beckman S.A. (USA). Le culot bactérien est remis en suspension dans du tampon TTE (Tris-HCl 0,1 M pH 8; Triton X100 5%; EDTA 50 mM) avant de laisser agir la solution de lysozyme (3,33 mg/ml). L'échantillon est bouilli pendant 100 secondes. Une ultracentrifugation est alors effectuée à 228000g pendant 5 minutes (Beckman TL 100, rotor TLA 100-2). Le surnageant est repris, et pour 1ml de celui-ci, 1g de CsCl est ajouté. Le bromure d'éthidium permettra la visualisation de la bande plasmidique après une ultracentrifugation à 228000g pendant 12 heures. La bande plasmidique est récupérée à l'aide d'une aiguille. Le bromure d'éthidium est extrait au N-butanol et l'ADN plasmidique est précipité en présence d'acétate d'ammonium 2,5M et 2,5 volumes d'éthanol à température ambiante, puis dissout dans de l'eau bidistillée. Afin de vérifier le succès du sous-clonage le plasmide est digéré et l'insert est isolé sur gel d'agarose et extrait comme il a été décrit précédemment.

1.5 Marquage de l'insert au 32 P. La sonde d'ADNc après avoir été amplifiée et isolée est radiomarkée en utilisant du dCTP 32 P (111 TBq/mmmole) (Amersham, U.K.) et la méthode de "random priming" selon Feinberg et Vogelstein (1983). 25 ng d'ADN et $1,85 \cdot 10^6$ Bq de nucléotides marqués suffisent pour un temps de réaction de 5 heures à température ambiante en présence de fragment Klenow de l'ADN polymérase. L'activité spécifique du marquage obtenu est d'environ 10^9 dpm/ μ g d'ADN.

2. ARN.

2.1 Extraction: Les ARN totaux des différents stades parasitaires sont préparés selon la méthode de Chirgwin (1978) modifiée comme l'ont décrit précédemment Pierce *et al.*

(1985) : 1g de parasites est homogénéisé dans une solution contenant du thiocyanate de guanidium 4 M; de l'EDTA 10 mM à pH 7,4; de l'acétate de sodium 0,1 M; 5% de β mercapto-ethanol et 2% de N-lauryl sarcosine. L'homogénéisation est réalisée dans un appareil Potter-Elvehjem. L'homogénat est soumis aux ultrasons et puis centrifugé pendant 10 minutes à 16000g dans une centrifugeuse Sorvall (rotor HB-4). Le surnageant est déposé sur 1,5 ml d'une solution de chlorure de césium (CsCl 3,4 M; EDTA 10 mM à pH 7; acétate de sodium 50 mM). L'ARN est obtenu après une ultracentrifugation de 20 heures à 110000g à 20°C (Beckman L8-70M, rotor SW 55 Ti). Le culot est dissout dans de l'eau bidistillée, puis précipité dans l'ethanol. Le précipité est recueilli par une centrifugation.

2.2 Produits de traduction d'ARN du stade vers adultes: Le système réticulocytaire de lapin (Promega, Madison, USA) a été utilisé d'après Pelham et Jackson (1976), en présence de 3,5 MBq/ml de méthionine ^{35}S (4,77 TBq/m mole) (Amersham, UK.). A 2,6 l D'ARN (3 g/l, DO 260/280=2) sont ajoutés: 21 μl de lysat, 1,5 μl de solution d'acides aminés à 1 mM (sans méthionine), 3,72 μl de methionine S35 et 2,2 μl d'eau bidistillée. La réaction s'effectue 1 heure à 30°C.

2.3 Northern Blot: La technique utilisée est celle décrite par Thomas (1980): 10 μg d'ARN total ont été dénaturés en présence de glyoxal et 50% de DMSO dans les conditions suivantes: 5 μl de solution d'ARN total sont incubés une heure à 50°C en présence de 4 μl de glyoxal déionisé (par passage sur résine AG 501-X8 D de Bio-Rad, USA) de 3 μl d'une solution de phosphate de sodium 10 mM et de 12 l de DMSO. Les échantillons sont mis sur la glace avant d'être repris dans 5 μl de tampon échantillon (Bleu de bromophénol 0,5%; sucrose 50% et phosphate de sodium 10 mM à pH 6,5). Les ARN sont séparés en gel d'agarose 1%. Le tampon utilisé est du phosphate de sodium 10 mM à pH 6,5. Ensuite l'ARN est transféré sur nitrocellulose pendant 12 heures selon la méthode de Southern (1975). Le transfert est réalisé en tampon SSC: NaCl 0,15 M et citrate de trisodium 0,015 M. Le filtre de nitrocellulose est porté à 80°C pendant 2 heures afin de fixer irréversiblement l'ARN. Ainsi traité, il est prêt pour l'hybridation. Le tampon d'hybridation comprend 50% de formamide; du SSCX5; du phosphate de sodium 50 mM à pH 6,5; 12 $\mu\text{l}/\text{ml}$ d'ADN de sperme de Hareng soniqué et de la solution de Denhardt's X10 (serum albumine

bovine à 0,2%; Ficoll à 0,2%; polyvinylpyrrolidone à 0,2 %). Une pré-hybridation est réalisée en présence de ce tampon 3 heures à 42°C. Pour l'hybridation, une nuit à 42°C, on ajoute la sonde radioactive au même tampon. Les membranes sont lavées 30 minutes à 60°C:

1 lavage en SSCX2 et SDS 0,1%

3 lavages en SSCX1 et SDS 0,1%

3 lavages en SSCX0,2 et SDS 0,1%

Le filtre encore humide, entouré d'un film plastique, est exposé à -70°C en autoradiographie.

IV SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE

1. Phage M13.

1.1 Généralités: Les vecteurs phagiques utilisés dérivent du M13mp développés par Messing *et al.*, (1983). Le mode de sélection des phages recombinants est le même que pour lambda gt11 (II 1.). Ce vecteur est très utilisé car l'ADN inséré peut être obtenu sous deux formes, simple et double-brin. De façon naturelle le phage contenant un ADN simple brin s'adsorbe au niveau d'*E.coli* F+. Une fois dans la bactérie, l'ADN est répliqué en forme double brin. Seul l'ADN simple brin est intégré dans l'enveloppe protéique. Les particules phagiques (simple brin) sont secrétées des bactéries (pas de lyse). La centrifugation d'une culture d'*E.coli* infectées permet de récupérer les phages (ADN simple brin) dans le surnageant.

L'insert à séquencer est introduit dans le site de clonage de l'ADN double brin du phage M13. La transformation des bactéries permettra l'obtention d'ADN recombinant simple brin qui sera séquencé. L'insertion de l'ADN recombinant peut être orienté selon le vecteur utilisé (Fig 15).

1.2 Préparation de cellules *E.coli* TG1 compétentes: La souche TG1 est cultivée dans 40 ml de 2XTY Jusqu'à une DO de 0,3. Le culot bactérien est resuspendu dans 20 ml de CaCl₂ 50 mM. Après 20 minutes sur la glace, les bactéries sont reprises par 4 ml de CaCl₂, au moins une heure sur la glace. Elles sont ainsi prêtes pour la transformation.

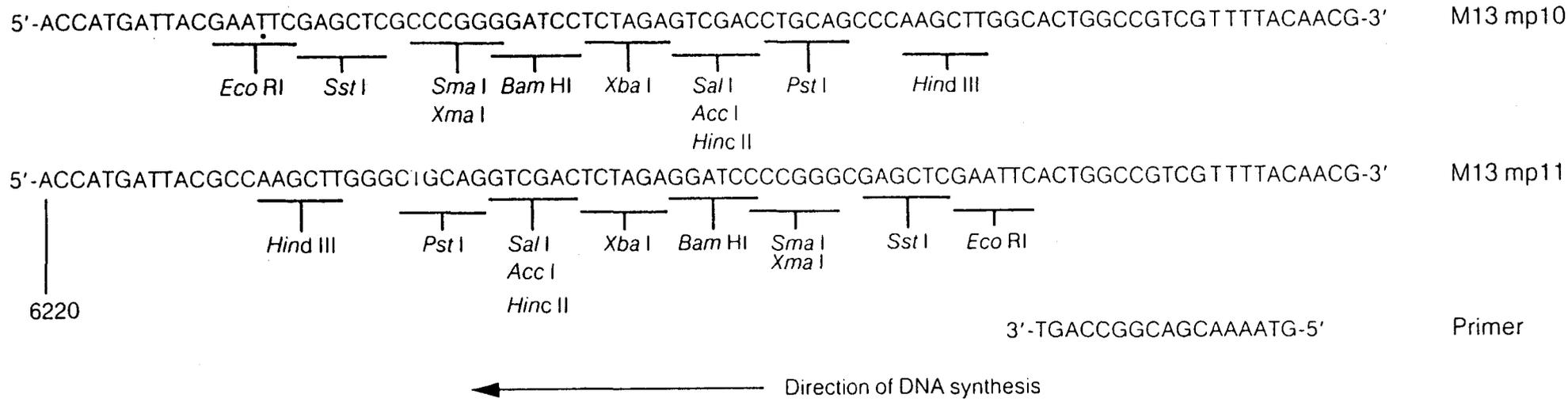


Figure 15: Sites de clonage de M13 mp10 et mp11.

1.3 Sous clonage de l'insert dans l'ADN M13 double brin: la forme répliquative des phages M13 mp 10 et 11 sont linéarisés en présence des enzymes de restriction. 100ng de vecteur phagique sont mis en présence de 20 ng d'insert (taille de 600 à 1100 pb) dans le tampon de ligation (Voir III 1.3). 1 U d'ADN ligase du bactériophage T4 est ajoutée pour un volume final de 10 μ l. La ligation est effectuée 16 heures à 14°C. 5 μ l de la réaction de ligation sont incubés avec 300 μ l de bactéries JM 107 compétentes au moins 40 minutes sur la glace. Un choc thermique est alors effectué à 42°C 3 minutes, puis les tubes de réaction sont mis à nouveau sur la glace. 200 μ l de bactéries en phase exponentielle et 3ml d'agar molle H contenant de l'IPTG 100 mM et du X-Gal 2% sont ajoutés. Ensuite les boîtes d'agar H sont étalées. Après une nuit à 37°C des colonies bleues et blanches (recombinantes) apparaissent.

1.4 Préparation de matrice M13: Chaque colonie blanche est prélevée à l'aide d'un cure-dent et est mise en culture dans 2 ml de TG1 diluée au 1/100 dans du 2XTY. On laisse pousser 6 heures à 37°C. Le surnageant phagique est récupéré après plusieurs centrifugations, puis stocké à 4°C. Ce surnageant sera amplifié afin de préparer de l'ADN simple brin. Pour cela on utilise *E.coli* TG1 en confluence sur une boîte M9. Le tapis bactérien est repris dans 5ml de 2XTY une 1/2 heure à 37°C puis complété à 100ml pendant une heure. A 10 ml de ce milieu, sont ajoutés 200 μ l de surnageant phagique. Après 5 heures à 37°C les phages sont récupérés par centrifugation. 2ml de solution PEG 20%, NaCl 2,5 M sont additionnés. La précipitation a lieu sur la glace pendant au moins 30 minutes. Les phages sont centrifugés 10 minutes à 16000g. Pour éviter toute trace de PEG, le culot est rincé très rapidement en TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM). Les phages sont repris dans 500 μ l de TE. Une extraction phénol et plusieurs extractions phénol/chloroforme sont réalisées jusqu'à ce que l'interface phase organique/phase aqueuse soit "propre". L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol une nuit à -20°C (ou 20 minutes à -70°C). Après centrifugation, le culot est lavé deux fois à l'éthanol 75% et une fois à l'éthanol 95%. Le culot d'ADN simple brin est séché puis repris dans 40 μ l de TE. Cette méthode permet l'obtention de 20 à 40 μ g d'ADN.

2. Cyclone (Fig 16).

Les méthodes actuelles permettent de séquencer de 300 à 500 pb par matrice d'ADN M13. Pour les grands fragments d'environ 1000 pb et plus, le système Cyclone I (IBI, USA) a été utilisé. Cette méthode a été décrite par Dale et al. (1985). A partir des clones M13 mp10 et mp11, une série de clones se chevauchant a été produite. Les étapes de cette technique sont visualisées dans la Figure 16.

1) La première étape nécessite l'hybridation d'un oligomère avec l'ADN simple brin de M13. Un oligomère différent (18mer, 22mer) est utilisé selon le vecteur.

2) L'hybride est alors digéré par l'enzyme de restriction approprié (EcoRI ou HindIII). La région d'ADN double brin est digérée.

3) Les molécules linéarisées sont digérées par l'ADN polymérase du phage T4. 1 U d'ADN polymérase peut dégrader 1 µg d'ADN simple brin à raison de 40-60 bases par minutes. Des aliquots de la réaction sont prélevés à différents temps.

4) Reconstitution des sites de restriction EcoRI et HindIII.

5) Les phages M13 comprenant les fragments de différentes tailles sont utilisées pour infecter *E.coli*. Les clones recombinants sont sélectionnés selon la taille de leur insert.

3. Réactions de séquence (Fig17).

3.1 Composition des différentes solutions: Tampon de réaction 5X: Tris-HCl 50 mM pH 7,5; MgCl₂ 50 mM; NaCl 500 mM.

Amorces : Elles sont fournies sous forme lyophilisée et dissoutes dans du TE afin d'atteindre une concentration de 0,4 pmol/µl. Ces amorces fluorescentes décrites par Smith L.H. *et al.* (1986) doivent être conservées à l'abri de la lumière.

Fluorophore de la réaction A (JOE): Fluorescéine.

Fluorophore de la réaction C (FAM): 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1-diazole (NDB).

Fluorophore de la réaction G (TAMRA): tetramethylrhodamine.

Fluorophore de la réaction T (ROX): Rouge Texas.

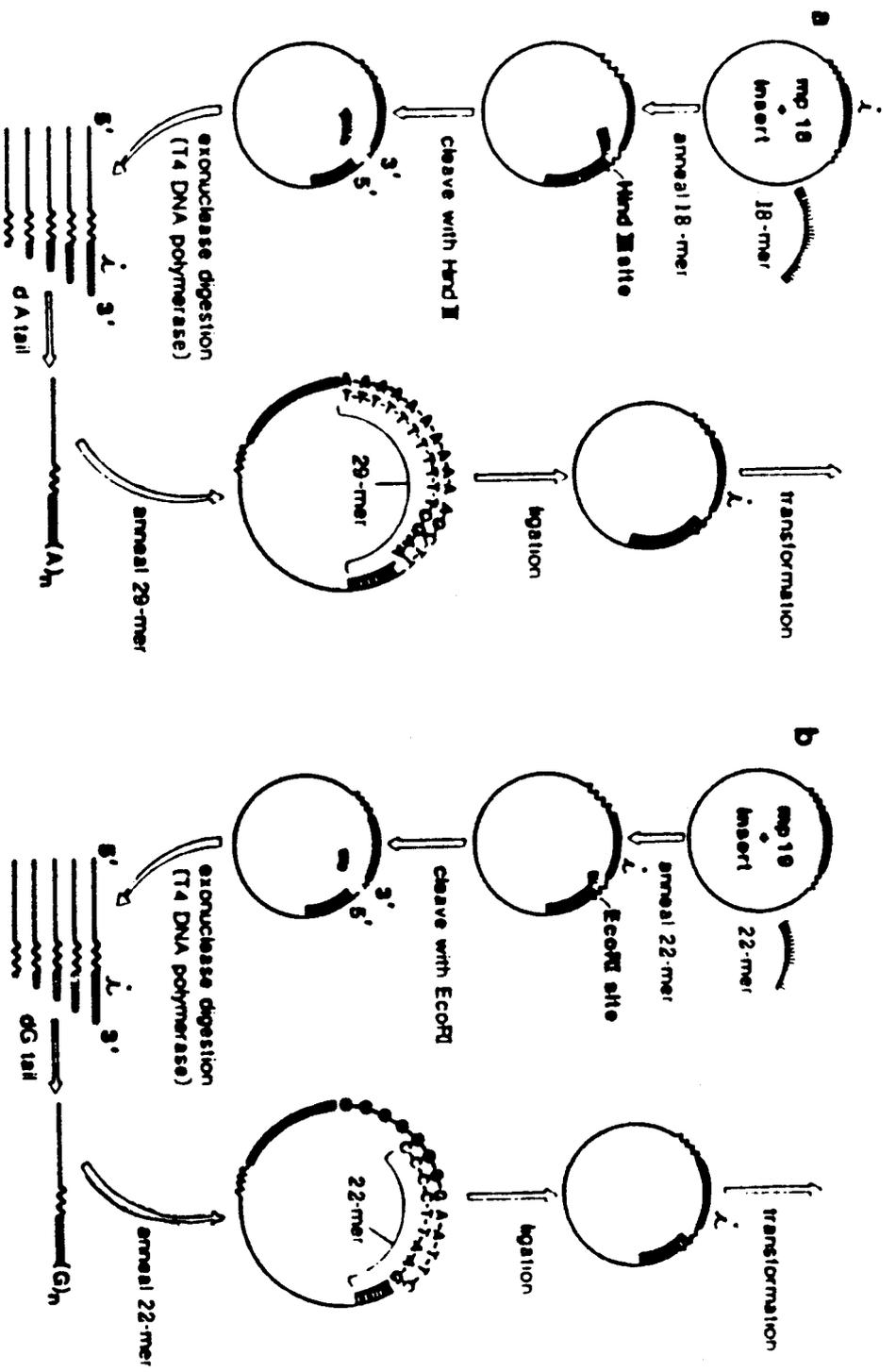


Figure 16: Technique du "Cyclone". Procédure pour M13 mp10 et 18 (a) et

M13 mp11 et 19 (b). insert.

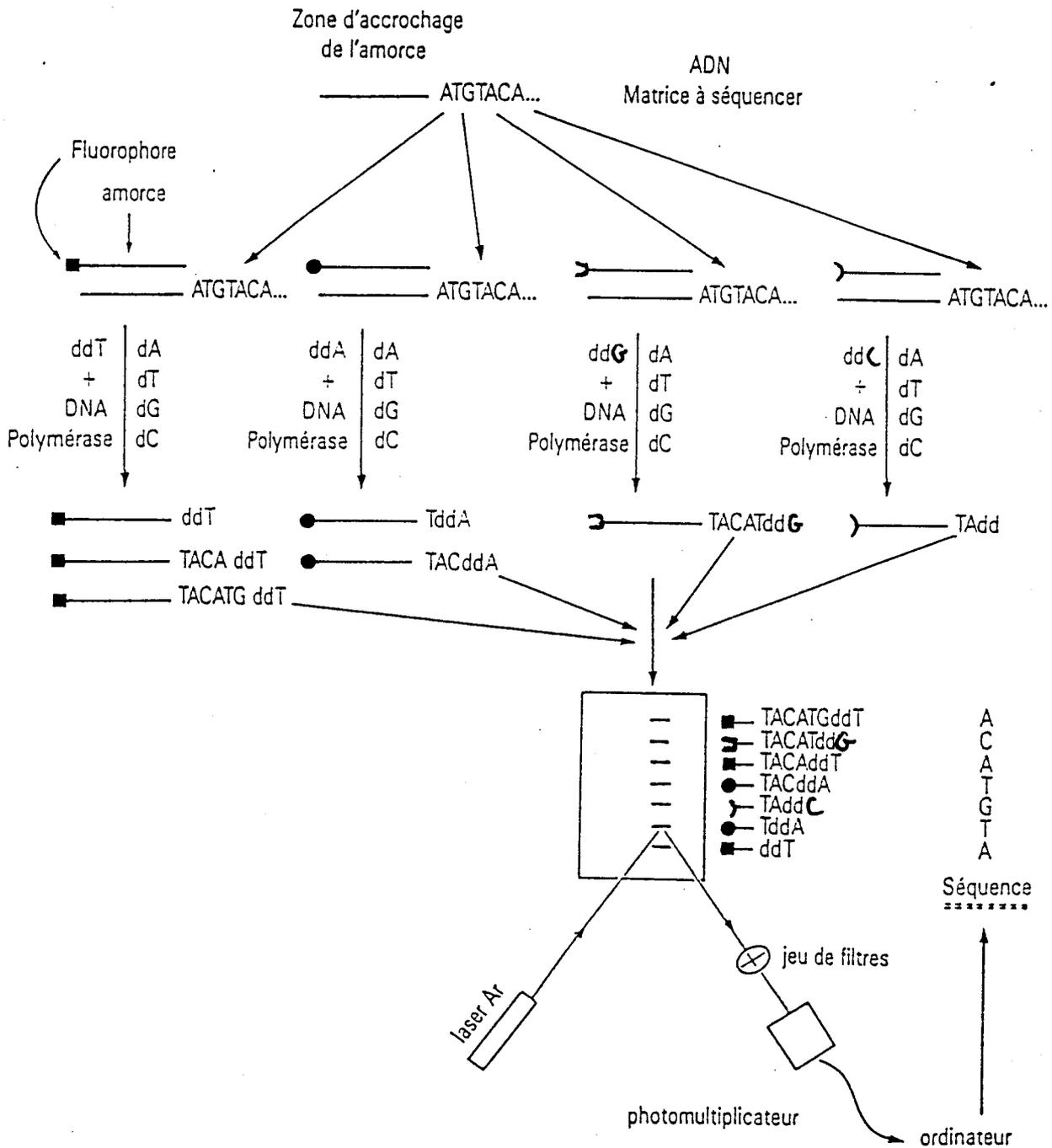


Figure 17: Méthode de séquençage nucléotidique utilisant des didéoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977) et des amorces fluorophores (Smith *et al.*, 1986).
Lecture automatique du gel de séquence. D'après le technoscope de Biofutur (Octobre 1986).

Solutions de déoxynucléotides: Le Déoxy-7-déazaguanosine triphosphate (d-c7GTP) est substitué au dGTP pour minimiser les effets de compression de bandes.

dATP : 2 mM, dCTP : 2 mM, d-c⁷GTP : 3 mM, dTTP : 2 mM.

Solutions de didéoxynucléotides ddATP,ddCTP,ddGTP,ddTTP: 50 mM

Solutions déoxynucléotides et didéoxynucléotides: Mélange dNTP/ddX:
1v/1v

Solution Y(Tampon de séquenase): Par clone: Séquenase 12,5 U; 4,5 μ l de DTT 0,1 M; 3,5 μ l de Tris 10 mM pH 8.

Séquenase: ADN polymérase du phage T7 modifiée chimiquement comme l'ont décrit Tabor et Richardson (1987).

3.2 Réaction d'hybridation : Pour chaque clone, 2 μ g d'ADN simple brin, 8 μ l de tampon 5X sont complétés à 24 μ l avec de l'eau bidistillée. Pour chaque clone 4 réactions sont effectuées. A chaque tube on ajoute:

Réaction A: 3 μ l de Sol. ADN et 2 μ l d'amorce JOE.

Réaction C: 3 μ l de Sol. ADN et 2 μ l d'amorce FAM.

Réaction G: 9 μ l de Sol. ADN et 2 μ l d'amorce TAMRA.

Réaction T: 9 μ l de Sol. ADN et 6 μ l d'amorce ROX.

Les 4 réactions sont incubées 5 minutes à 55°C à l'abri de la lumière, puis laissées 30 minutes à température ambiante.

3.3 Réactions d'élongation : A chaque réaction, les mélanges déoxynucléotides/didéoxynucléotides et la solution de sequenase (Sol.Y) sont ajoutés selon la méthode de Sanger *et al.*(1977):

Réaction A: 1,5 μ l dNTP/ddATP et 1 μ l de Sol.Y.

Réaction C: 1,5 μ l dNTP/ddCTP et 1 μ l de Sol.Y.

Réaction G: 4,5 μ l dNTP/ddGTP et 3 μ l de Sol.Y.

Réaction T: 4,5 μ l dNTP/ddTTP et 3 μ l de Sol.Y.

La réaction d'élongation a lieu 7 minutes à 37°C. la réaction est ensuite inhibée 10 minutes à 65°C. Les 4 réactions de chaque clones sont alors mélangées. Après une précipitation à l'éthanol, les culots sont lavés à l'éthanol 75% puis 95% et séchés. Les échantillons sont ainsi

conservés à l'abri de la lumière. Chaque échantillon est reprit dans 5 μ l de formamide déionisée et 1 μ l d'EDTA 50 mM, puis dénaturé à 90°C pendant 2 minutes avant d'être refroidi sur la glace. Le dépôt sur le gel de séquence est immédiat.

3.4 Gel de séquence: La séparation est réalisée sur gel d'acrylamide 6%: 30g d'urée, 9 ml d'acrylamide 40% (38g d'acrylamide et 2g de bisacrylamide, qsp 100 ml d'eau bidistillée) et 6 ml de TBEX10. De l'eau bidistillée est ajoutée jusqu'à 67,25g. Avant de couler le gel, celui-ci est filtré puis 300 μ l de persulfate 10% et 30 μ l de TEMED sont ajoutés. Une pré-migration d'une demi heure est nécessaire. Les conditions de migration sont les suivantes: 29W (constant), 1400 Volt et 22 mAmp pour une température de 50°C.

4. Analyse du gel de séquence.

L'analyse de séquençage automatique a été décrite par Smith L.H. *et al.* (1986). Le séquenceur 370 A (Applied Biosystem, USA) a été utilisé. Les 4 amorces sont détectées par fluorescence, stimulée par un laser. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse selon leurs tailles. Au niveau du laser, les amorces sont excités et fluorescent. Lors de chacun des balayages du gel par le laser, 64 signaux (16 dépôts et 4 fluorophores) sont digitalisés et transmis au disque dur du système d'analyse des données (Fig17).

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON, C.L. and Spiegelberg, H.L. (1981) Macrophage receptors for IgE: binding of IgE to specific IgE Fc receptors on a human macrophage cell line U 937. *J. Immunol.* 126, 2470-2473.

ANDERSON, R.M. and Medley, G.F. (1985) Community control of helminth infections of man by mass and selective chemotherapy. *Parasitol.* 90, 629-660.

AURIAULT, C., Damonville, 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. *Eur. J. Immunol.* 14, 132-138.

AURIAULT, C., Damonville, M., Joseph, M., Capron, M., Verwaerde, C., Billaut, P. and Capron A. (1985a) Defined antigens secreted by the larvae of schistosomes protect against schistosomiasis: Induction of cytotoxic antibodies in the rat and the monkey. *Eur. J. Immunol.* 15, 1168-1172.

AURIAULT, C., Joseph, M., Tartar, A., Bout, D., Tonnel, A.B. and Capron, A. (1985b) Regulatory role of a tripeptide (TKP) from the second constant domain of Immunoglobulin G. I. Inhibition of rat and human macrophage activities. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 73-79.

AURIAULT, C., Ouassi, M.A., Torpier, G., Heisen, H. and Capron, A. (1981) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* 3, 33-44.

BALLOUL, J.M., Boulanger, D., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.P., Carvalho, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1987a) Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S.mansoni* expressed in E.Coli in Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites. Austin J. McInnis eds. pp 77-84 Alan R. Liss, Inc. New York.

BALLOUL, J.M., Grzych, J.M., Pierce, R.J. and Capron, A. (1987b) A purified 28,000 Dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protect rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138, 3448-3453.

BALLOUL, J.M., Pierce, R.J., Grzych, J.M. and Capron, A. (1985) In vitro synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasit.* 17, 105-114.

BALLOUL, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron M., Grzych J.M., Pierce, R.J., Carvalho, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1987c) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 326, 149-153.

BAZIN, H., Capron A., Capron, M., Joseph, M., Dessaint, J.P. and Pauwels, R. (1980) effect of neonatal injection of anti- antibodies on immunity to schistosomes (*S.mansoni*) in the rat. *J. Immunol.* 124, 2273-2277.

BOBEK, L.A., LoVerde, P.T. and Rekosh, D.M. (1989) *Schistosoma haematobium*: Analysis of egg-shell protein genes and their expression. *Exp. Parasitol.* 68, 17-30.

BOUT, D., Joseph, M., David, J.R. and Capron, A. (1981) In vitro killing of *S.mansoni* schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages. *J. Immunol.* 127, 1-5.

BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248

BUTTERWORTH, A.E. (1988) Control of Schistosomiasis in man in *The Biology of Parasitism*. pp 43-59 Alan R. Liss Inc.

- BUTTERWORTH, A.E., Capron, M. and Cordingley, J.S.** (1985) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.* 79, 393-408.
- BUTTERWORTH A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., Mahmoud, A.A.F., Sher, A. and Rees, P.H.** (1975) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256, 727-729.
- CAPRON, A., Biguet, J., Rose, F. et Vernes, A.** (1965) Les antigènes de *S.mansoni* II. Etude immuno-électrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relation hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de *S.mansoni*. *Ann. Inst. Pasteur* 109, 798-810..
- CAPRON, A. and Dessaint, J.P.** (1985) Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Ann. Rev. Immunol.* 3, 455-476.
- CAPRON, A., Dessaint, J.P., Capron, M. and Bazin, H.** (1975) Specific IgE antibodies on immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature* 253, 474-475.
- CAPRON, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M., Ameisen, J.C. and Tonnel A.B.** (1986) From parasites to allergy: a second receptor for IgE. *Immunol. Today.* 7, 15-18.
- CAPRON, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M. and Torpier, G.** (1982) Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunol. Rev.* 61, 41-66.
- CAPRON, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Ouma, J.H. and Butterworth, A.E.** (1987) Immunity to schistosomes: Progress toward vaccine. *Science* 238, 1065-1072.
- CAPRON, M., Bazin, H., Torpier, G., Joseph, M. and Capron, A.** (1981a) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophil. *J. Immunol.* 126, 1764-1768.
- CAPRON, M., Capron, A.** (1986) Rats, mice and men: models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today* 2, 69-75.
- CAPRON, M., Capron, A., Goetzel, E.J. and Austen, K.F.** (1981b) Tetrapeptides of eosinophil chemotactic factor anaphylaxis (ECF-A) enhance eosinophil Fc receptor. *Nature* 289, 71-73.
- CAPRON, M., Noguera-Queiroz, J.A., Papin, J.P. and Capron, A.** (1984a) Interaction between eosinophils and antibodies : in vivo role against rat schistosomes. *Cell. Immunol.* 3, 60-72.
- CAPRON, M., Spiegelberg, H.L., Prin, L., Bennich, H., Butterworth, A.E., Pierce, R.J., Ouassi, M.A. and Capron, A.** (1984b) Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132, 462-468.
- CASTELLANI, L. and Cohen, C.** (1987) Myosin rod phosphorylation and the catch state of molluscan muscles. *Science* 235, 334-337.
- CHIRGWIN, J.M., Przybla, A.E., Mac Donald, R.J. and Rutter, W.J.** (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- CIOLI, D., Malomi, W., DeMartino, C. and Dennert, G.** (1980) A study of *Schistosoma mansoni* reinfection in thymectomized rats. *Cell. Immunol.* 53, 246-256.
- CLEGG, J.A. and Smithers, S.R.** (1972) The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. *Int. J. Parasitol.* 2, 79-98.

COHEN, C. (1982) Matching molecules in the catch mechanism. Proc; Natl. Acad. Sci. USA. 79, 3176-3178.

COHEN, C. and Holmes, K.C. (1963) X-Ray diffraction evidence for alpha-helical coiled-coils in native muscle. J. Mol. Biol. 6, 423-432

COHEN, C., Lanar, D.E. and Parry, D.A.D. (1987) Amino acid sequence and structural repeats in Schistosome Paramyosin match those of myosin. Bioscience Reports 7, 11-16.

COLLINS, W.E., Anders, R.F., Pappaioanou, M., Campbell, G.H., Brown, G.V., Kemp, D.J., Coppel, R.L., Skinner, J.C., Andrysiak, P.M., Favaloro, J.M., Corcoran, L.M., Broderson, J.R., Mitchell, G.F. and Campbell, C.C. (1986) Immunisation of Aotus monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. Nature 323, 259-262.

CORREA-OLIVEIRA, R., James, S.L., McCall, D. and Sher, A. (1986) Identification of genetic locus rsm-1, controlling protective immunity against *Schistosoma mansoni*. J. Immunol. 137, 2014-2019.

CORREA-OLIVEIRA, R., Pearce, E.J., Oliveira, G.C., Golgher, D.B., Katz, N., Bahia, L.G., Carvalho, O.S., Gazzinelli, G. and Sher, A. (1989) The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. (sous presse).

CRAIG, S.P., III, McKerrow, J.H., Newport, G.R. and Wang, C.C. (1988) Analysis of cDNA encoding the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRTase) of *Schistosoma mansoni*, a putative target for chemotherapy. Nucleic Acids Research 16, 7087-7101.

DALE, R.M.K., McClure, B.A. and Houchins, J.P. (1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA sequencing: application to sequencing the corn mitochondrial 18 S rDNA. Plasmid 13, 31-40.

DALTON, J.P., Tom, T.D. and Strand, M. (1987) Cloning of a cDNA encoding a surface antigen of *Schistosoma mansoni* recognized by sera of vaccinated mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 4268-4272.

DAVIS, A.H., Nanduri, J. and Watson, D.C. (1987) cloning and gene expression of *Schistosoma mansoni* protease. J. Biol. Chem. 262, 1-5.

DAMIAN, R.T. (1964) Molecular mimicry : Antigen sharing by parasite and host and its consequence. Ann. Nat. 98, 129-149.

DAMONNEVILLE, M., Auriault, C., Verwaerde, C., Delanoye, A., Pierce, R.J. and Capron, C. (1986) Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released products antigens (SRP-A): role of IgE antibodies. Clin. Exp. Immunol. 65, 244-252.

DAMONNEVILLE, M., Pierce, R.J., Verwaerde, C. and Capron, A. (1984) Allergens of *Schistosoma mansoni* II: Fractionation and characterization of S.mansoni egg allergens. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 73, 248-255.

DESSAINT, J.P., Camus, D., Fischer, E. and Capron, A. (1977) Inhibition of lymphocyte proliferation by factors produced by *Schistosoma mansoni*. Eur. J. Immunol. 7, 624-629.

- DESSAINT, J.P., Capron, M., Bout, D. and Capron, A. (1975) Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosome antigens and serum IgE levels in patients with schistosomiasis (*S.mansoni* or *S.haematobium*). Clin. Exp. Immunol. 20, 427-436.
- DESSAINT, J.P., Torpier, G., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. (1979) Cytophilic binding of IgE to macrophages. I Binding characteristics of IgE on the surface of macrophages in the rat. Cell. Immunol. 46, 12-23.
- DIANO, M., Le Bivic, A. and Hirn, M. (1987) A method for the production of highly specific polyclonal antibodies. Anal. Biochem. 166, 224-229.
- DIAS, L.C.S., Pedro, R.J. and Deberaldini, E.R. (1982) Use of praziquantel in patients with Schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and/or hycanthone: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76, 652-659.
- DISSOUS, C. and Capron, A. (1983) *Schistosoma mansoni* : antigenic community between schistosomulum surface and adult worm incubation products as a support for concomitant immunity. FEBS Lett. 162, 355-359.
- DISSOUS, C. and Capron, A. (1989) *Schistosoma mansoni* and its intermediate host *Biomphalaria glabrata* express a common 39 kDa acidic protein. Mol. Biochem. Parasitol. 32, 49-56.
- DISSOUS, C., Dissous, C. and Capron, A. (1981) Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. Mol. Biochem. Parasitol. 3, 215-226.
- DISSOUS, C., Grzych, J.M., and Capron, A. (1982) *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat protective monoclonal IgG2a. J. Immunol. 129, 2232-2234
- DISSOUS, C., Grzych, J.M. and Capron, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. Nature 323, 443-445.
- ELZINGA, M. and Collins, J.H. (1977) Amino acid sequence of a myosin fragment that contains SH-1, SH-2, and N-methylhistidine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 4281-4284.
- FEINBERG, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132, 6-13.
- FENWICK, A. (1987) Experience in mollusciciding to control schistosomiasis. Parasitol. Today 3,70-74.
- FLANIGAN, T.P., King, C.H., Lett, R.R., Nanduri, J. and Mahmoud, A.A.F. (1989) Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. J. Clin. Invest. 83, 1010-1014.
- FORD, M.J., Bickle, Q.D., Taylor, M.G. and Andrews, B.J. (1984) Passive transfert of resistance and the site of immune dependant elimination of the challenge infection in rats vaccinated with highly irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. Parasitol. 89, 461-482.
- FORD, M.J., Dissous, C., Pierce, R.J., Taylor, M.G., Bickle, Q.D. and Capron, A. (1987) The isotypes of antibody responsible for the "late" passive transfer of immunity in rats vaccinated with highly irradiated cercariae. Parasitol. 94, 509-522.
- GRANDEA III, A.G., Tuyen, L.K., Asikin, N., Davis, T.B., Philipp, M., Cohen, C. and McReynolds, L.A. (1989) A lambda gt11 cDNA recombinant that encodes *Dirofilaria immitis* paramyosin. Mol. Biochem. Parasitol. 35, 31-42.

- GREENWOOD, F.C., Hunter, W. and Bolver, J.S.** (1963) The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114-123.
- GRZYCH, J.M., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A.** (1982) In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S.mansoni* antibodies. *J. Immunol.* 129, 2739-2743.
- GRZYCH, J.M., Capron, M., Dissous, C. and Capron, A.** (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133, 998-1004.
- GRZYCH, J.M., Capron, M., Lambert, P.H., Dissous, C., Torres, S. and Capron, A.** (1985) An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* 316, 74-75.
- GRZYCH, J.M., Dissous, C., Capron, M., Torres, S., Lambert, P.H. and Capron, A.** (1987) *Schistosoma mansoni* shares with Keyhole Limpet Hemocyanin a protective carbohydrate epitope. *J. Exp. Med.* 165, 865-878.
- HANAHAHAN, D.** (1983) Studies on transformation of *E.coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- HAVERCROFT, J.C., Huggins, M.C., Nene, V., Dunne, D.W., Richardson, B.A., Taylor, D.W. and Butterworth, A.E.** (1988) Cloning of the gene encoding a 50 kDa potential surface antigen of *S.mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 83-89.
- HEDSTROM, R., Culpepper, J., Harrison, R.A., Agabian, N. and Newport, G.** (1987) A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein Hsp70. *J. Exp. Med.* 165, 1430-1435.
- JAMES, S.L.** (1986) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non living vaccine. III. Correlation of resistance with induction of activated larvacidal macrophages. *J. Immunol.* 136, 3872-3877.
- JAMES, S.L., Correa-Oliveira, R. and Leonard E.J.** (1984) Defective vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in P strain mice II. Analysis of cellular responses. *J. Immunol.* 133, 1587-1593.
- JAMES, S.L. and Sher, A.** (1983) Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae III. Identification of a mouse strain P/N that fails to respond to vaccination. *Parasite Immunol.* 5, 567-577.
- JARETT, E. and Bazin, H.** (1974) Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature* 251, 613-615.
- JOSEPH, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H. and Viens, P.** (1983) A role for platelets in IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 303, 810-811.
- JOSEPH, M., Capron, A., Butterworth, E.A., Sturrock, R.F. and Houba, V.** (1978) Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula in vitro: induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 33, 45-56.
- JOUAULT, T., Capron, M., Balloul, J.M., Ameisen, J.C. and Capron, A.** (1988) Quantitative and qualitative analysis of the Fc receptor for IgE (Fc RII) on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 18, 237-241.
- KAGAN, I.G.** (1958) The immunology and serology of schistosomiasis. The Rice institute Pamphlet. 45, 151-183.

- KAGAWA, H., Gengyo, K., McLachlan, A.D., Brenner, S. and Karn, J.** (1989) Paramyosin gene (unc-15) of *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament structure. *J. Mol. Biol.* 207, 311-333.
- KHALIFE, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J.M., Butterworth, A.E., Dunne, D.W. and Ouma, J.H.** (1986) Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 164, 1626-1640.
- KHALIFE, J., Dunne, D.W., Richardson, B.A., Mazza, G., Thorne, K.J.I., Capron, A. and Butterworth.** (1989) Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*.
- KLINKERT, M.Q., Felleisen, R., Link, G., Ruppel, A. and Beck, E.** (1989) Primary structures of Sm 31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 113-122.
- KOSTER, B., Dargatz, H., Schroder, J., Hinzmann, J., Haarmann, C., Symmons, P. and Kunz, W.** (1988) Identification of the products of a putative egg-shell precursor gene in the vitellarium of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31, 183-198.
- LAEMMLI, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LANAR, D.E., Pearce, E.J., James, S.L. and Sher, A.** (1986) Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* 234, 593-596.
- LANGLET, C., Mazingue, C., Dessaint, J.P. and Capron, A.** (1984) Inhibition of primary and secondary IgE response by a schistosome-derived inhibitory factor. *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.* 73, 225-230.
- MAC FARLANE, W.V.** (1949) Schistosome dermatitis in New Zealand Part. II Pathology and immunology of cercarial lesions. *Am. J. Hyg.* 50, 152.
- MAC LACHLAN, A.D. and Karn, J.** (1982) Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature* 299, 226-231.
- MAC LACHLAN, A.D. and Stewart, M.** (1975) Tropomyosin coiled-coil interactions : Evidence for an unstaggered structure. *J. Mol. Biol.* 98, 293-304.
- MAHMOUD, A.A.F., Peters, P.A., Civil, R.H. and Remington, J.S.** (1979) In vitro killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by BCG and *C.parvum* activated macrophages. *J. Immunol.* 122, 1655-1661.
- MASTERSON, C., Tom, T., Dalton, J.P. and Strand, M.** (soumis).
- MASTIN, A.J., Bickle, Q.D. and Wilson, R.A.** (1983) *Schistosoma mansoni*: migration and attrition of irradiated and challenge schistosomula in the mouse. *Parasitol.* 87, 87-102.
- MANGOLD, B.L. and Dean, D.A.** (1984) The migration and survival of gamma-irradiated *Schistosoma mansoni* larvae and the duration of host-parasite contact in relation to the induction of resistance in mice. *Parasitol.* 88, 249-266.
- MATSUMOTO, Y., Perry, G., Levine, R.J.C., Blanton, R., Mahmoud, A.A.F. and Aikawa, M.** (1988) Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature* 333, 76-78.

- MAZINGUE, C., Camus, D., Dessaint, J.P., Capron, M. and Capron, A. (1980) In vitro and in vivo inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Schistosoma mansoni*. Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 63, 178-189.
- MAZINGUE, C., Stadler, B.M., Quatannens, B., Capron, A. and de Weck, A. (1986) Schistosome-derived inhibitory factor: An immunosuppressive agent preferentially active on T lymphocytes. Int. Archs. Allergy appl. Immuno. 80, 347-354.
- METZGER, H. (1983) The receptor on mast cells and related cells with high affinity for IgE. Contemp. Top. Mol. Immunol. 9, 115.
- MESSING, J. and Viera, J. (1983) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digested fragments. Gene 19, 269-276.
- MITCHELL, G.F. (1989) Glutathione S-transferases. Potential components of anti-schistosome vaccines? Parasitol. Today 5, 34-37.
- NATHAN, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E. and Rubin, B.Y. (1983) Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and anti-microbial activity. J. Exp. Med. 158, 670-678.
- NENE, V., dunne, D.W., Johnson, K.S., Taylor, D.W. and Cordingley, J.S. (1986) Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*: Homologies to heat-shock proteins and alpha-crystallins. Molec. Biochem. Parasitol. 21, 179-188.
- NEWPORT, G., Harrison, R.A., McKerrow, J., Tarr, P., Kallestad, J. and Agabian, N. (1987) Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* myosin. Mol. Biochem. Parasitol. 26, 29-38.
- NEWPORT, G., McKerrow, J., Hedstrom, R., Petilt, M., McGarrigle, L., Barr, P.J. and Agabian, N. (1988) Cloning of protease that facilitates infection by schistosome parasites. J. Biol. Chem. 263, 13179-13184.
- OLGIVIE, M.B. (1964) Reagin-like antibodies in animal immune to helminth parasites. Nature 204, 91-92.
- OUASSI, M.A., Santoro, F. and Capron, A. (1980) Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system. Receptors for C3b on cercariae and schistosomula. Immunol. Lett. 1, 197-210.
- PARRY, D.A.D. (1981) Structure of rabbit skeletal myosin. J. Mol. Biol. 153, 459-464.
- PEARCE, E.J. and James, S.L. (1986) Post lung stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* exhibit transient susceptibility to macrophage-mediated cytotoxicity in vitro that may relate to late phase killing in vivo. Parasite Immunol. 8, 513-527.
- PEARCE, E.J., James, S.L., Dalton, J., Barral, A., Ramos, C., Strand, M. and Sher, A. (1986) Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non living vaccine. J. Immunol. 137, 3593-3600.
- PEARCE, E.J., James, S.L., Hieny, S., Lanar, D.E. and Sher, A. (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm-97), a non surface parasite antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5678-5682.
- PELHAM, R.B. and Jackson, J. (1976) An efficient mRNA dependent translation system from rabbit reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem. 67, 247-256.

- PESTEL, J., Joseph, M., Dessaint, J.P. and Capron, A. (1988)** Variation in the expression of macrophage FC receptors in relation to experimental rat schistosome infection. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 85, 55-62.
- PHILLIPS, S.M., Bentley, A.G., Linett, G., Doughty, B.L. and Capron, M. (1983)** The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. *J. Immunol.* 131, 1466-1474.
- PHILLIPS, S.M. and Colley, D.G. (1978)** Immunologic aspects of host responses to schistosomiasis: Resistance, immuno-pathology and eosinophil involvement. *Prog. Allergy.* 24, 49-182.
- PHILLIPS, S.M., Reid, W.A., Bruce, J.I., Hedlund, K., Calvin, R.C., Campbel, R., Diggs, C.L. and Sadun, E.H. (1975)** The cellular and humoral immune response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. I Mechanism during initial exposure. *Cell. Immunol.* 19, 99-116.
- PIERCE, R.J., Aimar, C., Balloul, J.M., Delarue, M., Grausz, D., Verwaerde, C. and Capron A. (1985)** Translation of *Schistosoma mansoni* antigens in *Xenopus* oocytes microinjected with mRNA from adult worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* 15, 171-188.
- PIERCE, R.J., Verwaerde, C., Damonville, M., Lepresle, T. and Capron, A. (1983)** Allergens of *Schistosoma mansoni*. I Comparison of the IgE response in human and experimental infections towards characterized allergens from adult worm products. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 72, 219-226.
- PIERCE, R.J., Trottein, F., Boutin, P., Facon, B., Balloul, J.M. and Capron, A. (1987)** Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* allergens in Molecular. Paradigms for eradicating Helminthic Parasite. Austin J. McInnis ed. pp 119-128, Alan R. Liss, Inc., New York.
- POLDERMAN, A.M. and Manshande, J.P. (1981)** Failure of targeted mass treatment to control schistosomiasis. *Lancet* i, 27-28.
- PUGH, R.N.N. and Teesdale, C.H. (1984)** Long-term efficacy of single-dose oral treatment in schistosomiasis haematobium. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 55-59.
- RAM, D., Grossman, Z., Markovics, A., Avivi, A., Ziv, E., Lantner, F., Schechter, I. (1989)** Rapid changes in the expression of a gene encoding a calcium-binding protein in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 167-176.
- RAMALHO-PINTO, F.J., Mac Laren, D.J. and Smithers, S.R. (1978)** Complement mediated killing of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils in vitro. *J. Exp. Med.* 147, 147-156.
- ROUSSEAUX-PREVOST, R., Bazin, H. and Capron, A. (1977)** IgE in experimental schistosomiasis. I. Serum IgE levels after infection by *Schistosoma mansoni*. in various strains of rats. *Immunology* 33, 501-506.
- ROUSSEAUX-PREVOST, R., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. (1978)** IgE in experimental schistosomiasis. II Quantitative determination of specific IgE antibodies against *Schistosoma mansoni* : a follow up study of two strains of infected rats. *Immunol.* 35, 33-39.
- SADUN, E.H. and Gore, R.W. (1970)** *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* : homocytotropic reagin-like antibodies in infections of man and experimental animals. *Exp. Parasitol.* 28, 435-449.
- SANGER, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5436-5467.

- SANTORO, F., Lachmann, P.J., Capron, A. and Capron, M. (1979) Activation of the complement by *Schistosoma mansoni* schistosomula : killing of parasites by the alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation. *J. Immunol.* 123, 1551-1557.
- SCHRIEFER, L. and Wasterton, R.H. (1989) Phosphorylation of the N-terminal region of *Caenorhabditis elegans* paramyosin. *J. Mol. Biol.* 207, 451-454.
- SHER, A., Hall, B.F. and Vadas, M.A. (1978) Acquisition of murine major histocompatible complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 148, 46-57.
- SHER, A., Hieny, S., James, S.L. and Asofsky, R. (1982) Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. II Analysis of immunity in hosts deficient in T lymphocytes, B lymphocytes or complement. *J. Immunol.* 128, 1880-1884.
- SHOU-PAI, M. and Bao-Ruo, S. (1982) Schistosomiasis control in the People's Republic of China. *Am.J. Trop. Med Hyg.* 31, 92-99.
- SIMPSON, A.J.G., Chaudri, M., Knight, M., Kelly, C., Rumjanick, F., Martin, S. and Smithers, S.R. (1987) Characterization of the structure and expression of the gene encoding a major female specific polypeptide of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem.Parasitol.* 22, 169-176.
- SIMURDA, M.C., Van Keulen, H., Rekosh, D.M. and LoVerde, P.T. (1988) *Schistosoma mansoni*: Identification and analysis of a mRNA and gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Exp. Parasitol.* 67, 73-84.
- SLEIGH, A.C., Hoff, R., Mott, K.E., Maguire, J.H. and Da Franca Silva, J.T. (1986) Manson's schistosomiasis in Brazil: 11-year evaluation of successful disease control with oxamniquine *Lancet* i: 635-637.
- SMITH, D.B., Davern, K.M., Board, P.G, Tiu, W.U., Garcia, E.G. and Mitchell, G.F.(1986) Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione-S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8703-8707.
- SMITH, L.H., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C. Kent, S.B.H. and Hood, L.E. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674-679.
- SMITH, M.A. and Clegg, J.A. (1985) Vaccination against *Schistosoma mansoni* with purified surface antigens. *Science* 227, 535-538.
- SMITHERS, S.R. and Terry, R.J. (1965) The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitol.* 55, 695-700.
- SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- STEIN, L.D. and David, J.R. (1986) Cloning of a developmentally regulated tegument antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 253-264.
- TABOR, S. and Richardson, C.C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771.

- TAYLOR, J.B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D.J., Roitsch, C., Balloul, J.M., Southan, C., Sondermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J.P., Capron, A. and Ketterer, B. (1988)** The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *Embo J.* 7, 465-472.
- THOMAS, P.S. (1980)** Hybridation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205.
- TORPIER, G., Capron, A. and Ouassi, M.A. (1979)** Receptor for IgG (Fc) and human β 2-microglobulin on *S.mansoni* schistosomula surface. *Nature* 278, 447-449.
- TOWBIN, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- TROTTEIN, F., Kieny, M.P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Schmitt, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1987)** Molecular cloning and tissue distribution of a 26 kDa *Schistosoma mansoni* glutathione-S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* (soumis).
- TSANG, V.C.W., Peralta, J.M. and Simons, A.R. (1983)** Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* Vol. 92. In J.J.Langone, H. Van Vunakis Eds p 377-391. Academic Press, New-York and London.
- VON LICHTENBERG, F., Sher, A. and Mac Intyre, S. (1977)** A lung model of schistosome immunity in mice. *Am. J. Pathol.* 87, 105-109.
- VERWAERDE, C., Joseph, M., Capron, M., Pierce, R.J., Damonville, M., Velge, F., Auriault, C. and Capron, A. (1987)** Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 138, 4441-4446.
- WILSON, R.A., Coulson, P.S. and Mc Hugh, S.M. (1983)** A significant part of the concomitant immunity of mice to *Schistosoma mansoni* is a consequence of a leaky hepatic portal system, not immune killing. *Parasite Immunol.* 5, 595-601.
- WOLOWCZUK, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Vendeville, C., Balloul, J.M., Tartar, A. and Capron, A. (1989)** Protective immunity in mice vaccinated with the P28-1 antigen. *J. Immunol.* 142, 1342-1350.
- XU, H., Miller, S., Van Keulen, H., Wawrzynski, M.R., Rekosh, D.M. and LoVerde, P.T. (1989)** *Schistosoma mansoni* tropomyosin: cDNA characterization, Sequence, Expression, and gene product localization. *Exp. Parasitol.* 69, 373-392.
- YOUNG, R.A. and Davis, R.W. (1983)** Yeast RNA polymerase II genes : Isolation with antibody probes. *Science* 222, 778-782.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	P3
PUBLICATION	P5
RESUME	P6
ABBREVIATIONS	P7
GENERALITES	P8
I SCHISTOSOMIASE, BIOLOGIE, LES MOYENS DE LUTTE.	
1. Importance.	P9
2. Cycle biologique.	P9
3. Aspects cliniques de la bilharziose intestinale.	P11
3.1 Epiderme .	
3.2 Phase d'invasion.	
3.3 Conséquences de la ponte.	
4. Méthodes de controle.	P12
4.1 Education sanitaire.	P12
4.2 Controle des planorbes.	P12
4.3 Chimiothérapie.	P12
4.4 Vaccin.	P13
II IMMUNITE A SCHISTOSOMA MANSONI.	
1. Immunité naturelle.	P14
2. Immunité acquise.	P15
III MECANISMES EFFECTEURS.	
1. Mécanismes non spécifiques.	P16
2. Immunité à médiation cellulaire.	P16
3. Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps.	P18
3.1 Macrophages.	P18
3.2 Eosinophiles.	P19
3.3 Plaquettes.	P19
3.4 Relevance <i>in vivo</i> .	P19
3.5 Fc ϵ RII	P20
IV IMPORTANCE DE LA REPONSE IGE LORS DE LA SCHISTOSOMIASE.	
1. Rôle des IgE.	P20
2. Allergènes des stades oeufs et ver adulte.	
3. Produits secrétés-excrétés par le schistosomule.	P21
V MECANISMES D'EVASION.	
1. Acquisition d'antigènes d'hôte.	P22
2. Facteurs d'origine parasitaire.	P22
3. Anticorps bloquants.	P23

VI APPORT DU CLONAGE MOLECULAIRE A L'ETUDE DES ANTIGENES DE S.MANSONI	P23
VI ANTIGENES IMPLIQUES DANS LA PROTECTION VIS A VIS DES SCHISTOSOMES.	
1. GP38.	P25
2. Glutathion-S-transferase (GST).	P27
2.1 Sm28.	P27
2.2 Sj26.	P27
2.3 Rôle des GST	P27
3. Paramyosine	P28
4. Antigènes de 155 kDa et 53 kDa.	P28
VII OBJECTIFS DU TRAVAIL.	P29
RESULTATS	P30
I UTILISATION D'UNE BANQUE D'ADNc	P31
II ANALYSE DE LA PROTEINE DE FUSION	P31
III RECONNAISSANCE DE LA PROTEINE NATIVE PAR DES SERUMS DIRIGES CONTRE LE CLONE 3.2	P35
IV ANALYSE ET SEQUENCAGE DE L'INSERT DU CLONE 3.2	P38
V COMPARAISON DE LA SEQUENCE PROTEIQUE DU CLONE 3.2 AVEC UNE BANQUE DE DONNEES	P44
VI STRUCTURE REPETEE DE LA PARAMYOSINE	P49
CONCLUSION DISCUSSION	P60
MATERIEL ET METHODES	P66
I Matériel biologique.	
1. Parasites.	P67
1.1 Obtention de l'antigène de ver adulte.	P67 P67
1.2 Marquage métabolique.	
2. Serums.	P67
2.1 Origine, Obtention.	P67
2.2 Conjugués anticorps.	P68
2.3 Western blot.	P68
2.4 Immunoprécipitations.	P69
3. Production d'anticorps monoclonaux.	P69
3.1 Production d'ascites.	P69
3.2 Purification de l'anticorps monoclonal.	
4. Souches bactériennes et vecteurs de clonage.	
4.1 Milieux de culture.	P70
4.2 Souches bactériennes.	P70
4.3 Vecteurs de clonage.	P70

II CLONAGE MOLECULAIRE. CARACTERISATION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE.

- 1. Généralités. P71
- 2. Utilisation d'une banque d'ADNc. P71
- 3. Lysogènes. P71
 - 3.1 Obtention. P71
 - 3.2 Préparation d'antigène recombinant. P72

III ACIDES NUCLEIQUES, EXTRACTIONS, HYBRIDATION.

- 1. Amplification, Extraction de l'insert. P72
 - 1.1 Obtention de l'ADN phagique. P72
 - 1.2 Extraction de l'insert. P73
 - 1.3 Sous-clonage dans pUC 13. P73
 - 1.4 Amplification de l'insert. P74
 - 1.5 Marquage de l'insert au ³²P. P74
- 2. ARN. P74
 - 2.1 Extraction. P74
 - 2.2 Produits de traduction de l'ARNm des vers adultes. P74
 - 2.3 Northern blot. P75

IV SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE.

- 1. Phage M13. P76
 - 1.1 Généralités. P76
 - 1.2 Préparation de JM107 compétentes. P76
 - 1.3 Sous-clonage de l'insert dans l'ADN double brin du phage M13. P78
 - 1.4 Préparation de matrice M13. P78
- 2. Cyclone. P79
- 3. Réactions de séquence. P79
 - 3.1 Composition des différentes solutions.
 - 3.2 Réaction d'hybridation. P82
 - 3.3 Réaction d'élongation. P82
 - 3.4 Gel de séquence. P83
- 4. Analyse du gel de séquence. P83

BIBLIOGRAPHIE P85

TABLE DES MATIERES P95

