

50376
1992
238

61600

1

30376
1992
238

N° d'ordre : 966

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
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 Santé
par
Francois TROTTEIN

*

**Contribution à l'Etude Moléculaire des
Glutathion-S-transférases dans le Cadre
d'une Stratégie Vaccinale contre la Schistosomiase**



Présentée le 15 Septembre 1992 devant la commission d'examen :

Membres du Jury :

Président :

Professeur G. SPIK

Rapporteurs :

Docteur J. P. MORNON

Docteur R. J. PIERCE

Examineurs :

Professeur A. CAPRON

Professeur S. BALL

Docteur M. COURTNEY

... A la mémoire de ma mère

A mon épouse Laurence

A ma fille Perrine ...

A ma famille et belle-famille

A mes amis

Pour ce qu'ils représentent pour moi

et pour l'amour que je leur porte

Cette thèse est dédiée à la mémoire de Monsieur Jean Pierre LECOCQ

A Monsieur le Professeur CAPRON

Membre de l'Académie des Sciences

Membre de l'Académie de Médecine

Vous m'avez chaleureusement accueilli dans votre laboratoire et avez veillé avec une attention particulière au bon déroulement de mon travail. Vous m'avez permis de participer à un programme de recherche visant à développer un vaccin contre la schistosomiase qui j'espère de tout coeur verra le jour prochainement.

Que ce mémoire soit le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur G. SPIK

Vous avez accepté de présider le jury de la soutenance de ma thèse. Je vous en remercie vivement.

A Monsieur le Docteur J. P. MORNON

Pour votre passion communicative qui m'a permis d'aborder le domaine fascinant de la structure tridimensionnelle des biomolécules et pour la qualité de l'accueil que vous m'avez réservé au sein de votre unité, je vous remercie sincèrement.

A Monsieur le Docteur R. J. PIERCE.

Votre disponibilité et vos compétences scientifiques ont été précieuses dans l'élaboration de ce mémoire. Je vous en suis très reconnaissant.

A Monsieur le Docteur M. COURTNEY

Pour l'honneur que vous me faites de juger l'ensemble de ce travail, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur S. BALL

Pour avoir accepté de porter un jugement sur ce travail, je tiens à vous remercier chaleureusement.

Sans votre aide, ce mémoire n'aurait pu voir le jour, je tiens à y associer pleinement :

Les personnes du Laboratoire du CIBP de l'Institut Pasteur de Lille et du groupe SVH en particulier.

Merci d'avoir été présents quand il le fallait.

Et particulièrement les Docteurs C. Verwaerde, G. Renauld et J. Khalife, D. Williams , D. Boulanger et B. Lafyatis pour leur gentillesse et la qualité de leurs suggestions scientifiques ; J. Fontaine, C. Godin, H. Vorng et J. Trolet pour leur compétence technique et leur disponibilité.

Les personnes de la société Transgène à Strasbourg avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et particulièrement : Doris, Elisabeth, Martine, Bruno et Jean.

Les personnes du Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie à Paris et particulièrement Marie-Christine. Je te remercie amicalement pour l'aide précieuse que tu m'as apportée.

Les personnes du CERMES de Niamey pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont offert et les longues nuits passées aux abattoirs de Niamey...

Les personnes de la LSHTM à Londres pour leur précieuse collaboration.

Que le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur ainsi que l'Institut Pasteur de Lille soient remerciés pour le soutien financier qu'ils m'ont accordé pendant mes années de doctorat.

**Les résultats présentés dans ce mémoire
ont fait l'objet des publications suivantes**

- 1- **Trottein, F.**, Kieny, M. P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schmitt, D., Lecocq, J. P and Capron, A. (1990). Molecular cloning and tissue distribution of a 26 kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 41, 35-44.
- 2- **Trottein, F.**, Vaney, M. C., Bachet, B., Pierce, R. J., Colloc'h, N., Lecocq, J. P., Capron, A and Mornon, J. P. (1992). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a protective cloned 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. *Journal of Molecular Biology*. 224, 515-518.
- 3- **Trottein, F.**, Godin, C., Pierce, R. J., Sellin, B., Gorillot, I., Sampaio-Silva, M., Lecocq, J. P and Capron, A (1992). Inter-species variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferases. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 54, 63-72.
- 4- Xu, C., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., **Trottein, F.**, Wolowczuk, I., Tartar, A and Capron, A. (1992). Amino and carboxyl termini of *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase are involved in the enzymatic function concerning parasite fecundity and egg viability. *Journal of Immunology* (soumis).
- 5- Bushara, H. O., Bashir, M. E., El Malik, K. H., Mukhtar, M. M., **Trottein, F.**, Capron, A and Taylor, M. G. (1992). Fecundity-suppressing glutathione-S-transferase vaccine for bovine schistosomiasis. *Nature* (en préparation).

Brevets d'invention

- 1- **Trottein, F.**, Capron, A., Schmitt, D and Lecocq, J. P. (1990). Séquence d'ADN codant pour une glutathione-S-transférase de 26 kDa de *Schistosoma mansoni*. Institut National de la Propriété Industrielle. Numéro : 90. 01403 (07/02/1990).
 - **Trottein, F.**, Capron, A., Schmitt, D and Lecocq, J. P. (1991). Glutathione S-transferase Sm26 of *Schistosoma mansoni*. Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. Numéro de publication internationale : WO 91/12327 (date publication 22/8/91). Numéro de la demande internationale : PCT/FR91/00091 (06/02/1991).

2- **Trottein, F** and Capron, A. (1992). Fragments d'acides nucléiques codant pour des glutathion-S-transférases de *Schistosoma bovis* et *Schistosoma haematobium*, polypeptides codés par ces fragments, leur procédé de production et leurs utilisations. Institut National de la Propriété Industrielle. Numéro : 92. 02355 (28/02/1992).

Présentation lors de congrès internationaux

1- **Trottein, F.**, Kieny, M. P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schmitt, D., Lecocq, J. P and Capron, A. (1989). Molecular cloning and tissue distribution of a 26 kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training on Tropical Diseases- Rockefeller Foundation (TDR/RF) Scientific Meeting, ASTRA Research Centre, Bangalore, Inde, 4-8 Décembre 1989.

2- **Trottein, F.**, Kieny, M. P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schmitt, D., Lecocq, J. P and Capron, A. (1990). Molecular cloning, expression and tissue distribution of a 26 kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. VII Congrès International de Parasitologie (ICOPA VII), Paris, France. 20-24 Août 1990. Bulletin de la Société Française de Parasitologie. Abstract S5A69, tome 8, supplément 1, p 505.

3- **Trottein, F.**, Pierce, R. J., Taylor, M., Sellin, B and Capron, A. Interspecies variation of schistosome 28 kDa GST sequences. British Society for Parasitology, Spring Meeting 1991, University of Liverpool, Angleterre. 3-5 Avril 1991. Abstract n° P20, p 26.

4- Pierce, R. J., Auriault, C., Boulanger, D., Capron, M., Grezel, D., Grzych, J. M., **Trottein, F.**, Verwaerde, C., Williams, D., Wolowczuk, I., Xu, C and Capron, A. (1991). Vaccination strategies against schistosomes. Proceedings of the 17-th International Congress of Chemotherapy, Berlin, Allemagne, 23-28 Juin 1991 (sous presse).

5- **Trottein, F.**, Vaney, M. C., Bachet, B., Pierce, R. J., Colloc'h, N., Lecocq, J. P., Capron, A and Moron, J. P. (1992). Cristallisation et études cristallographiques préliminaires de la glutathion-S-transférase de *Schistosoma mansoni* Sm28GST. Journées annuelles de l'Association Française de Cristallographie. Paris, France. 5-7 mai 1992.

6- Capron, A., Pierce, R. J., **Trottein, F.**, Grezel, D and Xu, C. (1992). Protective role of the 28 kDa glutathione S-transferase. Abstract 92 Keystone Symposium on "Molecular and cellular biology of host-parasites interactions", Park-city, Utah, USA. 15-20 Janvier 1992. Journal of Cellular Biochemistry (1992). Abstract n° C013, supplt 16A, p 112.

Ce travail a été accompli :

Au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille

Directeur : Pr A. Capron

En étroite collaboration avec :

La Société Transgène S. A à Strasbourg.

Directeur : Dr M. Courtney

Le Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie, Universités de Pierre et Marie Curie et Paris VII.

Directeur : Pr J. F. Petroff

Le Centre de Recherches sur les Méningites et Schistosomiasés (CERMES) de Niamey, Niger.

Directeur : Dr D. J. Etienne

London School of Hygiene and Tropical Medicine de Londres, Angleterre.

Dr M. G. Taylor

SOMMAIRE

Résumé	page 9
Abréviations	page 10
Introduction	page 11
Généralités	page 13
Résultats-Discussion	page 76
Discussion-Conclusion	page 158
Matériels et Méthodes	page 172
Bibliographie	page 179
Table des Matières	page 205
Figures et Tableaux	page 211

RESUME

Dans le cadre d'une démarche vaccinale visant à réduire la pathologie de la schistosomiase et à en limiter la transmission, une enzyme de 28 kDa isolée de *S. mansoni* et à activité glutathion-S-transférase (Sm28GST), se place en sérieux candidat.

Chez le schistosome, les GSTs sont divisées en deux composants de masse moléculaire de 28 et 26 kDa. La caractérisation biochimique, le clonage moléculaire, l'expression et l'exploration du pouvoir protecteur de la forme minoritaire de 26 kDa de *S. mansoni* (Sm26GST) ont été réalisés. Moyennement protectrice dans le modèle du rat (17 à 25%), la Sm26GST recombinante a démontré un pouvoir de détoxification élevé vis-à-vis des métabolites générés par l'agression oxydative de macrophages activés par des anticorps, et à conséquence létale pour le schistosomule (stade cible de l'immunité). Cette observation, renforcée par la localisation ultrastructurale des SmGSTs, est en accord avec l'hypothèse selon laquelle la neutralisation des fonctions enzymatiques des GSTs par un mécanisme moléculaire approprié augmenterait la sensibilité du parasite vis-à-vis des effecteurs immuns. Une étude comparative des propriétés biologiques, biochimiques et immunologiques des deux entités moléculaires constituant les SmGSTs est également rapportée ici.

Dans le but de développer un vaccin dirigé contre les espèces majeures de schistosome infectant l'homme (*S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*) et le bétail (*S. bovis*), nous avons cloné les gènes codant pour les GSTs de 28 kDa (28GSTs) de *S. haematobium* et de *S. bovis*. La comparaison des séquences polypeptidiques des quatre 28GSTs met en évidence des mutations dans les zones épitopiques T/B majeures. L'utilisation de sérums dirigés spécifiquement contre ces régions démontre l'existence de modifications conformationnelles au sein des 28GSTs suivant l'espèce de schistosome analysée. L'incidence de ces mutations sur le développement d'un vaccin polyspécifique est discutée.

Enfin, d'un intérêt pratique dans le cadre de l'optimisation de la préparation vaccinale et d'un intérêt fondamental dans la compréhension des mécanismes enzymatiques, nous avons entrepris de définir la structure tridimensionnelle de la Sm28GST par une approche cristallographique. L'obtention de cristaux à symétrie cubique diffractant à haute résolution aux rayons X a permis d'initier, en association avec une approche par modélisation, la construction de la structure spatiale de la molécule.

ABREVIATIONS

aa :	acide aminé
ADCC :	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante d'Anticorps
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ACF :	Adjuvant Complet de Freund
D.O :	Densité Optique
GSH :	Glutathion
GSHpx :	Glutathion peroxydase
GR :	Glutathion réductase
GST :	Glutathion-S-transférase
Ig :	Immunoglobuline
kDa :	Kilodalton
MEM :	Minimum Essential Medium
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
PBS :	Tampon phosphate 10 mM pH 7.4, NaCl 150mM
pI :	Point isoélectrique
PZQ :	Praziquantel
SmGSTs :	Glutathion-S-transférases de <i>S. mansoni</i>
Sm26GST :	Glutathion-S-transférase de 26 kDa de <i>S. mansoni</i>
Sm26GSTr :	Glutathion-S-transférase de 26 kDa de <i>S. mansoni</i> sous forme recombinante
Sm28GSTr :	Glutathion-S-transférase de 28 kDa de <i>S. mansoni</i> sous forme recombinante
SDS-PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium
SOD :	Superoxyde dismutase
SRP :	Schistosomula Released Products
s.u :	sous-unité
Th :	lymphocyte T auxiliaire (T helper)
SWAP :	Soluble Worm Antigen Preparation

INTRODUCTION

Aujourd'hui, le nombre de sujets souffrant de parasitoses augmente sans cesse dans les pays en voie de développement et les conséquences médicales et socio-économiques des endémies parasitaires sont souvent méconnues du grand public. Elles constituent un grave problème de santé public et une entrave au développement pour les pays du Tiers Monde.

Seconde endémie parasitaire à l'échelle mondiale après le paludisme, la schistosomiase ou bilharziose est une maladie parasitaire chronique et débilitante dont la prévalence mondiale atteint 200 millions d'hommes. Elle est responsable d'environ 500.000 décès par an et continue de s'étendre, malgré d'importantes mesures de contrôles sanitaires et thérapeutiques. L'intensification des programmes d'irrigation en zone tropicale crée de nouveaux foyers favorables au développement de biotopes et contribue, pour une large part, à l'extension de la maladie (Prata et coll. 1987 et Fulford et coll. 1991). L'OMS estime à 650 millions, le nombre d'individus potentiellement exposés à cette parasitose et a considéré comme prioritaire la lutte contre cette endémie (Iarotski et coll. 1981). Les échecs des campagnes d'éradication, menées ces deux dernières décades, au niveau de la prévention sanitaire ou de la lutte contre les mollusques (hôtes intermédiaires), sont essentiellement liés à la stagnation des conditions de vie des populations des pays en voie de développement. De plus, si la chimiothérapie semble efficace dans la majorité des cas, elle est onéreuse et ne prévient pas la réinfection en zone d'endémie. Pour ces raisons, la stratégie actuelle de lutte contre la bilharziose est essentiellement dirigée vers une prophylaxie médicale active axée vers l'élaboration d'un vaccin. La démarche vaccinale semble en effet représenter la méthode de contrôle la mieux adaptée aux systèmes économiques et aux systèmes de santé des pays où se rencontre la bilharziose.

Contrairement aux protozoaires, le schistosome est incapable de se multiplier chez son hôte définitif, où il a un cycle sexué. Par conséquent, l'immunité stérilisante n'est pas forcément nécessaire à la confection d'un vaccin contre le schistosome. En effet, il est admis sur la base d'études expérimentales, épidémiologiques et mathématiques, qu'une réduction partielle de la charge vermineuse de 50 à 60% serait suffisante à la fois pour diminuer de façon considérable l'incidence des manifestations pathologiques liées au dépôt des oeufs dans les tissus et pour

affecter grandement le potentiel de transmission du parasite.

Grâce aux acquis de l'immunologie parasitaire, de la relation hôte-parasite et du développement du génie génétique et protéique, diverses molécules ont démontré une aptitude à induire un degré de protection significatif contre l'infection par le schistosome. Parmi celles-ci, l'antigène le plus prometteur est une enzyme de 28 kDa à activité glutathion-S-transférase caractérisée chez *S. mansoni* (Sm28GST) par Balloul et coll. (1985). L'immunisation par cet antigène, dans divers modèles expérimentaux, confère une protection en terme de diminution de la charge parasitaire et entraîne également une altération marquée de la fécondité des vers femelles, ce qui se traduit par une diminution de la pathologie et aurait probablement une incidence considérable sur la transmission de la maladie. Il semble donc que toutes les conditions soient réunies pour l'élaboration d'un vaccin transposable chez l'homme. Les essais d'expérimentation chez l'être humain (phase I) sont programmés dans un avenir proche.

Sur la base de ces informations et considérant le rôle vraisemblablement essentiel des GSTs dans la physiologie du parasite, il nous est apparu important d'étudier plus précisément ces enzymes chez le schistosome où deux composants de masse moléculaire de 28 et 26 kDa coexistent.

- Dans un premier temps, nous avons axé nos travaux vers la forme enzymatique minoritaire migrant à 26 kDa chez *S. mansoni* : la Sm26GST.

- Parallèlement et dans le cadre de la synthèse d'un vaccin dirigé contre les espèces majeures de schistosome, il nous a semblé indispensable de caractériser et de cloner les GSTs d'une part chez *S. haematobium*, agent de la bilharziose urogénitale de l'homme, et d'autre part chez *S. bovis* principal agent de la bilharziose bovine et ovine en Afrique.

- Enfin, d'un intérêt fondamental dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la catalyse, nous avons entrepris de résoudre la structure tridimensionnelle de la Sm28GST. Cette étude se révèle capitale dans l'optimisation des potentialités vaccinales de la Sm28GST.

Ces trois chapîtres constitueront l'essentiel des travaux exposés dans ce mémoire après quelques rappels généraux sur les acquis réalisés dans le domaine de l'immunologie des schistosomiasés, sur l'historique de la Sm28GST et sur les glutathion-S-transférases.

GENERALITES

La schistosomiase ou "la maladie du fleuve" vient au premier plan des maladies parasitaires à transmission aquatique. Déjà décrite dans l'Ancienne Egypte, comme le démontre le célèbre papyrus médical d'Eber (1550 avant J.C), la schistosomiase constitue un groupe d'infections parasitaires dont les formes pathologiques sont différentes suivant les espèces infestantes. Chez l'homme, on distingue trois formes de bilharziose : urinaire, intestinale et rectale-génitale. De par sa prévalence, sa large distribution, son importance dans la morbidité et l'inconfort physique et moral qu'elle suscite, la bilharziose reste de nos jours l'un des plus grands fléaux de santé publique à l'échelle mondiale. A cela, se superposent des réalités économiques paralysant le développement d'un certain nombre de pays. La léthargie étant l'un des maîtres symptômes de la maladie, elle contribue à une importante baisse de la productivité humaine. De plus, certaines espèces zoophiles infectant le bétail sont responsables de graves pertes économiques pour les pays tropicaux exportateurs de viande, notamment d'Afrique de l'Est.

1- Répartition géographique des schistosomiasés

La bilharziose sévit dans les régions tropicales et sub-tropicales du globe et représente l'une des infections parasitaires les plus répandues au monde. D'après un récent rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, la bilharziose est endémique dans 76 pays et les continents Africain, Sud-Américain et Asiatique sont les plus touchés (Figure 1). Chez l'homme, 3 espèces majeures dominent : *S. mansoni* (Amérique du Sud, Afrique et Caraïbes), *S. haematobium* (Afrique et Proche-Orient) et *S. japonicum* (Extrême-Orient).

La pauvreté, qui ne cesse de s'accroître d'année en année, la mauvaise hygiène de vie des populations ainsi que la rareté ou l'inexistence d'installations sanitaires représentent autant de facteurs favorisant l'évolution des aires de répartition de la bilharziose. De plus, l'actuelle accélération des programmes d'irrigation et d'aménagements des cours d'eau, ainsi que l'accroissement de la migration des populations, contribuent à l'apparition de nouveaux foyers. C'est ainsi qu'une épidémie gravissime de bilharziose à *S. mansoni* se développe actuellement dans la région de Saint-Louis, au Sénégal, où le taux de prévalence est de l'ordre de 80 à 90%

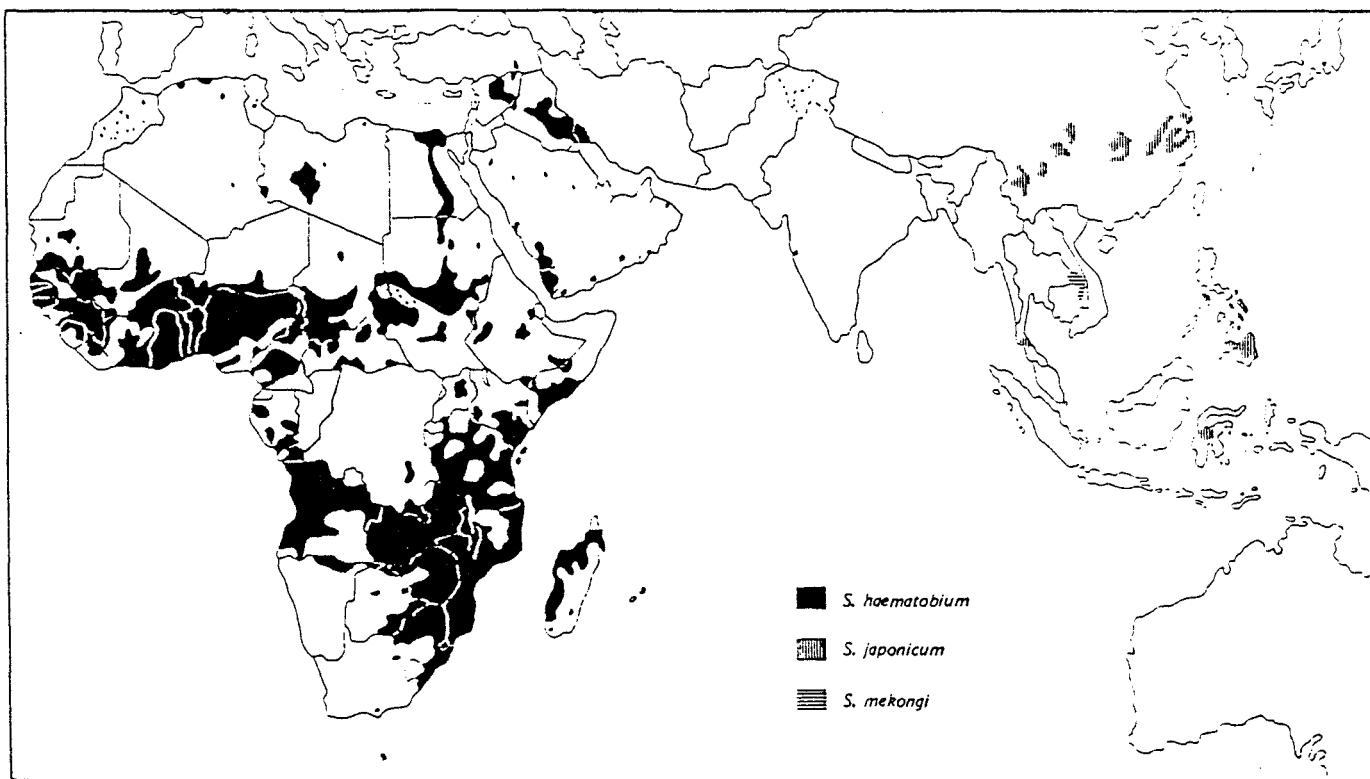
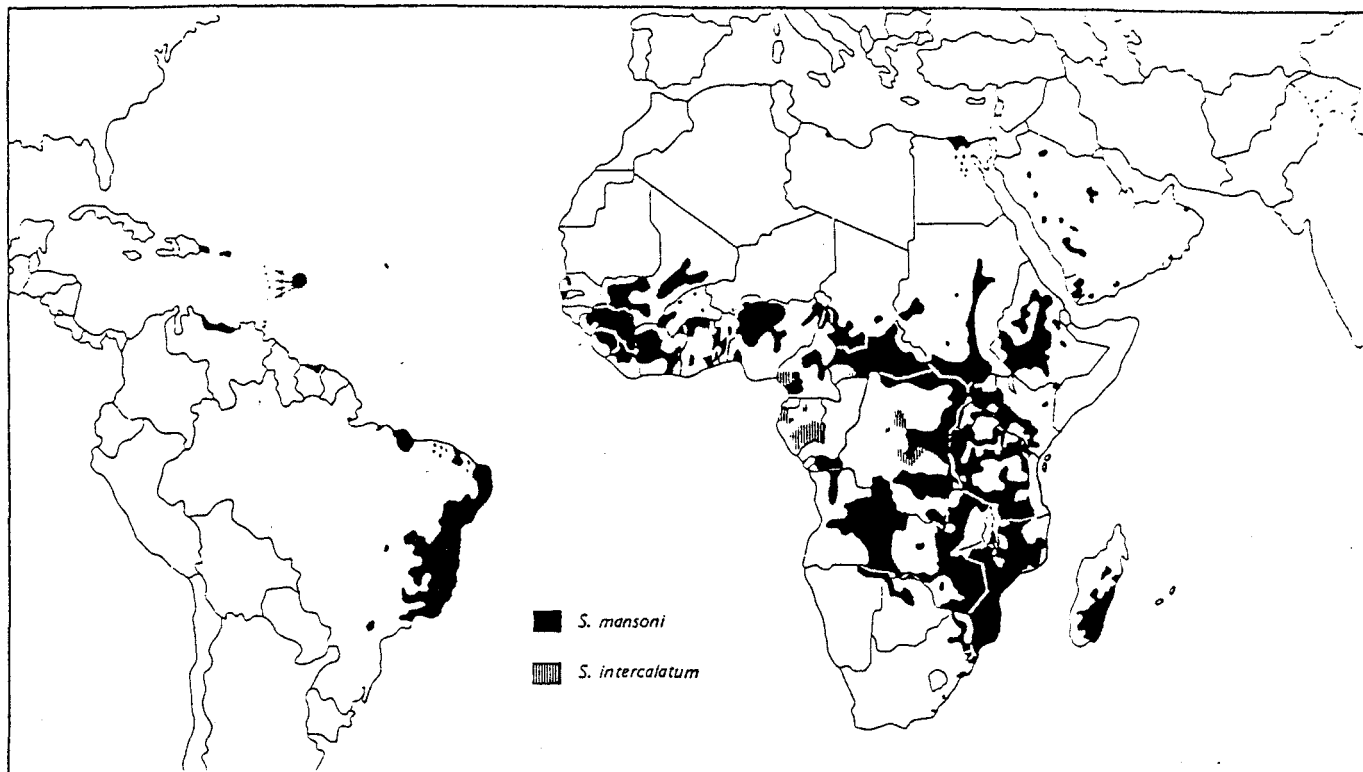


Figure 1. Répartition géographique des schistosomiasés humaines.
(d'après : "Atlas de la répartition mondiale des schistosomiasés", O.M.S. 1987)

(Talla et coll. 1990). La pathologie est d'autant plus grave que les populations atteintes n'ont jamais été au contact de la maladie. Malgré toutes ces observations, peu de pays ont décrété la bilharziose comme priorité de santé publique. Il est vrai que la dette extérieure de la plupart des pays en voie de développement a empêché la mise en place de programmes coûteux pour le contrôle de la maladie. Les pays endémiques sont en fait incapables de mener des programmes de lutte à grande échelle, car le prix en devise des médicaments anti-bilharziques est supérieur au budget total de la plupart des ministères Africains de la santé (12 Francs / an / personne au Niger). Certains pays, dont la Chine, l'Egypte et le Brésil ont toutefois décidé de mettre en place des moyens de lutte à long terme contre la bilharziose et consacrent des millions de dollars pour son éradication locale (Sleigh et coll. 1986).

2- Place des schistosomes dans le règne animal

Les helminthes sont des invertébrés métazoaires appartenant à l'embranchement zoologique des vers. Le genre *Schistosoma*, qui rassemble 18 espèces (Short et coll. 1983), est un plathelminthe trématode digène qui se localise dans l'appareil circulatoire de son hôte définitif mammifère. La classification est basée sur la morphologie des oeufs (éperon latéral, éperon terminal, éperon rudimentaire) ou sur le spectre d'infectivité. On distingue ainsi :

Les espèces anthropophiles : *S. mansoni* et *S. intercalatum* (bilharziose intestinale) et *S. haematobium* (bilharziose urogénitale).

Les espèces anthropo-zoophiles : *S. japonicum* et *S. mekongi* (bilharziose intestinale)

Les espèces zoophiles : *S. rodhaini* et *S. sinensium* (rongeurs et carnivores), *S. incognitum* (suidés) et *S. curassoni*, *S. bovis*, *S. matthei*, *S. leiperi*, *S. edwardiense*, *S. hippopotami*, *S. margrebowie*, *S. indicum*, *S. spindale* et *S. nasale* (porcins et ruminants).

La taxonomie des schistosomes est complexe car l'apparition d'hybrides naturels ainsi que des variations au sein d'une espèce peuvent générer des différences dans les capacités d'infectivité et de développement chez l'hôte (Nadler et coll. 1987). L'incidence de ces hétérogénéités inter- et

intra-spécifiques dans le cadre d'une stratégie de contrôle de la maladie est évidente.

Le génome des schistosomes représente un dixième du génome humain mais il est dix fois plus grand que celui des protozoaires ($2,7 \cdot 10^8$ paires de bases sur 8 paires de chromosomes, Simpson et coll. 1982).

3- Cycle évolutif

Le schistosome utilise un hôte définitif vertébré et un hôte intermédiaire mollusque aquatique. Pour les trois principales espèces infectant l'homme (*S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*), le mollusque est spécifique (*Biomphalaria*, *Bulinus* et *Oncomelania*) et les préférences climatiques et écologiques du mollusque conditionnent souvent la prévalence et l'intensité de l'infection. Le spectre de l'hôte définitif est variable pour les schistosomes humains : étroit chez *S. haematobium* et large chez *S. japonicum* dont le réservoir animal est très étendu et représente un obstacle supplémentaire pour l'éradication de cette espèce particulière. La Figure 2 nous montre le mode d'infestation et les phases évolutives de la maladie.

3-1 Description générale du cycle

Lorsque certains paramètres de l'écosystème sont favorables, les mollusques libèrent dans le milieu aquatique les larves infestantes pour l'hôte définitif, dénommées cercaires. Par passage à travers la peau de l'hôte, les cercaires perdent leurs parties caudales et se transforment en schistosomules. Ceux-ci se dirigent progressivement vers les poumons puis vers le foie où ils achèvent de se différencier en vers adultes mâle et femelle. Les femelles s'installent dans les vaisseaux capillaires du système mésentérique où elles pondent leurs oeufs. Les oeufs peuvent traverser les parois intestinales ou vésicales grâce à leur éperon et ainsi être éliminés de l'organisme dans les fèces ou les urines. Au contact de l'eau, lorsque les conditions sont favorables (lumière, température 25-30⁰ C, pH neutre, salinité faible...), l'oeuf éclôt et se transforme en larve ciliée ou miracidium, capable d'infester le mollusque. Dans l'hôte intermédiaire, où le cycle est asexué, le miracidium se transforme en sporocyste primaire qui va bourgeonner en sporocystes secondaires. La pérennité du cycle est assurée par la transformation des sporocystes en cercaires, qui sont

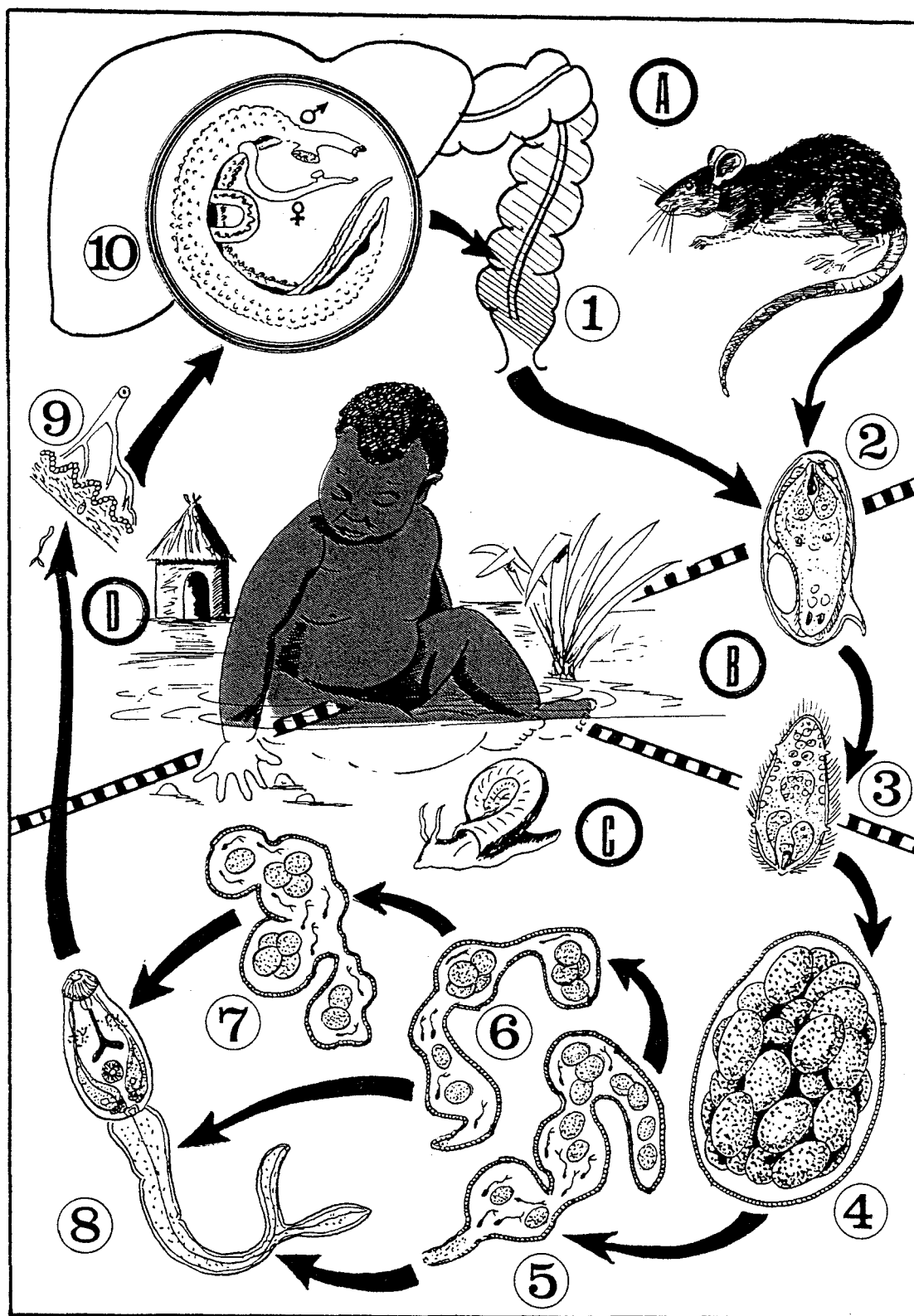


Figure 2.

Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni*
 (d'après : "Atlas de Parasitologie", Y. Golvan, Ed. Le léopard d'or)

ensuite libérées dans l'eau aux heures chaudes de la journée (Nojima et coll. 1982).

3-2 Le miracidium

Le miracidium est doté de cils vibratils qui lui permettent de se déplacer (2mm/sec) et de rechercher activement son hôte intermédiaire. Il semble que des stimuli d'ordres sensoriel et chimique favorisent la reconnaissance avec le mollusque.

3-3 Le sporocyste

La durée totale du cycle chez le mollusque (ou prépatence) est d'un mois mais celui-ci peut, par l'intermédiaire de ses hémocytes, développer une réponse de type immunitaire (Van Der Knaap et coll. 1990). Après pénétration du tégument, la larve rejoint l'hépatopancréas du mollusque et donne naissance à plusieurs générations de sporocystes. Par bourgeonnement, des quantités considérables de cercaires sont alors produites par le mollusque. L'émission cercarienne se déroule en des périodes bien précises de la journée, qui coïncident généralement avec les périodes de contact aquatique des populations.

3-4 La cercaire

Représentant la deuxième forme libre infestante du cycle, la cercaire ou furcocercaire est pourvue d'une grande mobilité grâce à son appendice caudal fourchu. Après sa libération dans l'eau, la réserve en glycogène dans la queue et le corps diminue de façon exponentielle et au delà de 8 à 12 heures, la cercaire ne peut survivre (Lawson et coll. 1980). Elle doit donc rapidement trouver son hôte définitif, par l'intermédiaire de signaux de reconnaissance encore inconnus.

3-5 Le schistosomule et le ver adulte

Les cercaires se fixent sur l'épiderme grâce à leur ventouse antérieure munie d'épines. La production d'enzymes protéolytiques par les glandes acétabulaires permet à la larve de traverser les couches supérieures de la peau (Landsperger et coll. 1982). A ce stade, le passage d'un milieu

d'eau douce vers un milieu où l'osmolarité est grande requiert une évolution complexe et perfectionnée du parasite. Des modifications structurales, morphologiques et biochimiques vont permettre au parasite de s'adapter à son nouveau mode de vie chez son hôte définitif (Stirewalt et coll. 1974). Miller et coll. (1986) ont observé que les oligosaccharides de surface jouaient un rôle primordial dans l'adaptation chez divers organismes face aux importantes variations de pression osmotique. Chez *S. mansoni*, une structure glycanique commune au parasite, à son hôte intermédiaire mollusque (*B. glabrata*) et à un mollusque marin primitif (*Megathura crenulata*) a été identifiée (Grzych et coll. 1987).

Le schistosomule néoformé va suivre un cycle migratoire complexe dont l'élucidation a été possible grâce à des techniques de radiomarquage de cercaires infestantes (Christensen et coll. 1977). La première phase migratoire est comprise entre 10 et 21 jours. Après un séjour cutané de quelques jours (5 chez la souris et 3 chez le rat), le schistosomule atteint les poumons par transport lymphatique et sanguin dès le 5^{ème} jour post-infection chez le rat et le 8^{ème} jour chez la souris. De là, il gagne par voie circulatoire la veine porte intra-hépatique dès le 15^{ème} jour après un passage au niveau du coeur et du poumon (Wilson et coll. 1986 et Knopf et coll. 1986). A ce stade hépatique, le jeune parasite va subir un profond remaniement structural et physiologique (Torpier et coll. 1977). Il va se développer, se différencier, puis maturer sexuellement (20 à 30 jours). Chez l'homme, les vers accouplés peuvent demeurer plusieurs années (3 à 5 années en moyenne) dans les rameaux de la veine porte. Vermund et coll. (1983) ont rapporté des périodes pouvant atteindre 30 ans. Après accouplement dans le foie, les vers appariés se déplacent à contre courant grâce aux ventouses et gagnent les lieux de ponte. Les schistosomes adultes vivent alors accouplés dans les capillaires d'organes creux particulièrement le long du tube digestif (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. bovis*, *S. intercalatum*...) ou autour du système urogénital (*S. haematobium*).

Le nombre d'oeufs excrétés quotidiennement varie suivant les espèces de schistosome (Loker et coll. 1983). Pour *S. japonicum*, on dénombre des milliers d'oeufs pondus par jour. La destinée des oeufs est double : ils sont éliminés dans les excréta par passage à travers les muqueuses et assurent ainsi la continuité du cycle. Ils peuvent également être bloqués dans les tissus où des manifestations pathologiques se manifestent pour former des granulomes.

4- Biologie des schistosomes

4-1 Nutrition et métabolisme

La femelle, localisée dans le canal gynécophore du mâle, semble essentiellement spécialisée dans la reproduction (Basch et coll. 1990). Le mâle, qui possède une musculature importante et un tégument développé, assure les fonctions de protection, de nutrition et de locomotion.

L'absorption se fait par voie buccale et trans-tégumentaire suivant la nature des nutriments. Le schistosome est un parasite sanguicole et hématophage. La femelle consomme environ 1,5 million d'hématies/jour soit 10 fois plus que le mâle. Les globules rouges sont lysés et libèrent l'hémoglobine qui est dégradée par une molécule apparentée à la cathepsine (Chappell et coll. 1986). L'activité hémoglobinasique permet la constitution d'un stock d'acides aminés nécessaire au métabolisme du ver. Le schistosome est un grand consommateur de glucose (26% de son poids sec est ingéré par heure). Une réserve importante en glycogène permet une conversion rapide en glucose qui sera métabolisé ultérieurement par la voie aérobie ou anaérobie suivant le demande énergétique.

4-2 Excrétion

Le tégument participe à l'excrétion des déchets toxiques mais cette fonction est principalement assurée par les protonéphridies. Chaque tubule les constituant est pourvue d'une cellule "flamme" munie de nombreux flagelles qui assurent un flux continu au sein de la néphridie ainsi que la collecte des métabolites du tissu parenchymateux vers la lumière de l'organe.

4-3 Reproduction

L'hermaphrodisme (Basch et coll. 1990) et la parthénogenèse peuvent apparaître sous certaines conditions notamment lorsque les femelles se trouvent en présence de mâles stériles ou hétérosécifiques (Basch et coll. 1984).

L'appariement quasi permanent des vers adultes mâle et femelle chez l'hôte vertébré aboutit à une

production constante d'oeufs. Après fécondation, les femelles pondent les oeufs qui après 6 jours donneront naissance au miracidium. Des sécrétions miracidiales à potentialités antigéniques et toxiques semblent intervenir dans les processus d'hypersensibilité granulomateuse (Boros et coll. 1989). Le dépôt des oeufs tissulaires est en grande partie à l'origine de la pathologie bilharzienne.

5- Pathologie associée aux bilharzioses

Généralement, l'infection par *S. mansoni* provoque deux types de manifestation pathologique : la forme asymptomatique et la forme sévère qui peut atteindre 5 à 10 % des populations infectées (Kloetzel et coll. 1964). Des prédispositions génétiques ainsi que l'importance de la charge parasitaire semblent influencer les manifestations sévères de la maladie. Des études épidémiologiques et génétiques sur une population infectée par *S. mansoni* au Brésil, suggère l'existence d'un gène co-dominant majeur contrôlant l'intensité de l'infection (Abel et coll. 1991 et Dessen et coll. 1992).

5-1 Forme aiguë

Les formes sévères sont relativement rares en zone d'endémie ancienne mais malheureusement fréquentes dans les zones d'émergence récente de nouveaux foyers (Gryseels et coll. 1989). La présensibilisation des jeunes enfants aux antigènes bilharziens par le placenta ou le lait maternel est probablement responsable de la rareté des formes sévères (Carlier et coll. 1980). Chez les individus non-immuns, il se développe, 10 semaines après la primo-infestation un syndrome (fièvre de Katayama) qui se caractérise par une hyperthermie, des diarrhées, une hépatosplénomégalie et des malaises évoluant parfois vers des complications à pronostic fatal.

5-2 Les granulomes et l'immunopathologie

L'arrivée des oeufs dans les sinusoides hépatiques provoque une réaction d'hypersensibilité retardée ou réponse granulomateuse (réaction inflammatoire à médiation cellulaire). Le système immunitaire est impliqué dans la réponse granulomateuse, elle-même initiée par un stimulus

antigénique de l'oeuf. Les oeufs sont en effet capables de sécréter des substances à travers les micropores de la coquille et d'induire une réponse immunitaire cellulaire et/ou humorale dont la composition et la nature dépendent de l'organe concerné. Les conséquences de la réponse granulomateuse permettent la séquestration des sécrétions miracidiales hépatotoxiques (Dunne et coll. 1981) et la destruction du miracidium par l'intermédiaire des éosinophiles. Les peptides sont présentés aux cellules T qui, par l'intermédiaire des lymphokines, recrutent divers populations cellulaires qui s'accumulent autour des oeufs : éosinophiles, cellules géantes multinuclées, macrophages, lymphocytes. Ces cellules sont ensuite remplacées par des fibroblastes producteurs de protéines matricielles dont l'accumulation aboutit à la constitution d'un nodule fibreux. L'évolution en fibrose cicatricielle va générer une hypertension portale responsable de l'hépatomégalie. Une circulation collatérale se développe, avec création de varices oesophagiennes, dont la rupture peut conduire à des hématoméses mortelles.

5-3 Forme chronique

Comme mentionné plus haut, la pathologie est essentiellement liée au dépôt des oeufs dans les tissus (Cheever et coll. 1965). Les lésions sont dues à la formation de granulomes et à la réponse immunitaire systémique de l'hôte : lympho-prolifération, lésions dues à des dépôts d'immuns complexes dans les glomérules rénaux (Gentilini et coll 1982), dermatite. Les réponses cellulaires systémiques vont persister durant la phase chronique de la maladie, mais sous forme atténuée. Les bilharzioses chroniques peuvent engendrer de profondes perturbations métaboliques et physiologiques chez le patient : dérèglement endocrinien, paralysie... Parallèlement à l'activité hématophage du schistosome, certaines substances dérivés du métabolisme parasitaire pourraient créer une inhibition de l'hématopoïèse de l'hôte et ainsi participer aux phénomènes d'anémie. Des pathologies associées à la bilharziose ont été massivement rapportées dans la littérature. A titre d'exemple, le cancer de la vessie associé à la bilharziose à *S. haematobium* constitue la principale cause de décès par cancer en Egypte chez les hommes de 20 à 44 ans.

6- Diagnostic

La coproscopie et l'uroscopie (mise en évidence des oeufs dans les excréta) constituent encore des méthodes de diagnostic en zone d'endémie mais des problèmes de sensibilité interviennent lors d'infections légères. L'imagerie médicale (échographie, cystoscopie...) permet la détection de fibroses hépatiques. Cependant, la réalisation peu aisée de ces techniques et leurs coûts élevés en limitent l'usage. Le test diagnostic est donc actuellement secondé par des analyses cliniques (modification de constantes sanguines caractéristiques : hyperéosinophilie...) et par des examens immunologiques.

6-1 Recherche des anticorps

Les techniques d'hémagglutination, d'ELISA, d'Immunoblotting ou de RAST (Radioallergosorbent) peuvent être employées et les antigènes les plus utilisés pour leur fiabilité sont dérivés de l'oeuf (Dunne et coll. 1984). Cependant, ni la nature de l'infection ni même l'approximation de la morbidité et de la masse parasitaire ne peuvent être corrélées à ce type de résultats sérologiques.

6-2 Recherche des antigènes circulants

Les antigènes circulants peuvent être détectés de façon précoce et être corrélés à l'intensité de l'infection (Santoro et coll. 1979b). Des problèmes de sensibilité et de coût apparaissent toutefois. Le dosage des hormones ecdystéroïdes issues du parasite reflète le niveau d'infection (Nirdé et coll. 1984).

6-3 Recherche des complexes immuns

Les complexes immuns sont responsables de diverses pathologies notamment au niveau rénal et leur présence a pu être corrélée à l'intensité de l'excrétion fécale des oeufs et de la morbidité chez des patients infectés par *S. mansoni* (Santoro et coll. 1980).

6-4 Conclusion

L'évaluation de l'efficacité d'un traitement par chimiothérapie ou d'une campagne de vaccination apparaît de plus en plus nécessaire à l'heure actuelle. C'est pourquoi, un regain d'intérêt pour les méthodes de diagnostic des schistosomiasis semble utile : modernisation, facilité d'usage, fiabilité et faible coût.

7- Prophylaxie sanitaire des schistosomiasis

La prophylaxie sanitaire active a pour but pratique de limiter les contacts entre l'hôte définitif et le biotope aquatique où séjournent les mollusques vecteurs. L'épandage de mollusquicides ou l'introduction de mollusques compétiteurs a donné des résultats ponctuels encourageants (Fenwick et coll. 1987) mais à grande échelle, l'efficacité de ces méthodes de lutte reste discutable.

La prophylaxie sanitaire passive vise à réduire les contaminations de l'eau par les excréta. Ce moyen de lutte doit cependant être intégré dans de plus vastes programmes de développement économique des pays du Tiers-Monde pour aboutir à un réel succès.

Des problèmes sociaux, économiques et même écologiques compréhensibles semblent entraver les méthodes actuelles de lutte contre les schistosomiasis. La prophylaxie médicale paraît donc à grande échelle et à long terme être le seul recours de lutte efficace contre les bilharzioses.

8- Traitement

L'efficacité thérapeutique des médicaments à potentialité schistosomicide repose sur des critères de survie du ver adulte et sur la quantité et la qualité des oeufs pondus. Le coût élevé, la présence d'effets secondaires indésirables et la lourdeur des protocoles d'utilisation ont limité l'emploi des médicaments anti-bilharziens ces dernières années (Oltipraz, oxamniquine....). Cependant, le praziquantel (PZQ) semble être le plus efficace et d'utilisation généralisée pour toutes les espèces de schistosome infectant l'homme. Son mécanisme d'action est peu connu mais il semble faire intervenir un brusque influx de calcium à travers le tégument du schistosome entraînant des perturbations musculaires et des altérations tégumentaires qui aboutissent à sa perméabilisation

(Harnett et coll. 1988). L'efficacité du PZQ est augmentée par la coopération d'anticorps spécifiques (Brindley et coll. 1987) et de cellules T circulantes (Sabah et coll. 1985).

Peu efficace contre les formes hépatospléniques sévères de la maladie, l'emploi curatif du PZQ se heurte à plusieurs inconvénients (Zwingenberger et coll. 1990) :

- il ne prévient pas les réinfections qui peuvent réapparaître très rapidement en zone d'endémie (6 à 12 mois).
- il diminue l'immunité acquise à la réinfection (Moloney et coll 1987).
- il peut aggraver le tableau clinique du patient par la libération massive d'antigènes parasitaires et l'apparition de complexes immuns.
- il reste onéreux, surtout en cas d'utilisation répétée.

Le contrôle des bilharzioses humaines semble donc davantage passer par une stratégie de lutte préventive.

**PROPHYLAXIE MEDICALE
DES SCHISTOSOMIASES**

L'élucidation et la compréhension des mécanismes effecteurs de la réponse immune chez l'animal de laboratoire et chez l'homme sont indispensables au bon déroulement d'une stratégie vaccinale. Nous analyserons dans un premier temps les informations obtenues par utilisation d'animaux de laboratoire pour ensuite aborder l'immunologie des populations humaines résidant en zone d'endémie et enfin décrire les différentes stratégies vaccinales actuellement menées dans les différents laboratoires du monde s'intéressant à la bilharziose.

1- La réponse immune contre *Schistosoma mansoni* dans des modèles animaux

1-1 Les modèles animaux

La compréhension des mécanismes immunologiques de l'infection par le schistosome a été facilitée par l'obtention de modèles d'animaux susceptibles à l'infection.

1-1-1 La spécificité d'espèce

Le degré de susceptibilité se détermine par de multiples critères expérimentaux :

- Le pourcentage de cercaires pénétrant dans l'organisme par rapport au nombre de cercaires appliquées.
- L'importance de la charge parasitaire (nombre de vers présents dans l'animal infecté).
- Le nombre et la localisation des oeufs présents dans l'organisme et dans les excréta.

Des différences de susceptibilité sont ainsi établies et on peut classer les hôtes définitifs en fonction de leur permissivité naturelle face à une infestation expérimentale :

- Le hamster représente un hôte susceptible et il permet la maturation complète des vers adultes (J35-40). Ce modèle est utilisé en laboratoire pour le maintien du cycle parasitaire en association avec un élevage de mollusques.
- La souris est également susceptible à l'infection mais ne permet pas la récupération d'un grand nombre de vers.

- Le lapin et le cobaye permettent la récupération des vers adultes matures mais non producteurs d'oeufs. La résistance à la réinfection qui caractérisent ces animaux en font des modèles de choix pour l'étude de certains aspects immunitaires (Rogers et coll. 1986).
- Le rat permet l'infection et la maturation hépatique des vers. Cependant au delà de la 4^{ème} semaine, la charge parasitaire chute brutalement pour être éliminée vers la 6^{ème} semaine post-infection (phénomène du self-cure, Smithers et coll. 1965a). Parallèlement, la réponse humorale s'amplifie au delà de cette période suggérant un stimulus antigénique persistant.
- Le singe Rhésus (*Macaca mulatta*) est susceptible à l'infection mais le nombre d'oeufs émis décroît lorsque qu'il est trop massivement infecté (Smithers et coll. 1965b)
- Le babouin olive (*Papio anubis*) permet la maturation des vers et une ponte importante (Sadun et coll. 1966). Il assure ainsi la transmission normale du cycle grâce à l'établissement pérenne d'une population de vers adultes fertiles.
- L'homme se comporte comme un hôte susceptible chez lequel la durée d'infection peut atteindre des années.

1-1-2 Le choix du modèle

Suivant le comportement de l'animal face à l'infection, trois catégories peuvent être distinguées (Kagan et coll. 1958) :

- Les hôtes résistants (le pigeon chez lequel les cercaires sont détruites au niveau de l'épiderme)
- Les hôtes partiellement résistants (le rat et le singe Rhésus)
- Les hôtes susceptibles (le hamster, la souris, le babouin et l'homme).

L'immunité naturelle peut s'exprimer à différents niveaux : au niveau de la cercaire qui va plus ou moins bien franchir la barrière cutanée et au niveau du développement larvaire qui peut être contrôlé par l'environnement hormonal de l'hôte (Robinson et coll. 1958). Enfin, des arguments expérimentaux démontrent l'implication du système immunitaire de l'hôte dans la non-permissivité (Cioli et coll. 1976).

Chaque modèle présente des avantages et des inconvénients. Le rat est inapproprié pour l'étude de la pathologie mais il permet d'aborder les mécanismes de la résistance à la réinfection. La souris constitue un bon modèle pour l'étude de l'immunopathologie liée au dépôt des oeufs dans les tissus et celle de l'immunorégulation. De plus, des variations phénotypiques peuvent se manifester chez la

souris (Kagan et coll. 1958) et des études sur le contrôle génétique de la réponse immune vis-à-vis d'antigènes du schistosome peuvent être menées (Schweitzer et coll. 1992). Il semble acquis, à l'heure actuelle, que la nature des composants de la réponse immune puisse expliquer les différences de comportement des modèles rat et souris face à l'infection par *S. mansoni*. L'immunité protectrice du rat fait essentiellement intervenir des mécanismes dépendant d'anticorps alors que chez la souris, la composante cellulaire semble davantage intervenir (Mangold et coll. 1986). Chez l'homme, les deux composantes interviennent. L'élucidation précise des mécanismes immunitaires chez le rat et la souris étaient donc indispensables à la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'immunité contre le schistosome chez l'homme.

1-2 Les caractères généraux de la réponse immune vis-à-vis des schistosomes

La dynamique du développement du parasite ainsi que la chronicité de l'infection expose l'hôte définitif à une répétition de stimulations antigéniques spécifiques des stades larvaire, adulte et oeuf. Afin d'éviter les réactions d'hyper-réactivité, le système immunitaire de l'hôte doit moduler sa réponse. Pour *S. mansoni*, il semble que ce phénomène existe dans le contrôle de la réaction granulomateuse.

1-2-1 L'immunité concomitante

A des degrés divers, une résistance à la réinfection existe chez la plupart des espèces animales infectées et la permissivité naturelle d'une espèce est généralement inversement proportionnelle à sa capacité de développer une réponse protectrice vis-à-vis des réinfestations. Des mécanismes immuns sont donc capables de freiner et même d'annihiler les infections ultérieures. Alors que cette immunité semble inefficace contre le stade adulte du ver, elle est par contre active contre les formes larvaires infestantes. Ce concept a été introduit sous le nom de l'immunité concomitante par Smithers et coll. (1969) et sous-entend que des communautés antigéniques se partagent entre le stade larvaire et le stade adulte. Il semble que les jeunes schistosomes déclenchent dans un premier temps une réponse immune, contre laquelle ils se protègent ensuite, en acquérant des antigènes de

l'hôte à leur surface (Smithers et coll. 1967). Parallèlement, il a été démontré que suite à la première infection, des altérations vasculaires au niveau hépatique causées par les granulomes pouvaient gêner la migration des schistosomules de la deuxième infection et ainsi participer de façon mécanique au phénomène de la résistance à la réinfection (Harrison et coll. 1982, Wilson et coll. 1983 et Imbert-Establet et coll. 1992).

1-2-2 Stades inducteurs et stades cibles de la réponse immune

Taylor et coll. (1973) ont observé que des transplantations de vers adultes stériles sur des macaques Rhésus receveurs conféraient une protection contre une infection d'épreuve suggérant que le stade adulte puisse induire un stimulus protecteur. De plus, l'injection de larves atténuées incapables d'atteindre le stade adulte conduit aux mêmes effets protecteurs (Webbe et coll. 1982 et Ford et coll. 1984). Enfin, les oeufs n'induisent pas de protection malgré leur forte antigénicité dans divers modèles sauf chez la souris, où des mécanismes non-spécifiques paraissent intervenir (Miller et coll. 1981).

D'après le concept de l'immunité concomitante, les vers adultes sont insensibles à la réponse immune protectrice qu'ils déclenchent. Cependant, des exceptions à cette règle peuvent se présenter et notamment au niveau de l'altération de la croissance et de la fertilité du ver adulte. Par contre, le stade schistosomule représente la cible de choix pour le système immunitaire. Des mécanismes effecteurs non spécifiques et spécifiques ont été identifiés ainsi que des mécanismes d'évasion du parasite.

1-2-3 Les composantes de la réponse immune

Le parasite libère des antigènes par excrétion et sécrétion qui vont stimuler le système immunitaire de l'hôte. L'immunité à la réinfection fait intervenir diverses populations cellulaires du système immunitaire, des anticorps d'isotypes différents et des facteurs du complément. Il est clair que l'immunité développée contre *S. mansoni* est thymo-dépendante : des animaux déficients en fonction thymique sont sensibles à la réinfection (Capron et coll. 1983).

1-2-3-1 Mécanismes effecteurs non spécifiques

1-2-3-1-1 Le complément

Les stades cercaire et schistosomule peuvent activer le complément par la voie alterne (Sher et coll. 1976). Le complément activé est alors capable de lyser les larves précoces en absence d'anticorps spécifiques (Santoro et coll. 1979a). L'activité cytocide du complément peut être amplifiée lorsqu'on le combine à des cellules portant des récepteurs pour le C3b, tels les éosinophiles normaux (Ramalho-Pinto et coll. 1978).

1-2-3-1-2 Les cellules tueuses

Les cellules tueuses ou cellules NK (Natural killer) participent aux mécanismes non-spécifiques de l'immunité (Abe et coll. 1983) et une déficience en cellules NK semble liée à un tableau clinique sévère chez l'homme (Barsoum et coll. 1984).

1-2-3-1-3 Les macrophages

Des macrophages normaux de rats activés par des IgG agrégées non spécifiques (Ottesen et coll. 1977) ou par certaines lymphokines comme le Macrophage Inhibitory Factor (MIF, Bout et coll. 1981) peuvent provoquer la mort des larves en présence de complément.

1-2-3-1-4 Les réactions inflammatoires

La réaction inflammatoire déclenchée par la pénétration du parasite joue également un rôle dans l'immunité protectrice chez la souris (Mc Laren et coll. 1987). Bout et coll. (1986) démontrent que des plaquettes saines incubées avec une protéine inflammatoire produite au cours de l'infection, le CRP (C-Reactive Protein), sont capables de lyser les schistosomules *in vitro* en absence d'anticorps. *In vivo*, le transfert de plaquettes activées par le CRP conduit à une protection contre l'infection. Enfin, malgré l'absence de spécificité antigénique, l'utilisation d'immunostimulants tels

le BCG (Bacille de Calmette-Guérin), a conduit à des succès de protection chez la souris (Bout et coll. 1977).

1-2-3-2 Mécanismes effecteurs spécifiques

Bien qu'il soit difficile de dissocier l'immunité humorale et l'immunité cellulaire, tant leur relation fonctionnelle est importante, la nature des mécanismes effecteurs de l'immunité contre le schistosome peut être séparée en trois parties.

1-2-3-2-1 Dépendant d'anticorps en présence de complément

La présence d'une activité larvicide dans un sérum fut pour la première fois démontrée en utilisant un sérum immun de macaque Rhésus infecté. Cette activité s'exerçait par l'intermédiaire des IgG en présence de complément (Clegg et coll. 1972). Cette découverte fut ensuite observée chez les rongeurs immunisés (Murrell et coll. 1975) et chez l'homme (Capron et coll. 1977).

1-2-3-2-2 Dépendant d'anticorps avec coopération cellulaire

Chez le rat, l'immunité à la réinfection est principalement basée sur la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity : ADCC). Il s'agit d'une coopération entre des cellules pro-inflammatoires non lymphoïdes et des anticorps spécifiques d'isotype particulier (dénommés anticorps anaphylactiques, IgE et IgG2a chez le rat) qui génère un processus larvicide (lyse de la larve précoce). Les macrophages (Capron et coll. 1975), les éosinophiles (Capron et coll. 1981a) et les plaquettes (Joseph et coll. 1983) sont capables d'assurer cette fonction en présence d'IgE. Les neutrophiles (Incani et col. 1981) et les éosinophiles (Butterworth et coll. 1977) ont le même rôle en présence d'IgG. Ce mécanisme a été identifié avec des sérums provenant de rongeurs infectés ou de patients bilharziens (Butterworth et coll. 1982, Joseph et coll 1983 et Capron et coll. 1984a).

Les mécanismes de l'activité effectrice dépendent du type cellulaire : ils nécessitent l'expression de récepteurs cellulaires pour les anticorps (Fc récepteurs), la présence d'isotypes particuliers sous forme agrégée et parfois de signaux accessoires. L'interaction entre l'anticorps, combiné à la cible

parasitaire d'une part et à la cellule effectrice par l'intermédiaire du Fc récepteur d'autre part, conduit à l'activation de la cellule qui devient alors capable de léser le parasite.

1-2-3-2-2-1 Les macrophages

Des macrophages de rats sains sont capables de détruire *in vitro* le schistosomule en présence de sérum immun. Cette activité cytotoxique est inhibée par chauffage des sérums à 56 ° C et n'est pas restaurée par addition de complément frais. Ces résultats démontrent clairement la participation d'un facteur thermo-labile dans le sérum qui favorise le pouvoir schistosomicide du macrophage : ce sont les IgE (Capron et coll. 1975). Le récepteur de l'IgE sur le macrophage a été détecté par la suite (Dessaint et coll. 1979).

1-2-3-2-2-2 Les éosinophiles

Des éosinophiles prélevés sur des sujets humains non infectés sont capables de tuer les schistosomules *in vitro* en présence d'IgG provenant de sérums de patients bilharziens (Butterworth et coll. 1975). La fonction effectrice des éosinophiles a été rapportée par la suite chez le rat (McKenkie et coll. 1975), le babouin (Butterworth et coll 1976) et la souris (Kassis et coll. 1979).

Chez le rat, deux classes d'anticorps anaphylactiques interviennent : ce sont les IgE et les IgG2a, dont les récepteurs pour les fragments Fc ont été identifiés (Rabellino et coll. 1975 et Capron et coll. 1981b). Un signal activateur pour l'éosinophile, libéré par une deuxième population cellulaire accessoire (les mastocytes), semble intervenir dans l'activation de l'éosinophile : il s'agit de l'Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis (ECF-A, Capron et coll. 1981c). De plus, le parasite semble en mesure d'activer lui-même l'éosinophile par l'intermédiaire d'une protéase de type collagénase qui entraîne une augmentation de la synthèse des récepteurs pour la partie Fc des IgG sur l'éosinophile (Auriault et coll. 1983). Après interaction directe entre l'éosinophile et la surface de la larve, l'éosinophile libère le contenu de ses granules sur la surface de la cible (McLaren et coll. 1978). La peroxydase (Capron et coll. 1988), la MBP (Major Basic Protein, Butterworth et coll 1979a) et l'ECP (Eosinophil Cationic Protein, McLaren, et coll. 1981) pourraient intervenir dans les mécanismes schistosomicides de l'ADCC médiés par l'éosinophile.

1-2-3-2-2-3 Les plaquettes

Des plaquettes prélevées sur des rats infectés par *S. mansoni* sont capables de tuer *in vitro* des schistosomules (Joseph et coll. 1983). Cette capacité est d'ailleurs d'autant plus forte que le degré de résistance à la réinfection de l'animal est élevé. L'immuno-adsorption des IgE ou l'addition de protéines myéломateuses inhibent cet effet. Des plaquettes de rat sain sont dépourvues d'activité schistosomicide sauf lorsque des IgE provenant de rats immuns sont ajoutées. Les plaquettes dans ce mécanisme peuvent agir sans contact directe avec la cible en libérant des facteurs solubles cytotoxiques (Joseph et coll. 1986). L'ensemble de ces observations démontrent la nature IgE dépendante du mécanisme effecteur de l'ADCC médié par les plaquettes, le récepteur pour l'IgE des plaquettes étant probablement identique à celui du macrophage et de l'éosinophile (Joseph et coll. 1986).

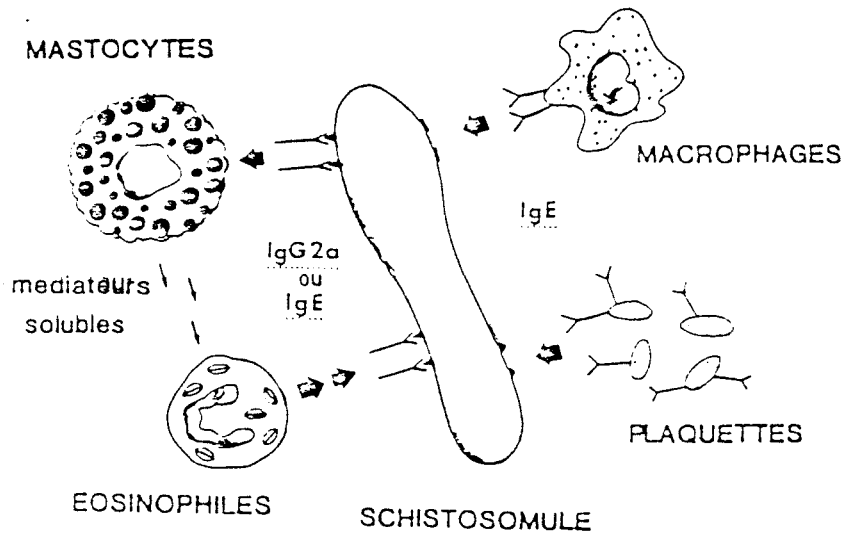


Figure 3.

Mécanismes effecteurs spécifiques dépendant d'anticorps avec coopération cellulaire contre les schistosomes

1-2-3-2-2-4 Pertinence *in vivo*

Des arguments expérimentaux ont apporté la pertinence *in vivo* de l'étroit parallélisme entre l'activité ADCC, le taux d'anticorps anaphylactiques et le développement de l'immunité dans divers modèles.

- Le transfert passif d'éosinophiles (Capron et coll. 1984a) ou de plaquettes (Joseph et coll. 1983) prélevés sur des rats immuns confère une protection chez les animaux receveurs infestés

ultérieurement.

- Le transfert passif d'immun-sérums de rat déplétés en IgE et en IgG2a ne protège pas contre l'infection (Capron et coll. 1980).
- Le transfert passif, le jour de l'infestation, d'anticorps monoclonaux d'isotypes IgG2a (Grzych et coll. 1982) ou IgE (Verwaerde et coll. 1987), cytotoxiques *in vitro*, entraîne une protection chez les animaux receveurs.

1-2-3-2-3 Dépendant de lymphokines

Malgré la présence de déterminants du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) à la surface du schistosomule (Butterworth et coll. 1979b), les cellules T cytotoxiques sont incapables de détruire la larve. Pourtant, la composante cellulaire T intervient de façon indirecte dans l'immunité. L'exploration du rôle des cellules T dans le développement de la résistance acquise a principalement été entreprise dans le modèle murin.

Mangold et coll. (1986) observent que le transfert de sérum de souris immunisées par des cercaires irradiées, et devenues résistantes à l'infection, sur des souris normales n'entraînent aucune protection. D'autre part, des souris nude ne développent pas de résistance à la réinfection (Sher et coll. 1982). La déplétion d'une sous-population de lymphocytes T (L3T4) supprime la résistance acquise après une exposition par des cercaires irradiées, confirmant ainsi le rôle primordial des cellules T (Kelly et coll. 1988).

Les lymphocytes T ont un rôle inducteur de la prolifération des lymphocytes B : des lymphokines produites par les lymphocytes T (IL-2, IL-4 et IL-5) interviennent dans la maturation des lymphocytes B dont la sécrétion d'anticorps spécifiques participe aux mécanismes effecteurs de la résistance

Les lymphocytes T produisent également des lymphokines qui activent directement des populations cellulaires impliquées dans des mécanismes de cytotoxicité indépendantes d'anticorps.

1-2-3-2-3-1 Activation des macrophages

James et coll. (1986a) démontrent que des macrophages normaux, de souris ou d'homme, sont capables de tuer les larves de schistosome en présence de fortes concentrations d'interféron γ

(IFN γ) et cela en absence d'anticorps. A forte concentration, ils sont larvicides seuls tandis qu'à faible concentration, leur activité est renforcée par la présence d'anticorps spécifiques. L'IFN γ , produit par une sous-population de lymphocytes T (Th1) après stimulation par les antigènes parasitaires (James et col. 1986a), semble donc crucial au développement de l'immunité. L'absence de résistance chez des lignées de souris génétiquement déficientes en fonctions macrophagiques ou en production de lymphokines plaide en faveur de cette assertion ainsi que du rôle essentiel du macrophage dans les mécanismes de défense (James et coll. 1984a). Cette activité est même exprimée tardivement dans le cycle migratoire du schistosome, après la migration pulmonaire chez la souris, alors que ce stade est insensible aux mécanismes de l'ADCC. Crabtree et coll. (1986) ont détecté la présence de macrophages au niveau pulmonaire autour des larves du challenge, démontrant la relevance *in vivo* de ce mécanisme.

Dans le contexte d'une immunisation active, James et coll. (1984b) observent que l'immunisation de souris par voie intradermique avec des antigènes larvaires en présence de BCG conduit à une protection significative de 50% et que l'induction de la réponse protectrice est T-dépendante. Elle est accompagnée par la production d'IFN- γ par les lymphocytes helper (Th1) et par l'apparition de macrophages activés (James et coll. 1986b et 1986c). L'ensemble de ces arguments expérimentaux démontre clairement l'implication d'une composante cellulaire, notamment des lymphocytes Th1, dans le développement d'une résistance contre l'infection dans le modèle murin. L'antigène majeur inducteur de la réponse immune protectrice dans ce modèle fut par la suite caractérisé comme étant une paramyosine de 97 kDa (Pearce et coll. 1986).

1-2-3-2-3-2 Activation des plaquettes

L'IFN γ a également un rôle schistomicide indirect par le biais de l'activation des plaquettes (Pancré et coll. 1987). Le transfert passif de plaquettes activées avec de l'IFN γ , la veille de l'infestation, conduit à une protection significative (Pancré et coll. 1989). Il semble que l'IFN γ active l'expression des récepteurs pour l'IgE à la surface des plaquettes et participe donc indirectement aux mécanismes de l'ADCC (Pancré et coll. 1988).

D'autres lymphokines expriment des fonctions activatrices ou suppressives de la plaquette : Damonville et coll. (1991) obtiennent par transfert passif de plaquettes activées par le TNF α une

protection de plus de 65% chez le rat. Cependant, un facteur suppresseur synthétisé par les lymphocytes, après stimulation antigénique, a été caractérisé (Pancre et coll. 1987): la PASL (Platelet Activity Suppressive Lymphokine).

1-2-3-2-3-3 Activation des éosinophiles

Certaines lymphokines peuvent activer les éosinophiles (Colley et coll. 1979a) : l'IL5 (Yamaguchi et coll. 1988) et le Tumour Necrosis Factor (TNF, Silberstein et coll. 1986)

1-2-3-3 Régulation de la réponse immune vis-à-vis de *S. mansoni*

1-2-3-3-1 Rôle des Th1 et des Th2

Les lymphocytes T helper (Th) peuvent être divisés en deux sous-populations suivant le type de lymphokines qu'ils sécrètent (Mosmann et coll. 1986).

- Les Th1 sont capables d'activer les macrophages et participent aux mécanismes d'hypersensibilité retardée. Ils synthétisent : l'IFN γ , le GM-CSF (Growth Macrophage Colony Stimulating Factor), le TNF (Tumour Necrosis Factor), l'IL-2 et l'IL-3.

- Les Th2 sont capables d'induire la croissance et la différenciation des lymphocytes B. Ils synthétisent : le TNF, l'IL-3, l'IL-4 (IgE), l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10.

Il est admis que la nature de la cellule présentatrice d'antigène favorise l'induction de telle ou telle sous-population de lymphocytes Th : les Lymphocytes B orienteraient une réponse de type Th2 et les macrophages de type Th1 (Janevay et coll. 1988 et Gajewski et coll. 1991).

En ce qui concerne l'infection par schistosome, les mécanismes dépendants d'anticorps sont essentiels au développement de l'immunité protectrice chez le rat (Capron et coll. 1987b) et chez l'homme (Hagan et coll. 1991). La réponse lymphocytaire serait plutôt de nature Th2. De plus, comme nous venons de le voir, l'immunité cellulaire est importante, notamment au niveau de la formation des granulomes. Elle fait intervenir les Th1 par le biais de l'IFN γ et de l'activation du macrophage. Le groupe d'Alan Sher, aux Etats-Unis, démontre que chez la souris, l'injection de parasites irradiés oriente une réponse de type Th1, tandis que l'infection naturelle oriente une réponse de nature Th2. Les deux composantes peuvent même coexister suivant le protocole

d'immunisation utilisé (James et coll. 1990, Pearce et coll. 1991 et Grzych et coll. 1991).

1-2-3-3-2 Immunorégulation du granulome

Les oeufs occupent un rôle central dans l'induction de la réponse Th2 et il est probable qu'au cours de l'infection naturelle, la réponse Th1 induite par les larves infestantes soit ensuite régulée par les antigènes d'oeuf vers une réponse de type Th2 (Sher et coll. 1991). Kanazawa et coll. (1992) suggèrent que les Th1 spécifiquement stimulés par les antigènes d'oeuf puissent participer à l'immunité à la réinfection, par l'intermédiaire de l'IFN γ . Il est admis que la réponse d'hypersensibilité retardée est médiée par les Th1 et les Th2 et que les deux sous-populations peuvent s'autoréguler. A titre d'exemple, l'IFN γ sécrété par les Th1 peut inhiber la croissance des Th2 (Fernandez et coll. 1988) et les Th2 peuvent synthétiser de l'IL-10 capable d'inhiber la synthèse des lymphokines par le Th1 (Moore et coll. 1990).

L'immunorégulation du granulome représente un ensemble de mécanismes complexes. Elle est assurée par de nombreux facteurs : IL2, MAF, MIF (Macrophage Inhibitor Factor), anticorps anti-idiotypiques, IFN γ ... De plus, l'évolution du granulome peut être contrôlée par divers facteurs de suppression d'origine parasitaire (Himmi et coll. 1985), des facteurs cellulaires (James et coll. 1990) et des facteurs humoraux (Boros et coll. 1982) qui vont caractériser la phase chronique. Dans le modèle murin, les Th2 interviendraient dans le développement de la réponse granulomateuse aiguë et les Th1 dans la modulation du granulome chronique (James et coll. 1990 et Grzych et coll. 1991). Le parasite peut également intervenir dans la modulation de granulomes cultivés *in vitro* par l'intermédiaire d'un tripeptide TKP capable d'inhiber les macrophages et issus de la dégradation par le parasite des immunoglobulines de l'hôte (Auriault et coll. 1980 et 1985).

1-2-4 Mécanismes d'évasion du schistosome

Si l'hôte est capable de limiter et de contrôler l'infection parasitaire, le schistosome est également apte à mettre en oeuvre des mécanismes d'échappement ou de modulation de la réponse immune de l'hôte. Le schistosome va en effet démontrer, au cours de l'infection, une ingéniosité remarquable face à la machinerie des réponses effectrices de l'hôte. Les interactions tantôt positives tantôt négatives vont aboutir à un équilibre, qui se traduira par la chronicité de la maladie caractéristique

de la bilharziose.

1-2-4-1 Acquisition d'antigènes de l'hôte

Quelques jours après la pénétration cutanée, le schistosome va acquérir des antigènes de l'hôte sur sa surface : ce phénomène a été nommé mimicrie moléculaire (Capron et col. 1965). Certains de ces antigènes ont été identifiés : alpha2-macroglobuline, antigènes du CMH et des groupes sanguins ABO et enfin des immunoglobulines fixées au tégument par leurs fragments Fc (Torpier et coll. 1979). La finalité de ce phénomène est probablement de masquer les antigènes de surface du parasite qui représentent des cibles potentielles des mécanismes effecteurs immuns. A côté de cette mimicrie moléculaire, des modifications membranaires du tégument, par remplacement de déterminants antigéniques, jouent un rôle prononcé dans la diminution progressive de la vulnérabilité des larves au cours du cycle migratoire.

1-2-4-2 Utilisation des lymphokines de l'hôte

Il semble que le parasite puisse utiliser la réponse granulomateuse de l'hôte à son profit afin de favoriser l'émission des oeufs (Damian et coll. 1987). Les mécanismes de ce phénomène restent inconnus mais l'excrétion fécale des oeufs est considérablement amoindrie chez la souris athymique infestée (Doenhoff et coll. 1978).

Par utilisation de souris SCID, Amiri et coll. (1992) démontrent que la synthèse des oeufs par les vers femelles ainsi que la formation des granulomes sont favorisées par le $TNF\alpha$ de l'hôte. Le parasite utilise donc cette cytokine, par l'intermédiaire d'un récepteur approprié, comme stimulus de reproduction et d'embryogenèse. L'hôte s'en sert indirectement comme moyen de protection contre les hépatotoxines sécrétées par le miracidium (Sher et coll. 1992). Ce formidable exemple d'adaptation assure non seulement la transmission du cycle parasitaire mais également la survie du parasite en protégeant son hôte.

1-2-4-3 Immunosuppression induite

Des facteurs d'origine parasitaire exercent chez l'homme une action suppressive (Colley et coll.

1979b). Parmi ceux-ci, la synthèse par le parasite d'un facteur de bas poids moléculaire, dénommé le Schistosome Derived Inhibitory Factor (SDIF), entraîne l'inhibition sélective *in vivo* et *in vitro* de la prolifération lymphocytaire et de la réponse IgE chez le rat (Dessaint et coll. 1977).

Enfin, la réponse humorale induite par le schistosome peut intervenir dans la modulation de la réponse immune à plusieurs niveaux :

- les complexes immuns, abondants en phase chronique, peuvent provoquer le blocage du pouvoir cytotoxique des anticorps spécifiques (Capron et coll. 1987) ou participer à la formation d'anticorps anti-idiotypiques.
- Certains anticorps, d'isotype particulier, sont capables de bloquer les fonctions effectrices des éosinophiles. Un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène de surface du schistosomule et d'isotype IgG2a peut voir son activité schistosomicide bloquée par addition d'un anticorps monoclonal de même spécificité antigénique mais d'isotype IgG2c (Grzych et coll. 1982 et 1984).

2-Immunologie des bilharzioses humaines

La compréhension du comportement immunitaire des patients vivant en zone d'endémie est essentielle dans la conception d'une prophylaxie active. Là encore, la réponse immune de l'homme infecté revêt un caractère multifactoriel.

2-1 Réponse humorale

La phase aiguë est dominée par la présence d'anticorps dirigés contre le stade cercaire et la phase chronique, par des anticorps dirigés contre le stade adulte (Lunde et coll. 1979). Aucune corrélation n'a pu être établie entre le taux d'anticorps anti-adulte, et cela quelque soit l'isotype, et l'intensité de l'infection (Shaker et coll. 1987). La présence d'immunocomplexes influe sur l'activation de certaines populations cellulaires, tels les macrophages, et sur la modulation de la réponse lymphocytaire, notamment lors du développement des processus immunopathologiques (Santoro et coll. 1979).

2-2 Réponse cellulaire

La réactivité lymphocytaire contre les antigènes d'oeuf est optimale en phase aiguë alors que la phase chronique est caractérisée par une forte réponse contre les antigènes d'adulte (Gazzinelli et coll. 1983). Il ne semble pas exister de corrélation entre le niveau de sensibilisation des lymphocytes vis-à-vis des antigènes parasitaires et l'intensité de l'infection (Colley et coll. 1977).

2-3 Immunité à la réinfection

L'intensité des infestations est corrélée avec l'âge des patients et une immunité acquise se développe progressivement vers une immunité à la réinfection après traitement chimiothérapique (Butterworth et coll. 1985 et Wilkins et coll 1987). Cependant, des groupes d'enfants "résistants" (faible nombre d'oeufs dans les excréta) et "sensibles" à la réinfection après traitement par l'oxamniquine peuvent coexister.

2-4 Nature des composants humoraux de l'immunité

L'identification des mécanismes protecteurs chez l'homme est difficile. Toutefois, des analyses statistiques et épidémiologiques basées sur des données immunologiques ont permis d'extraire des corrélations positives et négatives entre certaines caractéristiques immunologiques et l'acquisition de la résistance.

2-4-1 Isotypes effecteurs

Les mécanismes effecteurs identifiés chez l'animal se retrouvent chez l'homme : l'IgE spécifique peut participer au phénomène de l'ADCC en présence de macrophages, de plaquettes et d'éosinophiles (Capron et coll. 1980) et les IgG1 et IgG3 en présence d'éosinophiles (Khalife et coll. 1989). Le taux sanguin d'éosinophiles semble significativement relié à l'état d'immunité des patients infectés par *S. mansoni* et *S. haematobium* (Sturrock et coll. 1983 et Hagan et coll. 1985). Récemment, Hagan et coll. (1991) ont démontré, dans une population humaine infectée par *S. haematobium* en Gambie, que l'acquisition de l'immunité à la réinfection est corrélée avec l'âge

et le développement d'une réponse IgE dirigée contre des antigènes du ver adulte. Des résultats similaires sont obtenus sur des populations Kenyannes (Dunne et coll. 1992) et Brésiliennes (Rihet et coll. 1991) infectées par *S. mansoni*. De plus, Dunne et coll. (1992) établissent une relation entre l'immunité à la réinfection et la reconnaissance d'un antigène de 22 kDa par les IgE sériques.

2-4-2 Isotypes bloquants

Khalife et coll. (1986) démontrent que des anticorps IgM dirigés contre une molécule de 38 kDa bloquent l'action cytocyde des anticorps effecteurs de type IgG dans un système d'ADCC en présence d'éosinophiles. De plus, une corrélation entre le taux d'IgM anti-38 kDa et l'intensité à la réinfection est établie chez une population humaine infectée par *S. mansoni*. Par la suite, Butterworth et coll. (1988a) démontrent que des anticorps IgM, IgG2 et IgG4 dirigés contre des déterminants glycaniques d'oeuf et de jeune larve bloquent les anticorps effecteurs de l'immunité chez des jeunes enfants bilharziens traités et redevenus sensibles à la réinfection. De même, Hagan et coll. (1991) corrélient la susceptibilité à l'infection et la présence d'anticorps bloquants IgG4. Dans notre laboratoire, Auriault et coll. (1990a) démontrent que le taux d'anticorps IgG4 dirigé contre les peptides 115-131 et 140-153 d'une glutathion-S-transférase de 28 kDa de *S. mansoni* est relié à l'absence d'immunité chez des enfants traités 5 semaines auparavant par le PZQ, suggérant le rôle bloquant potentiel de cet isotype.

2-4-3 Conclusion

L'acquisition de la résistance à la réinfection est un processus lent qui se prolonge jusqu'à l'adolescence. Elle est associée au développement d'une immunité faisant intervenir les IgE et est contre-balançée par l'action antagoniste des IgG4 et des IgM. Les fluctuations de l'équilibre IgE/IgG4 déterminent en partie les degrés de résistance.

Il semble donc, à la vue de ces résultats, que le développement de l'immunité chez l'homme s'explique par :

- l'apparition lente d'une réponse protectrice dirigée contre le stade larvaire (IgE, IgG1, IgG3 et IgA).
- la disparition parallèle des isotypes bloquants (IgM et IgG4)

3- Stratégies vaccinales contre les bilharzioses

La complexité des mécanismes de l'immunité chez l'homme et l'animal de laboratoire, amplifiée par la kyrielle de subterfuges mis en place par le parasite, tels le mimétisme moléculaire et l'induction d'une "paralysie immunologique", a contribué au fait que le vaccin anti-bilharzique (et anti-parasitaire en général) n'ait pas encore vu le jour à l'aube du troisième millénaire. Le principe de la vaccinologie est de protéger les individus sans déclencher de pathologie et de contrôler la transmission de la maladie.

En ce qui concerne la schistosomiase, le coefficient de morbidité des patients dépend en grande partie de l'intensité de l'infection (Chen et coll. 1988). Un vaccin même partiellement efficace dans l'infection préventive qui (1) réduirait la morbidité des populations, (2) limiterait les formes aiguës de la maladie et (3) contrôlerait sa transmission serait acceptable (Butterworth et coll. 1992). Le vaccin doit être composé d'antigène(s) protecteur(s) (recombinants de préférence) capable(s) de stimuler une réponse protectrice durable et appropriée (sans générer d'anticorps bloquants) réduisant le niveau de réinfection et idéalement la fécondité parasitaire.

Les modèles animaux sont indispensables à cette approche mais ils ne reflètent pas complètement l'immunité protectrice qui devrait naître de la vaccination chez l'homme. Plusieurs stratégies, rarement applicables chez l'homme mais utiles dans la compréhension des manifestations immunitaires et pathologiques de la vaccination, ont induit des protections partielles face à l'infection. Conséquence probable de la remarquable adaptation du schistosome à leurs hôtes, aucune méthode expérimentale de vaccination n'a démontré une totale efficacité en terme de charge parasitaire (100% de protection).

3-1 Infestation interspécifique

L'impossibilité pour certaines espèces de schistosome d'accomplir un cycle complet chez certains hôtes expérimentaux inappropriés a conduit à des succès de protection après infestation par des espèces hétérologues de schistosome. C'est ainsi qu'une primo-infestation par des cercaires de *S. bovis* protège le babouin contre une infestation par des cercaires de *S. mansoni* (Taylor et coll. 1975). La protection croisée entre schistosomes (et même entre trématodes) suggère donc

l'existence d'antigènes communs interspécifiques.

3-2 Larves atténuées

L'atténuation des larves (par agents chimiques, rayons X ou γ) a pour but d'empêcher la maturation complète du ver mais les doses doivent préserver la migration et le déclenchement d'une réponse immune. De nombreux exemples de protection par atténuation de cercaires ou de schistosomules existent dans la littérature (Minard et coll. 1978, Bickle et coll. 1979 et Taylor et coll. 1986).

3-3 Vaccins non-vivants

3-3-1 Extraits antigéniques brutes

Les préparations d'antigènes brutes correspondent à un stade particulier du développement du parasite. On distingue l'antigène d'adulte SWAP (Soluble Worm Antigen Preparation) et l'antigène d'oeuf SEA (Soluble Egg Antigen).

Les essais de protection avec l'antigène d'oeuf se sont soldés par des échecs dans les modèles du rat (Phillips et coll. 1978), de la souris (Harrison et coll. 1982) et du primate (Smithers et coll. 1967). Cependant, un effet anti-embryonnaire est mentionné après sensibilisation répétée par des oeufs immatures chez la souris (Garcia et coll. 1987).

Les résultats avec l'extrait antigénique total du ver adulte sont variables suivant le mode d'injection ou le type d'adjuvant utilisé (King et coll. 1988). L'un des protocoles les plus efficaces chez la souris est l'injection d'antigènes par voie intra-dermique en présence de BCG où une réduction de 50% de la charge vermineuse est obtenue (James et coll. 1990). Smithers et coll. (1989) rapportent que des extraits membranaires de vers adultes injectés par voie sous-cutanée en présence de saponine protègent de façon significative la souris. Flanigan et coll. (1989) obtiennent 25% de protection avec des extraits membranaires de schistosomule et 34% avec de l'extrait total de schistosomule sans utilisation d'adjuvant par voie sous-cutanée. James et coll. (1985) protègent la souris de façon significative à l'aide d'une préparation de schistosomules congelée-décongelée en présence de BCG.

3-3-2 Antigènes purifiés

Se basant sur l'importance du facteur humoral dans les mécanismes de défense de l'animal protégé (Capron et coll. 1987a), l'utilisation de sondes anticorps poly et monospécifiques a permis l'identification d'antigènes cibles.

Le transfert passif de sérums provenant d'animaux ou de patients infectés devenus résistants à la réinfection a permis l'identification de nombreuses cibles antigéniques de nature protéique et glycoprotéique. Cependant, le fait qu'un sérum (protecteur en transfert passif) reconnaisse majoritairement un antigène ne signifie pas forcément que celui-ci soit responsable de la résistance.

L'utilisation de sondes monoclonales d'isotypes sélectionnés a permis l'identification d'un certain nombre d'antigènes potentiellement protecteurs. Deux méthodes permettent l'évaluation de la qualité d'une sonde monoclonale : la capacité d'induire une cytotoxicité *in vitro* vis-à-vis des larves infestantes et de conférer une protection contre l'infection par transfert passif. Grâce à cette stratégie, des antigènes de schistosome protecteurs ont été identifiés :

- Deux antigènes de 53 et 155 kDa, purifiés à partir du ver adulte par chromatographie d'affinité à l'aide d'un anticorps monoclonal, protègent la souris de 21% et le macaque cynomolgus de 41% contre l'infection d'épreuve (Smith et coll. 1985).
- Un complexe antigénique de 200 kDa, formé de deux chaînes polypeptidiques de 30 et 45 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures, protège la souris de 17 à 30% selon le type d'adjuvant employé. L'anticorps monoclonal correspondant, transféré passivement, confère une protection de 40-80% (Hazdai et coll. 1985).
- Une glycoprotéine de 38 kDa, présente à la surface du schistosomule et partageant des épitopes communs avec l'hôte intermédiaire (*B. glabrata*, Dissous et coll. 1986) et l'hémocyanine (Keyhole Limpet Hemocyanin : KLH) d'un mollusque marin ancestral (*Megathura crenulata*) a été caractérisée dans notre laboratoire (Dissous et coll. 1986). L'immunisation par la KLH induit une protection de 50 à 75 % dans divers modèles expérimentaux (Grzych et coll. 1987). Un anticorps monoclonal IgG2a dirigé contre un déterminant glucidique de la 38 kDa, et doué d'un pouvoir cytotoxique *in vitro*, induit par transfert passif une protection équivalente (Grzych et coll. 1982). Par une stratégie originale développée dans notre laboratoire, la production d'anticorps anti-idiotypiques (mimant stériquement l'épitope glycanique de la 38 kDa) a permis l'obtention d'un effet protecteur chez la souris (Grzych et coll. 1985).

- Les produits d'excrétion-sécrétion du schistosomule cultivé *in vitro* (SRP : Schistosomula Released Product, Auriault et coll. 1984) permettent, par injection chez le rat et sans adjuvant, l'obtention d'une réduction de la charge parasitaire de 60 à 70% (Damonville et coll. 1986a). De plus, les sérums anti-SRP transfèrent une protection ; propriété abolie après élimination sélective des IgE. Les sérums des rats protégés reconnaissent majoritairement en IgE deux molécules de 22 et 26 kDa (Damonville et coll. 1986b). Le transfert de lignées cellulaires T anti-26kDa potentialisent une réponse IgE et participent à l'immunité protectrice (Damonville et coll. 1987). Verwaerde et coll. (1987) démontrent ensuite que le transfert passif d'un anticorps monoclonal (le B48-14) dirigé contre la molécule de 26 kDa (SRP26) protège le rat contre l'infection. Le transfert passif de l'anticorps anti-idiotypique de troisième génération (Ac3, Velge et coll. 1989) ainsi que le transfert d'une lignée cellulaire T anti-Ac 2 (Velge et coll. 1991) aboutissent aux mêmes effets protecteurs.
- Une fraction moléculaire de 28 kDa isolée à partir du ver adulte par électroélution induit chez le rat Fischer et la souris BALB/c une protection significative (Balloul et coll. 1987a).
- Un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine de *S. mansoni* de 28 kDa à activité triose phosphate isomérase (TPI) entraîne par transfert passif une protection de 38% chez la souris (Harn et coll. 1987).
- Une protéine de 97 kDa isolée du ver adulte par chromatographie d'affinité et identifiée comme étant une paramyosine (protéine myofibrillaire d'invertébré dont les séquences sont hautement conservées), injectée en présence de BCG confère une protection de 26-33% chez la souris (Pearce et coll. 1988). La paramyosine, électroéluee à partir d'un gel de polyacrylamide sur lequel les antigènes totaux du ver adulte sont préalablement fractionnés, est injectée sans adjuvant par voie sous-cutanée chez la souris. Le taux moyen de protection avec cette préparation antigénique varie entre 24 et 53% et s'élève à 52% en présence de BCG (Flanigan et coll. 1989).
- Une glycoprotéine de 68 kDa, purifiée à partir du ver adulte à l'aide d'un anticorps monoclonal, protège la souris infectée de 30 à 66% par voie sous-cutanée et sans adjuvant (King et coll. 1988).
- Une fraction antigénique de schistosomule de 68-70 kDa purifiée par électroélution d'un gel de polyacrylamide protège la souris de 48% sans emploi d'adjuvant en voie sous-cutanée (Flanigan et coll. 1989).

3-3-3 Molécules clonées

L'impossibilité ou la difficulté de produire en grande quantité par les voies du génie génétique les déterminants antigéniques de nature oligosaccharidique a orienté les recherches vers l'identification et le clonage moléculaire d'antigènes protéiques dont le Tableau 1 dresse la liste à ce jour.

Nous remarquerons que la majorité des antigènes, dont les séquences nucléotidiques sont déterminées, sont des enzymes impliquées dans la détoxification ou le métabolisme ou sont des protéines de structure.

Il est à noter que la majorité de ces molécules possèdent des degrés d'homologie élevés avec les protéines de l'hôte. Leur utilisation dans une préparation vaccinale s'en trouve donc largement compromise.

Parmi ces antigènes clonés, seuls l'hémoglobine et l'élastase ont été proposés à des fins diagnostiques (Klinkert et coll. 1989). De la même manière, nous soulignerons le faible nombre de molécules recombinantes dont les propriétés vaccinales ont été clairement démontrées (Bergquist et coll. 1990) :

- La triose-phosphate isomérase (enzyme glycolytique qui présente 60% d'identité avec la TPI humaine) semble protéger la souris mais aucune critère de protection n'est mentionné dans l'article de Shoemaker et coll. (1992).
- L'expression de la moitié du gène codant pour la paramyosine de *S. mansoni* puis l'immunisation du polypeptide correspondant par voie intra-dermique, entraîne une réduction de la charge parasitaire de 26 à 33% chez la souris C57BL/6J (Pearce et coll. 1988).
- L'immunocriblage d'une banque d'expression de *S. japonicum* à l'aide de sérum provenant d'une souche de souris naturellement résistante à l'infection (Mitchell et coll. 1985), a permis de cloner et séquencer le gène codant pour une molécule de 26 kDa. Cet antigène fait partie de la famille enzymatique des glutathion-S-transférases (Sj26GST, Smith et coll. 1986). L'injection de cette protéine, exprimée en fusion avec la β -galactosidase (Smith et coll. 1988), en présence d'adjuvant complet de Freund (ACF) par voie sous-cutanée, protège la souris BALB/c de 25% (Smith et coll. 1986 et Mitchell et coll. 1988). Il semble que les résultats de protection avec la protéine recombinante complète soit variable suivant la souche de souris utilisée (0-40%) et que la réponse soit soumise à une restriction génétique très stricte (Davern et coll. 1987 et Mitchell et coll. 1990).

<u>Protéines</u>	<u>PM (en kDa)</u>	<u>Références</u>
Glutathion-S-transférase	28	Balloul et coll. (1987b)
	28*	Henkle et coll. (1990)
	28**	Trottein et coll. (1992b)
	28***	Trottein et coll. (1992b)
Glutathion-S-transférase	26*	Smith et coll. (1986)
	26	Trottein et coll. (1990)
	26	Wright et coll. (1991)
	18	Williams et coll. (1992)
Glutathion peroxydase	16	Simurda et coll. (1988)
Superoxyde dismutase	16	Cordeiro et coll. (1992)
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase	26	Craig et coll. (1988)
Glycéraldehyde-3P-dehydrogénase	37	Goudot et coll. (1989)
Phosphoglycéromutase	28	Balloul (Comm. pers)
HMG-CoA réductase	107	Rajkovic et coll. (1989)
ATP-guanidino kinase	74	Stein et coll. (1990)
Phospholipase A2	16*	Rogers et coll. (1991)
Triose phosphate isomérase	28	Shoemaker et coll. (1992)
Adénylate kinase	22	Cao et coll. (1992)
Hémoglobine	32	Davis et coll. (1987)
Elastase	31	Newport et coll. (1988)
Cathepsine B	31	Klinkert et coll. (1989)
Calpaïne	86	Andresen et coll. (1991)
Calpaïne	75	Karcz et coll. (1991)
Myosine	200	Newport et coll. (1987)
Paramyosine	97	Pearce et coll. (1988)
Tropomyosine	40	Xu et coll. (1989)
α -tubuline-1	52	Duvaut-Miret et coll. (1991)
α -tubuline-2	52	Webster et coll. (1992)
Protéine de coquille de l'oeuf	28	Koster et coll. (1988)
	14	Bobek et coll. (1988)
	14**	Bobek et coll. (1989)
	14*	Bobek et coll. (1991)
	48	Chen et coll. (1992)
	16*	Scallon et coll. (1989)
Protéine de miracidium	11,5	Ram et coll. (1989)
Protéine fixant le calcium	20	Havercroft et coll. (1990)
Calmoduline	16	Moser et coll. (1992)
Calmoduline	43	Khalife et coll. (1992)
Protéine fixant les acides gras	14	Moser et coll. (1991)
Protéine de choc thermique	40	Nene et coll. (1986)
	70	Hedstrom et coll. (1988)
	86	Johnson et coll. (1989)
	23	Stein et coll. (1986)
Protéine de surface du schistosomule	18	Dalton et coll. (1987)
	50	Havercroft et coll. (1988)
	23	Wright et coll. (1990)
	23*	Davern et coll. (1991)
Protéine du surface du ver adulte	25	Knight et coll. (1989)
	22	Jeffs et coll. (1991)

Tableau 1 . Représentation des molécules de schistosome dont les ADNc correspondants sont clonés

S. mansoni, *S. japonicum**, *S. haematobium*** et *S. bovis****.

- Par une approche différente, un antigène de 28 kDa à activité glutathion-S-transférase a été caractérisé dans notre laboratoire chez *S. mansoni* (Sm28GST). La protéine exprimée sous forme fusionnée confère une diminution de la charge parasitaire de 60% chez le rat et de 45% chez la souris (Balloul et coll. 1987b).

Suite à ces travaux et à l'intérêt potentiel des GSTs dans une stratégie vaccinale contre les schistosomiasés, nous allons aborder l'histoire de la Sm28GST et faire quelques rappels généraux sur les GSTs.

LA Sm28GST

1- Identification

La stratégie d'approche, basée sur le concept de l'immunité concomitante, consistait à caractériser un antigène présent non seulement au stade adulte mais également à la surface du schistosomule. A partir d'un extrait total de ver adulte, une dizaine d'antigènes de masse moléculaire comprise entre 28 et 90 kDa furent fractionnés sur gel de polyacrylamide, purifiés par électroélution puis injectés chez des rats. Les antisérums polyclonaux monospécifiques correspondants furent testés en immunoprécipitation contre :

- le produit de marquage métabolique du ver adulte.
- le produit de marquage de surface du schistosomule.
- le produit de traduction du ver adulte et du schistosomule.

Seul un antisérum fut capable d'immunoprécipiter, à partir des quatre catégories antigéniques précédemment citées, une molécule en l'occurrence de même masse moléculaire : 28 kDa. De plus, ce sérum, dirigé contre la fraction moléculaire migrant à 28 kDa (P28), induisait une cytotoxicité élevée en présence d'éosinophiles (Balloul et coll. 1985). Outre la nature holoprotéique de cet antigène, l'intérêt porté à la P28 résidait dans le fait qu'elle était présente aux deux stades évolutifs du schistosome : l'adulte et la larve.

2- Mise en évidence du pouvoir protecteur

L'immunisation avec la molécule native (purifiée à partir de l'extrait antigénique total du parasite) et suivant un protocole de double injection conduisit à des degrés de protection hautement significatifs : 70% chez le rat et 45% chez la souris (Balloul et coll. 1987a). Une stratégie de clonage moléculaire fut alors initiée en collaboration avec la société Transgène à Strasbourg et aboutit à la caractérisation de la séquence complète de la P28 (Balloul et coll. 1987b). La copie quasi complète (contenant les 172 acides aminés de la partie C-terminale) fut exprimée en fusion avec le promoteur CII du phage lambda et reproduisit les niveaux de protection initialement observés : 67% chez le rat et 52% chez le hamster (Balloul et coll. 1987b). La comparaison de la séquence en acides aminés de la P28 (211 aa) a démontré des homologies avec la famille des glutathion-S-transférases, enzymes répandues dans le règne animal et végétal et essentielles au

métabolisme cellulaire (Taylor et coll. 1988). L'ADNc complet de la Sm28GST (ainsi baptisée) fut sous-cloné et exprimé dans *E. coli*, *S. cerevisiae* (Loison et coll. 1989) et dans le virus de la vaccine. L'immunisation avec la protéine complète exprimée dans *E. coli* (la Sm28GST recombinante, Sm28GSTr), pure à 95%, permet l'obtention d'une protection significative chez le babouin pouvant atteindre 80%. Cependant d'importantes variations individuelles sont notées et une moyenne de 40% de réduction de la charge parasitaire est enregistrée dans ce modèle primate (Balloul et coll. 1987c et Boulanger et coll. 1991a). Toutefois, même chez les animaux peu protégés, un effet sur la diminution de la taille des granulomes périovulaires hépatiques et sur l'excrétion fécale est observé (Boulanger et coll. 1991a). De même, le singe *patas patas* immunisé par la Sm28GSTr puis infesté par des cercaires de *S. haematobium* développe une diminution marquée des lésions vésicales (Boulanger et coll. 1991b).

3- Effet de l'immunisation sur la ponte

Chez la souris, l'immunisation par la Sm28GSTr affecte la ponte des vers femelles et la viabilité des oeufs (Boulanger et coll. 1991a). Les mécanismes effecteurs sous-tendant les effets de l'immunisation sur la fécondité des vers semblent jouer un rôle très significatif. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore connus, des études *in vitro* apportent l'indication d'une activité neutralisante des anticorps IgA dans ce mécanisme. En effet, des anticorps humains IgA spécifiques inhibent la ponte et la viabilité des oeufs *in vitro*, le peptide de synthèse correspondant à la région C-terminale de la Sm28GST étant capable de bloquer cet effet inhibiteur (Grezel et coll. 1992). De plus, Grzych et coll. (1992) associent le taux d'IgA spécifique de la Sm28GST (et de divers peptides de synthèse qui en sont dérivés), leur activité neutralisante de l'activité enzymatique et l'acquisition de l'immunité protectrice chez une population résidant en zone d'endémie. Des expériences préliminaires montrent que le transfert passif chez la souris d'un anticorps monoclonal d'isotype IgA, spécifique de la Sm28GST, inhibe la ponte des vers femelles (Grezel et coll. 1992). Ce résultat confirme les prédictions initiales de l'importance de l'isotype IgA dans ces phénomènes.

4- Effet synergique de la chimiothérapie et de l'immunisation

L'injection de la Sm28GSTr chez la souris en présence d'hydroxyde d'aluminium (alun) suivie d'un traitement par des doses sub-optimales de PZQ conduit à la fois à une augmentation de la résistance à la réinfection et à une très nette diminution du nombre de granulomes hépatiques et de la viabilité des oeufs (Grezel et coll. 1990).

5- Identification des épitopes majeurs

L'intérêt vaccinal de la Sm28GST a justifié la mise en place d'un vaste programme de caractérisation des épitopes protecteurs de la molécule.

5-1 Chez le rat

Le transfert passif de lymphocytes Th spécifiques de la Sm28GST, provenant de rats immunisés par la protéine native, le jour de l'infestation, induit chez le rat receveur une protection comprise entre 45 et 85%. Une réponse humorale anti-Sm28GST précoce est également observée (Auriault et coll. 1987) ce qui laissait présager l'existence d'épitopes T impliqués dans les mécanismes de résistance et notamment anticorps dépendants.

Une analyse informatisée de la séquence protéique, suivant des critères d'hydrophobicité, d'accessibilité et de mobilité, a permis de prédire trois régions épitopiques particulières : 24-43, 115-131 et le 140-153. Les peptides correspondants ont été synthétisés et ont permis de démontrer l'épitopie B majeure de ces régions chez le rat et chez l'homme infectés. De plus, le 24-43 est capable de restimuler *in vitro* des lymphocytes T prélevés chez le rat infecté et (avec le 140-153) des cellules ganglionnaires de rat immunisé par la Sm28GSTr (Auriault et coll. 1988). Il semble que la région 24-43 contienne deux épitopes T. Le transfert passif de lignées Th spécifiques du 24-43 chez le rat immunisé par le Sm28GSTr augmente la production d'IgE sans affecter le taux d'IgG. Il apparaît que le 24-43 intervienne dans le développement de populations lymphocytaires T impliquées dans la production d'IgE par le biais de la production de lymphokines (IL4 et d'IL5, Auriault et coll. 1988).

Le peptide 115-131 constitue un épitope T et B majeur chez le rat infecté ou immunisé par la Sm28GST (Auriault et coll. 1988).

5-2 Chez la souris

Dans ce modèle, la composante humorale ne joue pas un rôle majeur dans l'immunité et le transfert passif d'anticorps anti-Sm28GST ne confère aucune protection chez la souris (Wolowczuk et coll. 1989). L'identification des épitopes T de la Sm28GST dans le modèle murin était donc indispensable. Des lymphocytes de souris immunisées par la Sm28GST sont restimulés en présence d'antigène de ver adulte et de schistosomule (Wolowczuk et coll. 1989).

Le transfert passif de cellules T totales (T helper, T à fonctions suppressives et cytotoxiques) ne protège pas la souris mais provoque une forte réponse IgG spécifique. Par contre, le transfert passif de Th spécifiques conduit à une protection de 50%. Il est probable que ces cellules transférées soient en mesure de produire des lymphokines capables d'activer les plaquettes et les macrophages normaux et de les rendre cytotoxiques pour le schistosomule.

Les lymphocytes prélevés sur la souris immunisée par la Sm28GST répondent à une stimulation par les trois peptides précédemment décrits et particulièrement par le 24-43. Inversement, des lignées spécifiques du 24-43 peuvent être restimulées par la Sm28GST ou de l'extrait total de ver adulte.

Des lymphocytes provenant de souris infectées répondent aux 24-43 et au 115-131 (Wolowczuk et coll. 1990).

5-3 Chez l'homme

Les lymphocytes périphériques d'enfants bilharziens vivant en zones d'endémie (avant ou après traitement) sont restimulés par la Sm28GST chez 77% d'entre eux. La reconnaissance des peptides est variable en fréquence et en intensité, le meilleur étant le peptide situé en position C-terminale de la molécule : le 190-211 (Wolowczuk et coll. 1992).

5-4 Construction peptidique

Le fait que la région 115-131 soit un épitope auxiliaire T majeur impliqué dans la réponse IgE et

soit commun au rat, à la souris et à l'homme, a entraîné la construction d'un octomère ou octopus : 8 copies du peptide 115-131 branchées sur un coeur de polylysine. L'immunisation par cette construction originale entraîne une réduction de la charge parasitaire de 40 à 50% chez le rat et confirme ainsi le rôle essentiel de cet épitope dans la protection (Wolowczuk et coll. 1991a).

6- Utilisation d'anticorps monoclonaux

Le transfert passif de deux anticorps monoclonaux (AcM : S13 et H12), d'isotype IgM, dirigés contre la Sm28GST, protège le rat Fischer de 60% contre l'infection d'épreuve. Le transfert passif chez la souris BALB/c de l'un des deux AcM (le S13), capable d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST *in vitro*, réduit la ponte des vers femelles et la viabilité des oeufs. *In vitro*, le S13 conduit aux mêmes observations sur des couples de vers en culture. Par contre et de façon remarquable, le deuxième AcM (le H12), qui n'inhibe pas l'activité enzymatique de la Sm28GST, n'a aucun effet anti-fécondité *in vivo* et *in vitro* (Xu et coll. 1991). Des expériences de compétition ont montré que le peptide C-terminal (190-211) pouvaient complètement bloquer l'effet inhibiteur qu'exerce l'AcM S13. Enfin, l'immunisation par les peptides 10-24 et 190-211 ou le transfert passif de sérums dirigés contre ces deux peptides conduit à une réduction marquée de la ponte et de la capacité d'éclosion des oeufs (Xu et coll. 1992).

7- Conclusion

Sur la base de ces informations, il apparaît que l'immunisation par la Sm28GST génère deux mécanismes effecteurs différents, indépendants et complémentaires conduisant à :

- Un effet sur la réduction de la charge parasitaire liée à l'isotype IgE et qui ne semble pas dépendre de l'activité enzymatique de la Sm28GST.
- Un effet sur la fécondité des vers femelles et sur la viabilité des oeufs qui semble faire intervenir le site enzymatique de l'enzyme et l'isotype IgA.

Les conséquences directes de ces observations sont évidentes : effet préventif contre l'infection et effet sur la pathologie et la transmission de la maladie. Comme nous le verrons dans la partie Résultats, la pertinence de ces observations a été confirmée de façon récente dans le modèle de la

bilharziose du bétail due à *S. bovis*.

8- Optimisation des protocoles d'immunisation

Les modalités d'administration et la présentation de l'antigène doivent être optimales et vont dépendre du type de réponse immunitaire souhaitée.

L'immunisation par la Sm28GSTr exprimée en *E. coli* ou en *S. cerevisiae*, en injection unique et en présence de BCG (protocole idéal en zone d'endémie car il permettrait l'association avec la vaccination anti-tuberculeuse) ou en présence d'alun, conduit à une protection significative contre l'infection d'épreuve chez le rat (Grezel et coll. 1992).

Un accent particulier a été donné aux protocoles d'immunisation favorisant l'apparition de l'isotype IgA, à la fois sérique et sécrétoire. Pour cela, divers vecteurs vivants sont employés et des projets visant à sous-cloner le gène codant pour la Sm28GST (ou une partie du gène) sont menés dans :

- le gène de structure de l'hémagglutinine filamenteuse d'une souche atténuée de *B. pertussis*, afin d'étudier la réponse IgA après administration intranasale du vecteur vivant (Renauld. G communication personnelle).
- le gène de la sous-unité α de la toxine cholérique. L'administration par voie orale permettrait une présentation optimale aux cellules M de l'intestin. Une autre voie d'approche consisterait à coupler chimiquement un épitope particulier de la Sm28GST à la sous-unité β de la toxine cholérique.
- le gène de la flagelline d'une souche atténuée de Salmonelle (*S. flagellin*). La région correspondant au 115-131 pourrait être sous-clonée de façon sélective dans ce gène.

Enfin des immunostimulants favorisant l'isotype IgA sont en cours d'expérimentation et particulièrement le Muramyldipeptide ou MDP (Riveau. G, communication personnelle).

Parallèlement, d'autres vecteurs vivants, d'autres types d'adjuvants ou d'autres voies d'administration sont actuellement à l'étude parmi lesquelles nous citerons : le BCG atténué et transformé, les microsphères de polymère (libération programmée dans l'intestin), les liposomes et les constructions peptidiques.

9- Les GSTs de *Fasciola hepatica*

L'intérêt porté aux GSTs dans le modèle de la schistosomiase a été récemment étendu à une autre helminthiase : la maladie provoquée par l'agent de la douve du foie ou *F. hepatica*.

L'immunisation de moutons par les GSTs purifiées du parasite (FhGSTs : deux composants moléculaires de 26 et 26.5 kDa), en présence d'ACF, entraîne une diminution de la pathologie hépatique et une réduction de la charge parasitaire de 57%. Ces effets sont accompagnés d'un retard dans l'établissement des vers au niveau des conduits biliaires par rapport aux témoins non-immunisés. Parallèlement, une réduction de l'émission des oeufs est notée mais de grandes variations individuelles ont empêché cette donnée d'être significative (Sexton et coll. 1990). Une seconde expérience aboutit à une protection variant entre 15 à 44% suivant le protocole d'immunisation utilisé (Spithill et coll. 1992). Les ADNc correspondants aux FhGSTs ont été isolés, séquencés et sous-clonés dans des vecteurs d'expression (Panaccio et coll. 1992). Le pouvoir protecteur des protéines recombinantes correspondantes est actuellement testé à grande échelle sur des ovins et bovins (Sexton. J, communication personnelle).

Avant d'aborder la partie Résultats de notre mémoire, il nous a semblé indispensable d'approfondir nos connaissances sur cette famille enzymatique complexe et raffinée que constituent les GSTs et de tenter d'appréhender le rôle joué par ces enzymes dans la physiologie du schistosome.

LES GLUTATHION-S-TRANSFERASES

1- Chez les Vertébrés

D'un intérêt considérable dans les domaines de la Pharmacologie, de la Toxicologie et de l'Oncologie, les GSTs (EC 2. 5. 1.18) ont été particulièrement étudiées chez les mammifères. Enzymes ubiquitaires et multifonctionnelles, les GSTs sont impliquées dans des mécanismes de détoxification et de transport de molécules lipophiles (Mannervik et coll. 1985a). Elles catalysent l'attaque nucléophile du glutathion (GSH : γ -Glu-Cys-Gly) sur une large gamme de composés hydrophobes renfermant un centre électrophile. Ceux-ci peuvent être des substrats exogènes ou endogènes résultant du métabolisme oxydatif et possèdent généralement une fonction de type : époxide, hydroperoxyde, thiocyanate, ester, alkène, alkènal, lactone...(Danielson et coll. 1985). La conjugaison du GSH diminue la réactivité et augmente l'hydrophilie de ces molécules toxiques, favorisant ainsi leur solubilisation et leur excrétion sous forme inactivée (Boyland et coll. 1969).

A côté du rôle essentiel de ces enzymes dans la protection des tissus face aux dommages oxydatifs, les GSTs peuvent parfois participer à la synthèse de molécules physiologiquement actives (prostaglandines, leucotriène C4...) et jouer un rôle dans le transport et le stockage intracellulaire de molécules lipophiles (Ketterer et coll. 1988b).

Deux catégories distinctes, non apparentées d'un point de vue génétique, peuvent être séparées : Les GSTs microsomaux et les GSTs cytosoliques.

1-1 Les GSTs microsomaux

Les GSTs microsomaux doivent être trimériques pour être actives (sous-unités de 18 kDa). Elles sont essentiellement localisées dans le foie (1% des protéines totales) et dans les muqueuses intestinales (Morgenstern et coll. 1988). Un rôle détoxifiant, assurant la fonctionnalité des protéines enzymatiques membranaires, est suspecté pour cette famille particulière de GST (Morgenstern et coll. 1983). Au niveau cellulaire, elles sont principalement présentes dans le compartiment du réticulum endoplasmique et dans la membrane externe des mitochondries, qui constituent des sites d'accumulation pour les xénobiotiques et les produits des peroxydations membranaires associées aux transports d'électrons. Malgré des différences de spécificité de substrats, d'inductibilité et de séquence en acides aminés, ces enzymes ont des activités

enzymatiques proches des GSTs cytosoliques, y compris l'activité glutathion peroxydasique (Reddy et coll. 1981).

1-2 Les GSTs cytosoliques

Les GSTs cytosoliques ont été particulièrement étudiées chez le rat et une dizaine de sous-unités (s.u) de masse moléculaire variant entre 23 et 26 kDa ont été caractérisées. La classification est basée suivant la masse moléculaire, le point isoélectrique, les propriétés enzymatiques, les spécificités de substrat et les séquences primaires en acides aminés. Quatre familles multigéniques sont ainsi répertoriées chez les mammifères (Mannervik et coll. 1985b, Meyer et coll. 1991) :

- famille α : chez le rat : s.u 1 (Ya), s.u 2 (Yc), s.u 8 (Yk) et s.u 10 (Yl)
 chez l'homme : GST α - ϵ et chez la souris : GST M

- famille μ : chez le rat : s.u 3 (Yb1), s.u 4 (Yb2), s.u 6 (Yn1 ou Yb3), s.u 9
 (Yn2) et s.u 11 (Yo)
 chez l'homme GST μ et chez la souris GST MIII .

- famille π : chez le rat : s.u 7 (Yf ou Yp)
 chez l'homme GST π et chez la souris GST MII.

- famille θ : chez le rat : s.u 5 et 12 (classification Y non déterminée)
 chez l'homme : GST θ

Cette dernière famille de GST est minoritaire (0.01% des protéines totales solubles du foie) et présente des particularités : elle ne peut pas être purifiée par les techniques classiques de chromatographie d'affinité sur matrice de GSH et elle ne présente pas d'activité enzymatique vis-à-vis du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, qui est le substrat commun des GSTs (sauf s.u 5 et 9).

A l'intérieur d'une même famille, les homologies de séquence entre les différentes s.u varient de 65 à 95% et il n'est pas rare de rencontrer des isoenzymes au sein d'une même s.u. (Ahmad et coll. 1990). L'homologie de séquence entre des s.u de deux familles différentes n'excède jamais 32% et

les hétérodimères issus de deux familles différentes n'existent pas (Pickett et coll. 1988). Aucune modification post-traductionnelle de type glycosylation n'a été décrite pour les GSTs. Cependant, des phosphorylations sélectives pourraient participer à la régulation de l'activité GST dans le cytosol (Pyerin et coll. 1987).

Les GSTs représentent des familles mutagéniques dont la taille des gènes est variable (3 à 10 Kilobases et présence de 3 à 7 introns). La conversion génique pourrait jouer un rôle dans l'évolution des GSTs (Pickett et coll. 1988).

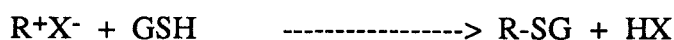
1-2-1 Fonctions

D'un point de vue chimique, les GSTs catalysent trois types de réaction :

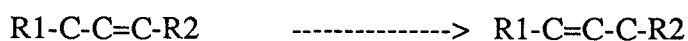
- réduction de fonction hydroperoxyde en fonction alcool (OH peut être remplacé par NO₂)



- conjugaison du GSH



- isomérisation par déplacement d'une double liaison



1-2-1-1 Détoxification des Xénobiotiques

Dérivés de l'industrie chimique (chlorure de vinyl, pesticide, herbicide, amine aromatique), pharmaceutique (paracétamol, misonidazole), de l'environnement (nitropyréne, benzo[a]pyréne) et de produits naturels (aflatoxine, produits d'oxydation lipidique), certains xénobiotiques sont mutagéniques et carcinogéniques. Le transfert du groupe GSH augmente l'hydrophilie du xénobiotique et favorise ainsi son excrétion dans la bile sous forme conjuguée ou dans les urines sous forme catabolisée.

1-2-1-2 Détoxification des produits endogènes

1-2-1-2-1 Par l'activité glutathion peroxydase

Les peroxydations lipidiques des membranes biologiques, initiées par les radicaux oxydants, forment des composés réactifs de type hydroperoxyde (lipidique et nucléique). Pour les phosphatides membranaires, les hydroperoxydes d'acides gras (hydroperoxyde de l'acide arachidonique et linoléique en particulier) sont libérés du squelette glycéryl-ester par une phospholipase et sont réduits en hydroxydes d'acides gras grâce à l'action de certaines GSTs possédant une activité glutathion peroxydase sélénium indépendante (GSH-px Se ind). Chez les mammifères, cette activité est essentiellement attribuée à la famille α et en partie à la famille π (Ketterer et coll. 1988b).

Les hydroperoxydes dérivés des bases nucléiques représentent également des substrats pour les GSTs à fonction GSHpx et expliquerait la mise en évidence d'une localisation nucléaire pour certaines d'entre elles. Certains auteurs pensent que les GSTs pourraient intervenir dans la cascade des réactions enzymatiques impliquées dans la réparation de l'ADN (Ketterer et coll. 1987).

1-2-1-2-2 Par l'activité glutathion-S-transférase

Produits secondaires des peroxydations lipidiques, certains composés possédant des fonctions de type alkène, époxyde et aldéhyde (hydroxyalkénal) sont de puissants agents cytotoxiques et génotoxiques (Esterbauer et coll. 1982). En effet, si l'activité GSHpx ne s'exerce pas, la décomposition des hydroperoxydes d'acides gras insaturés forment des dérivés hydroxyalkénals qui peuvent être éliminés par cyclisation via la conjugaison au GSH (Danielson et coll. 1987). De plus, le 4-hydroxyalkénal, dérivé extrêmement toxique et mutagénique, constitue un excellent substrat pour les GSTs et en particulier pour les s.u 8 et 4 (Alin et coll. 1985, Meyer et coll. 1989). L'oxyde de cholestérol, agent mutagénique puissant, représente également un produit des lipopéroxydations et peut être excrété grâce à sa liaison au GSH.

Il semble donc que les dommages lipidiques dûs aux radicaux oxydants puissent être inhibés par la double intervention des GSTs dont l'une est de type GSH-px (Burk et coll. 1978).

1-2-1-2-3 Par le transport

Parallèlement à leurs activités catalytiques, les GSTs peuvent adsorber de façon réversible et peu spécifique, une grande variété de ligands lipophiles (bilirubine, hydrocarbures aromatiques, stéroïdes, hormones stéroïdiennes, hèmes, antibiotiques, sels biliaires...) par l'intermédiaire ou non du site actif ("ligandin site", Bhargava et coll. 1978). Cette fonction est principalement exprimée dans le foie et participe, au côté des cytochromes P-450, à l'excrétion des produits toxiques hydrophobes endogènes et exogènes.

1-2-1-3 Synthèse

La liaison du GSH n'aboutit pas forcément à l'excrétion du produit transformé. En effet, certains électrophiles endogènes peuvent, par fixation au GSH, devenir des substances physiologiquement actives. A titre d'exemple, l'oxydation de l'acide arachidonique par une lipoxygénase conduit à un intermédiaire leucotriène A₄ qui possède une fonction époxyde. Par liaison au GSH, via l'activité enzymatique d'une GST de type μ , le leucotriène C₄ est formé : hormone paracrine intervenant dans des processus d'inflammation (Soderstrom et coll. 1985). Les GSTs à activité GSH-px peuvent également intervenir dans la synthèse des prostaglandines D₂ (Meyer et coll. 1987)

1-2-2 Mécanisme enzymatique

Les GSTs ont des structures dimériques indispensables à l'expression de leurs activités enzymatiques (homo ou hétérodimère dont les s.u sont issues d'une même famille). Il semble que les deux sites actifs du dimère agissent de façon indépendante d'un point de vue cinétique (Danielson et coll. 1985). Les GSTs sont très sensibles aux inhibiteurs chimiques endogènes (bilirubine, hématine, acides gras insaturés) ou exogènes et il est probable que chaque s.u héberge plus d'un site pour les composés électrophiles hydrophobes (inhibition compétitive ou non compétitive, Meyer et col. 1987).

Les GSTs sont considérées comme étant de faibles catalyseurs mais ce désavantage est comblé par leur large spécificité de substrats. L'un des points communs des GSTs est leur capacité à fixer,

avec une grande affinité et spécificité, le GSH sous forme réduite. Malgré l'élucidation récente, mais encore incomplète de la structure tridimensionnelle d'une GST de classe π (Reinemer et coll. 1991), la structure spatiale des GSTs est encore inconnue. Il est probable que les différentes familles de GST partagent des motifs communs.

L'élucidation des acides aminés (aa) impliqués dans le site actif émane de travaux qui visent à bloquer l'activité enzymatique par modifications chimiques spécifiques d'aa, par mutagenèse dirigée (Zhang et coll. 1991) et par utilisation d'analogues structuraux du GSH (Adang et coll. 1990). C'est ainsi qu'une Arginine (Shasteen et coll. 1983) et qu'une Histidine (Awasthi et coll. 1987) pourraient participer à la reconnaissance du GSH par l'enzyme. Le noyau imidazole de l'Histidine favoriserait l'ionisation du GSH en ion thiolate. Il est probable que d'autres aa puissent polariser le centre électrophile du composé hydrophobe si celui-ci est dans une orientation favorable. Le site de fixation du substrat électrophile est de nature hydrophobe (site H) et doit être disposé de façon adjacente au site de fixation du GSH (site G, Jakoby et coll. 1980). D'autre part, il est possible que la structure dimérique des GSTs crée, grâce à la juxtaposition des s.u, un site important participant à la catalyse.

1-2-3 Localisation et expression tissulaire

Chez les mammifères, la plupart des tissus hébergent des GSTs à une concentration de 0.05 à 0.2 mM. Cependant, l'expression étant tissu-spécifique, la répartition des différentes familles est hétérogène suivant les organes (Tu et coll. 1983). Chez le rat : foie (s.u 4, 3, 2, 1 et 8), rein (s.u 1, 2, 7 et 8), poumon (s.u 8 et 2), globules rouges (s.u 8), intestin (s.u 7), glandes mammaires (s.u 2), cerveau (s.u 3 et 11), testicules (s.u 6 et 11). Il faut cependant se garder de généraliser car, d'une espèce à une autre, des différences majeures d'expression peuvent exister au sein d'un même organe. Cette observation a également été vérifiée lors d'une étude comparative chez des sujets humains et pourrait expliquer les différences de susceptibilité individuelle vis-à-vis des drogues et des toxines. C'est ainsi que Seidergard et coll. (1987) ont associé la prévalence du cancer du poumon à l'inexpression du gène GST μ au niveau pulmonaire chez l'homme. Les mécanismes d'action des éléments régulateurs de type Cis et Trans dans l'expression des GSTs suivant les tissus sont en cours d'étude par des techniques de transfection.

1-2-4 Régulation de l'expression génique des GSTs

De façon expérimentale, l'expression des GSTs peut être induite par certains xénobiotiques (phénobarbital, méthylcholanthrène) ou hormones (l'interféron γ pour la s.u 7). Les régions du génome responsables de l'inductibilité de l'expression se situent dans la partie 5' flanquante à environ 1000 paires de base (pb) du codon d'initiation de la traduction (Telakowski-Hopkins et coll. 1988). Les mécanismes responsables de l'activation transcriptionnelle ne sont pas connus mais il est possible que le complexe récepteur-ligand se fixe sur la région régulatrice comme cela a été démontré pour les cytochromes P-450 (Fujisawa-Sehara et coll. 1988).

Des variations importantes de synthèse ont été constatées lors de cancérogenèse au niveau de la famille π (Suguoka et coll. 1985, Rushmore et coll. 1988) et de résistance aux drogues de cellules cancéreuses (Cowan et coll. 1986, Leyland-Jones et coll. 1991). Bien que les phénomènes de chimiorésistance soient associés à la surexpression de certaines familles ou s.u de GSTs (synthèse multipliée d'un facteur 10 à 50), la signification biologique de ces mécanismes reste encore obscure (Pickett et coll. 1989).

2- Chez les non-vertébrés

2-1 Généralités

Chez les végétaux et les invertébrés, la surexpression des GSTs a été associée à certaines formes de résistance aux herbicides et aux pesticides (Openoorth et coll. 1985).

Par mutagenèse dirigée, les ADNc correspondants aux GSTs pourraient servir de marqueurs sélectifs dans la construction de transformants plus adaptés aux techniques actuelles de l'agriculture et de la phytotoxicologie (Hayes et coll. 1988). Chez les champignons, malgré la mise en évidence de la conjugaison du GSH sur certaines drogues anti-fongiques, le rôle joué par les GSTs dans ce mécanisme n'est pas totalement démontré (Cohen et coll 1986).

Identifiées chez les annélides et les mollusques, les GSTs constituent la fraction protéique majeure des lentilles du calmar (céphalopodes, *Ommastrephes. s. p.*, Tomarev et coll. 1988). Chez

les arthropodes, les GSTs ont été particulièrement étudiées chez la mouche (*M. domestica*) et le moustique (*A. arabiensis*) où elles sont associées au phénomène de biotransformation et de résistance aux insecticides tels les organophosphorés et le cyclodiène (Openoorth et coll. 1979, Brogdon et coll. 1990 et Fournier et coll. 1992).

Chez les microorganismes unicellulaires, peu de données sont actuellement disponibles, mais on retrouve de faibles activités GST chez certaines levures (Tamaki et coll. 1990) et bactéries (Arca et coll. 1990).

D'un intérêt croissant chez les protozoaires, les GSTs ont été caractérisées en faible quantité chez les trypanosomatidés : *Trypanosoma cruzi* (Yawetz et coll. 1981 et Marty et coll. 1992) et chez les hémospodidés : *Plasmodium falciparum* (Verwaerde. C, communication personnelle). L'immunisation par les "GSH-binding molecules" confère une protection contre l'infection létale par *T. cruzi* chez la souris (Marty. M, communication personnelle)

2-2 Chez les helminthes

Les GSTs suscitent une importance grandissante dans le domaine de la chimiothérapie et de la vaccinologie chez les helminthes (Capron et coll. 1988, Mitchell et coll. 1989, Sexton et coll. 1991 et Cherfas et coll. 1991). Les helminthes ont en effet un nombre limité d'enzymes de réparation et semblent dépourvus des cytochromes P-450 (Precious et coll. 1989). Ces derniers jouent un rôle essentiel dans les processus d'oxydo-réduction constitutifs de la phase primaire de détoxification chez les mammifères (Coon et coll. 1988).

Chez les helminthes, les GSTs paraissent occuper une fonction importante de protection contre les composés réactifs générés par les radicaux libres. Les dispositifs de défense mis en place par les helminthes ainsi que la place des GSTs dans ces mécanismes sont illustrés dans le chapitre suivant.

2-2-1 Les enzymes anti-oxydantes chez les helminthes

2-2-1-1 Origine des radicaux oxydants

constituent les cibles privilégiées des radicaux libres préformés ($\text{OH}\cdot$, $\text{R}_1\text{O}\cdot$, $\text{R}_1\text{OO}\cdot$). Il en résulte une déshydrogénation de l'acide gras suivie de la fixation d'une molécule d'oxygène sur celui-ci. D'après la Figure 4, on s'aperçoit que l'oxygène entretient les réactions radicalaires et amorce ainsi un processus de réaction en chaîne qui crée des dommages membranaires et la formation de nouveaux dérivés chimiques létaux pour le parasite.

2-2-1-3 Les enzymes anti-oxydantes

Cependant, le parasite n'est pas systématiquement tué par ces radicaux libres ou leurs dérivés (Callahan et coll. 1988) et des variations de susceptibilité existent suivant les espèces et les stades évolutifs du parasite (Dockrell et coll. 1983). En effet, les parasites possèdent des systèmes d'élimination et de détoxification capables d'inactiver les radicaux oxydants et leurs produits. Les mécanismes de défense du parasite comprennent les 4 classes d'enzymes suivantes (DoCampo et coll. 1984) :

2-2-1-3-1 La superoxyde dismutase

Le premier moyen de défense est constitué par la superoxyde dismutase (SOD) qui transforme O_2^- en H_2O_2 . Elle empêche ces deux composés de coexister et par conséquent d'engendrer $\text{OH}\cdot$.

Détectée chez les Nématodes (*Trichinella spiralis*, Rhoads et coll. 1983), les Cestodes (*Taenia taeniaeformis*, Leid et coll. 1986) et les Trématodes (*S. mansoni*, Simurda et coll. 1988), la SOD cytoplasmique est un dimère de 32 kDa et contient un atome de cuivre et de zinc par monomère. Chez *S. mansoni*, une deuxième forme de SOD (Cu/Zn) a été identifiée et clonée dans notre laboratoire (Cordeiro Da Silva et coll. 1992).

2-2-1-3-2 La catalase

Tétramère de 240 kDa, la catalase utilise comme groupement prosthétique l'hématine. Elle intervient dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 empêchant donc celui-ci de participer à la réaction d'Haber-Weiss.

La catalase a été détectée chez les Nématodes (*C. elegans* et *N. brasiliensis*, Smith et coll. 1986)

mais semble être absente chez les Trématodes et les Cestodes.

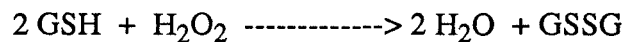
2-2-1-3-3 La cytochrome c peroxydase

Cette enzyme utilise un groupement prosthétique et intervient dans les processus d'oxydo-réduction aux dépens d'un peroxyde.

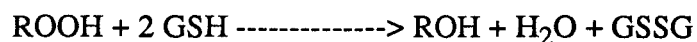
2-2-1-3-4 Les enzymes dépendantes du glutathion

2-2-1-3-4-1 Les glutathion peroxydases

De structure homotétramérique, les GSH-px sont actives vis-à-vis de l'H₂O₂. Elles fonctionnent en présence d'ion sélénium (lié de façon covalente à une cystéine) et de GSH comme donneur d'hydrogène suivant la réaction :



Elles ont également un rôle dans la réduction des hydroperoxydes membranaires en dérivés d'acides gras hydroxylés suivant la réaction :



Malgré la faible concentration de ces enzymes chez les helminthes, une GSH-px a été récemment clonée dans notre laboratoire chez *S. mansoni* (Williams et coll. 1992) et chez *B. pahangi* (Cookson, E, communication personnelle).

2-2-1-3-4-2 Les glutathion réductases

Les glutathion réductases (GRs) réduisent le glutathion oxydé GSSG par l'intermédiaire du cofacteur NADPH et interviennent ainsi dans les mécanismes de détoxification du parasite en régénérant le GSH sous forme réduite.

Détectées chez *I. carianii* et *A. suum*, leurs modes d'action semblent être affectés par les dérivés arseniques (Bhargava et coll. 1983 et Komuniecki et coll. 1992). Une faible activité GR est détectée au stade adulte de *S. mansoni* (Barrett, J, communication personnelle).

2-2-1-3-4-3 Les glutathion-S-transférases

Les GSTs semblent représenter le système majeur de détoxification chez les helminthes (Brophy et coll. 1988). L'activité GST est plus importante chez les plathelminthes à tégument d'origine cytoplasmique (Cestodes et Trématodes) que chez les Némathelminthes à tégument cuticulaire (Brophy et coll. 1990a). Chez les helminthes, les GSTs ont été intensivement étudiées:

Classe	Genre	références
Némathelminthes	<i>Ascaris</i>	Douch et coll. 1978
	<i>Haemonchus</i>	Kawalek et coll. 1984
	<i>Dirofilaria</i>	Jaffe et coll. 1986
	<i>Brugia</i>	Jaffe et coll. 1986
	<i>Rhabditis</i>	Below et coll. 1987
	<i>Onchocerca</i>	Pemberton et coll. 1989
	<i>Panagrellus</i>	Papadopoulos et coll. 1989
Plathelminthes Cestodes	<i>Caenorhabditis</i>	Weston et coll. 1989
	<i>Echinococcus</i>	Morello et coll. 1982
	<i>Hymenolepis</i>	Brophy et coll. 1990
Plathelminthes Trématodes	<i>Fasciola</i>	Howell et coll. 1988
	<i>Schistosoma</i>	Smith et coll. 1986
		Taylor et coll. 1988 O'Leary et coll. 1988

Tableau 2 . Représentation des glutathion-S-transférases caractérisées chez les helminthes

2-2-2 Variation d'activité des enzymes anti-oxydantes suivant le stade de développement du schistosome

Mkoji et coll. (1988a) démontrent, que chez *S. mansoni*, une susceptibilité différente vis-à-vis des agents oxydants s'exprime suivant le stade du développement du parasite. Le stade schistosomule, particulièrement sensible aux oxydations, constitue le stade préférentiel de l'attaque

oxydative des cellules immunitaires. De plus, la disponibilité du glutathion libre a été corrélée au facteur de résistance, soulignant ainsi le rôle primordial des enzymes utilisant ce substrat et cela, quelque soit le stade évolutif du parasite (Mkoji et coll. 1988b). Nare et coll. (1990) démontrent par la suite l'étroite relation reliant le taux des enzymes anti-oxydantes et la susceptibilité du schistosome : si le taux de SOD varie peu entre le stade schistosomule et le stade adulte, les GSH-px, les GRs et les GSTs sont sous-exprimées au stade précoce du cycle migratoire du parasite. Cette faible expression engendre une augmentation de la sensibilité aux hydroperoxydes organiques ainsi qu'une réduction de la capacité à conjuger et détoxifier les composés électrophiles toxiques pour le schistosomule. L'inefficacité du schistosomule à détoxifier les composés de type OH· et peroxy pourrait provenir de la sous-expression des GSTs à activité peroxydasique et donc à l'accumulation de substances toxiques, les hydroperoxydes lipidiques notamment.

D'après ces travaux, l'augmentation de la capacité de résistance du schistosome est clairement associée à son développement et à l'expression de l'activité enzymatique des enzymes anti-oxydantes.

2-2-3 Fonctions des GSTs chez les helminthes

Essentiellement retrouvées dans le cytosol, les GSTs d'helminthes montrent des ressemblances biochimiques et séquentielles avec les GSTs de mammifères. Comme chez les mammifères, les activités GSTs peuvent être induites par certains xénobiotiques (Morello et coll. 1982, Brophy et coll. 1990a).

2-2-3-1 Détoxification des drogues

Si la corrélation entre les propriétés enzymatiques des GSTs et la résistance aux drogues de cellules tumorales de mammifères, d'insectes et de plantes est établie, il semble que chez les helminthes, les GSTs puissent également constituer de puissants agents de résistance contre les médicaments. Chez *S. mansoni*, les GSTs catalysent une réaction de O-déméthylation sur le métabolite d'une drogue anti-helminthique : le métrifonate (O'Leary et coll. 1991). De la même manière, chez *Haemonchus*, l'inactivation du cambendazole semble dépendante d'une activité GST (Kawalek et coll. 1984). De façon contrastée, les GSTs peuvent être les cibles des médicaments ou

même faciliter le transport intracellulaire de certains agents chimiothérapeutiques (Brophy et coll. 1990a). La liaison drogue-GSH peut également entraîner la formation d'un conjugué inhibant l'activité enzymatique des GSTs et ainsi conduire à des conséquences métaboliques néfastes pour le parasite.

2-2-3-2 Détoxification des produits des peroxydations lipidiques

Des activités de type GSH-px (sélénium dépendante et indépendante) ont été mises en évidence chez *D. immitis* (Jaffe et coll. 1986) et *S. mansoni* (Taylor et coll. 1988). Des dérivés aldéhydiques à haute réactivité ont été détectés chez les helminthes (Paul et coll. 1980) et démontrés comme toxiques chez *S. mansoni* (Prichard et coll. 1989). Les GSTs de Trématodes et de Cestodes sont capables de réduire ces fonctions par conjugaison au GSH alors que les nématodes privilégient davantage les réductases utilisant le NADPH (Brophy et coll. 1989 et 1990c). Les GSTs ne sont pas actives vis-à-vis de H₂O₂.

2-2-3-3 Détoxification passive et transport

La fixation de molécules lipophiles sur les GSTs (hématine, acides gras insaturés, pigments biliaires...) a été décrite chez les helminthes. Il est possible que cette propriété favorise des mécanismes de détoxification passif comme le font les GSTs hépatiques chez les mammifères. Un rôle dans la digestion des métabolites de l'hémoglobine a été proposé pour la forme 26 kDa des GSTs de *S. japonicum* (Smith et coll. 1986). L'hématine, forme réduite du groupement prosthétique hémique est insoluble et s'accumulerait dans la lumière intestinale du parasite. La solubilisation de ce composé par la Sj26GST éviterait donc une "constipation" du schistosome. Bien que les GSTs soient visualisées au niveau de l'épithélium intestinal chez *A. suum* (Douch et coll. 1978) et chez *F. hepatica* (Howell et coll. 1988 et Wijffels et coll. 1992), l'absence de GSTs intestinales chez *S. mansoni* va à l'encontre de cette hypothèse chez le schistosome (Taylor et coll. 1988, Trottein et coll. 1990). Cependant, l'intense catabolisme de l'hémoglobine au niveau de l'épithélium caecal doit générer des composés toxiques (hématine, bilirubine) qui doivent être détoxifiés par le schistosome. Nous pouvons donc supposer que celui-ci ait mis en place d'autres

mécanismes de détoxification ou fasse intervenir d'autres molécules de transport spécifique du genre.

La capacité de fixer des ligands hydrophobes a probablement une incidence métabolique chez les helminthes : rétention de ligands hydrophobes nécessaires au métabolisme cellulaire, régulation de l'activité enzymatique par fixation du conjugué sur l'enzyme. Certains auteurs pensent que les GSTs d'helminthes ont davantage une fonction de transport et de fixation de composés toxiques et non toxiques plutôt qu'une fonction enzymatique intégrée dans la chaîne des oxydo-réductions. Ces mêmes auteurs accordent une importance frontale aux oxydo-réductases à NADPH/NADH dans le métabolisme des composés réactifs issus de l'action des radicaux oxydants (Brophy et coll. 1990 b et c).

2-2-3-4 Synthèse

Comme chez les mammifères, les GSTs interviennent dans la synthèse de composés actifs : chez *D. immitis*, une activité leucotriène "synthetase-like" a été décrite (Weller et coll. 1989).

2-2-3-5 Conclusion

La compréhension des mécanismes d'action des enzymes anti-oxydantes, et particulièrement des GSTs, pourrait constituer un apport important dans la lutte contre les agents parasitaires pathogènes. La protection enzymatique mise en place par les helminthes face aux peroxydations lipidiques peut être décomposée en trois étapes :

- 1/ La première ligne de défense se traduirait par la neutralisation des radicaux oxydants par la SOD et la peroxydase (et éventuellement par la catalase). Le taux de ces enzymes a d'ailleurs été corrélé au coefficient de survie d'un grand nombre d'helminthes chez leurs hôtes (Callahan et coll. 1988).
- 2/ Les enzymes utilisant le GSH (GSH-px et GST à activité GSH-px) interviendraient ensuite dans la détoxification des hydroperoxydes lipidiques. Toutefois, les GSH-px (Se dep et Se indep) sont peu abondantes chez les helminthes comparativement aux mammifères (Callahan et coll. 1988 et Brophy et coll. 1990c).
- 3/ Enfin, au côté des oxydo-réductases dépendantes du NAD(H)-NADP(H), les GSTs constitueraient la dernière ligne de défense contre les dérivés secondaires cytotoxiques.

Chez *S. mansoni*, cette hypothèse a été confirmée de façon indirecte par Davern et coll (1990),

lors d'une étude sérologique chez des sujets humains chroniquement infectés par *S. japonicum*. Ces auteurs ont en effet identifié des complexes circulants de phosphorylcholine associés à la Sj26GST. Ces dérivés lipidiques d'origine tégumentaire pourraient résulter de l'attaque du système immunitaire au niveau de la surface du parasite. Parallèlement, mais de façon plus contradictoire, les GSTs de *S. mansoni* pourraient jouer un rôle de détoxification des produits issus du catabolisme de l'hémoglobine.

La mise en évidence du rôle primordial des GSTs dans la physiologie et dans les mécanismes de défense du schistosome face aux effecteurs immuns nous laisse penser que leurs inactivations seraient fatales pour le parasite.

De façon expérimentale, Mkoki et coll. (1989) observent une chute sévère de l'activité enzymatique GST chez des schistosomes prélevés à partir de souris traitées par l'oltipraz (drogue anti-antibilharzique). De la même manière, Nare et coll. (1991) démontrent que l'oltipraz ou ses produits de transformation n'inhibent pas directement les GSTs mais que certains produits secondaires dérivés des peroxydations lipidiques sont responsables de leurs inactivations. Il apparaît donc à la vue de ces résultats qu'une inactivation spécifique des fonctions des GSTs (par des anticorps, par des inhibiteurs chimiques...) peut conduire à une augmentation de la vulnérabilité du schistosome et que l'action combinée d'une immunisation et d'une chimiothérapie en multiplierait les effets.

Au niveau vaccinal, il n'est pas encore compris comment des molécules cytosoliques peuvent être accessibles au système immunitaire. Cependant le turn-over naturel des membranes ainsi que les dommages membranaires associés à l'action des drogues anti-parasitaires et/ou des cellules effectrices du système immunitaire pourraient favoriser l'accessibilité des GSTs et ainsi leurs neutralisations par une réponse cellulaire ou humorale spécifique.

RESULTATS

DISCUSSION

Dans le cadre d'une stratégie vaccinale basée sur l'identification d'antigènes protecteurs contre l'infection par schistosome, la Sm28GST dispose d'un intérêt particulier. Dans ce contexte, et comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, l'importance accordée aux GSTs s'est même étendue à la maladie de la douve du foie et à la bilharziose bovine. Dans la continuité des travaux initiés dans notre laboratoire, les résultats exposés dans ce mémoire concerneront particulièrement les aspects moléculaires, biochimiques, biologiques et immunologiques des GSTs de schistosome et seront divisés en trois parties :

- 1/ Caractérisation, clonage moléculaire et exploration du pouvoir protecteur de la forme minoritaire des GSTs de *S. mansoni* : la Sm26GST.
Etude comparative des propriétés biologiques, biochimiques et immunologiques des GSTs de *S. mansoni*.
- 2/ Etude comparative des GSTs des quatre espèces majeures de schistosome infectant l'homme et le bétail : mise en évidence d'épitopes spécifiques d'espèces.
- 3/ Obtention de cristaux de Sm28GST recombinante diffractant à haute résolution aux rayons X et contribution à l'élucidation de sa structure tridimensionnelle.

ETUDE DES GLUTATHION-S-TRANSFERASES DE SCHISTOSOMA MANSONI

*

Introduction

*

Chez *S. mansoni*, les glutathion-S-transférases (SmGSTs) semblent occuper une place prépondérante dans le métabolisme et sont composées de deux groupes moléculaires séparables en gel de polyacrylamide : une forme majoritaire de 28 kDa et une forme minoritaire de 26 kDa. Afin d'avoir une meilleure appréhension du rôle respectif de chacune des deux entités enzymatiques dans la physiologie du schistosome, il nous a semblé essentiel, dans un premier temps, d'étudier la forme minoritaire (la Sm26GST) et ainsi d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Quels sont les liens ou les points communs biochimiques, biologiques et immunologiques entre les deux formes enzymatiques de 28 et 26 kDa ?
- Existe-t-il, dans le métabolisme du ver, une action concertée ou synergique entre les deux formes 28 et 26 kDa ou au contraire agissent-elles de façon indépendante et dissociée?
- Si l'immunisation par la Sm28GST induit un degré de protection significatif dans différents modèles expérimentaux d'infestation, en est-il de même pour la Sm26GST ?
- Y-a-t-il correspondance entre la Sm26GST et la molécule de 26 kDa excrétée-sécrétée par le schistosomule : la SRP 26 (Auriault et coll. 1984 et Dammeville et coll. 1988) ?

1- Etude de la forme minoritaire des GSTs de *S. mansoni*

1-1 Caractérisation, clonage moléculaire et localisation tissulaire d'une glutathion-S-transférase de 26 kDa de *S. mansoni*

ARTICLE 1

L'article 1 développe les trois sous-chapitres résumés ci-dessous.

1-1-1 Caractérisation biochimique des GSTs de *S. mansoni*.

Les SmGSTs représentent 1% des protéiques totales solubles chez le ver adulte. L'analyse par densitométrie des profils électrophorétiques des SmGSTs (gel coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent) indique une surexpression de la forme 28 kDa par rapport à la forme 26 kDa (20/1). L'analyse en gel bidimensionnel des SmGSTs purifiées à partir du ver adulte (Figure 1, article 1) révèle la présence d'isoformes à 28 kDa regroupées dans une faible gamme de pH proche de la neutralité. Deux isoformes majeures migrant à 26 kDa sont également détectées (pI : 6 et 8). Cette hétérogénéité peut être le reflet de modifications chimiques générées durant les étapes de purification ou d'analyse, de modifications post-traductionnelles ou enfin de la présence de protéines différentes.

1-1-2 Obtention de la séquence complète du gène codant pour la Sm26GST.

Une stratégie de clonage moléculaire a été mise en place dans notre laboratoire et celle-ci passait dans un premier temps par la confection d'une sonde anticorps monospécifique anti-Sm26GST et par la construction d'une banque d'ADN complémentaire chez le stade adulte de *S. mansoni*. L'immunocriblage de $1.5 \cdot 10^6$ phages recombinants indépendants aboutit à l'identification, la purification et le séquençage de plusieurs clones. Seulement deux clones (G2-1 et G2-6) correspondaient à la séquence recherchée. L'analyse des homologies de séquence entre la Sm26GST et les GSTs de vertébrés et d'invertébrés sera illustrée dans le

prochain chapitre.

L'identification séquentielle et l'analyse des 218 acides aminés composant la Sm26GST (masse moléculaire et P_i théoriques : 25,401 kDa et 5.92) ont permis de mettre en évidence deux sites potentiels de N-glycosylation. Cependant, par utilisation d'une batterie de lectines spécifiques marquées, aucun signal positif n'a pu être détecté contre la Sm26GST native du parasite. D'autre part, la comigration sur SDS-PAGE de la protéine traduite *in vitro* à partir des ARNs totaux du ver adulte et de la Sm26GST préparée par chromatographie d'affinité à partir de l'extrait antigénique total du ver adulte est en faveur de l'absence de résidus glycaniques sur la Sm26GST native (non montré).

1-1-3 Localisation ultrastructurale de la Sm26GST au stade adulte de *S. mansoni*.

La recherche de la localisation tissulaire apporte généralement des renseignements capitaux dans la compréhension des fonctions d'une molécule. La Sm26GST est essentiellement retrouvée dans les tissus parenchymateux et néphridien du ver adulte. Nous verrons plus tard que des différences de localisation existent entre les formes 28 et 26 kDa.

MOLBIO 01337

Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase

François Trottein¹, Marie Paule Kieny², Claudie Verwaerde¹, Gérard Torpier¹,
Raymond J. Pierce¹, Jean-Marc Balloul², Doris Schmitt², Jean-Pierre Lecocq² and
André Capron¹

¹Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille, France, and
²Transgène S.A., Strasbourg, France

(Received 2 November 1989; accepted 23 January 1990)

A *Schistosoma mansoni* cDNA library was constructed from the mRNA of adult worms in the expression vector λ gt11 and screened with a rabbit antiserum raised against the 26-kDa *S. mansoni* glutathione S-transferase isoforms (Sm GST 26). Two clones were selected and the nucleotide sequences deduced. The predicted amino acid sequence, specified by these cDNAs, shows strong homology with a *Schistosoma japonicum* 26 kDa glutathione S-transferase and a lower level of homology with mammalian glutathione S-transferase class μ isoenzymes (EC 2.5.1.18). No significant homology score was found with a 28-kDa *S. mansoni* glutathione S-transferase (Sm GST 28). A study of the tissue distribution of the cloned Sm GST 26 by immunoelectron microscopy shows similarities to Sm GST 28 in that they are present in the tegument and in subtegumentary parenchymal cells. However, a major difference exists in the protonephridial region in which Sm GST 26 is present in the cytoplasmic digitations localized in the apical chamber delineated by the flame cell body, suggesting that Sm GST 26 may be actively excreted by adult worms.

Key words: *Schistosoma mansoni*; glutathione S-transferase; Molecular cloning; Homology; Tissue distribution

Introduction

Although chemotherapeutic agents against schistosomes exist, and other measures have included public hygiene and snail vector control, increasing attention has focused on the development of an anti-schistosomal vaccine [1]. Among the candidates for such a vaccine [2], the glutathione S-transferases (GSTs) have assumed a ma-

ior immunological interest. These GST isoenzymes appear to play a central role in the parasite detoxification system. Other functions are also suspected including a role in increasing the solubility of haematin in the parasite gut [3]. Therefore, neutralization of these functions by a specific immune response may be highly lethal to the parasite (leading, for instance, to the accumulation of free radicals from oxygen metabolism produced by immune-effector cells). In *Schistosoma mansoni*, when total adult worm extracts are passed through a glutathione (GSH)-conjugated agarose column, two GSH-binding molecules are detected in the eluate by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis, with sizes of 28 and 26 kDa [4].

The predominant group of GSH-binding molecules is the 28-kDa form. In the search for schistosome antigens that are targets of host-protective immune response, a 28-kDa GST was characterized and cloned in our laboratory [5,6].

Correspondence address: François Trottein, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 Rue du Professeur A. Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with the accession number M31106.

Abbreviations: Sm GST, glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*; MEM, minimal Eagle's medium; PMSF, phenyl methyl sulfonyl fluoride; TCA, trichloroacetic acid; GSH, glutathione; cDNA, complementary DNA.

A significant level of protection against a *S. mansoni* challenge infection was obtained in mice (40%), rats (65%), hamsters (50%) and baboons (40%) using the recombinant protein P28-1r [6,7].

The other group of molecules recovered by affinity chromatography is the 26-kDa form (Sm GST 26). In experimental *Schistosoma japonicum* infection, Mitchell et al. identified antigens preferentially recognized by the resistant 129/J mouse strain and described a 26-kDa antigen (termed SJ26) [8] that was subsequently characterized as a GST [9]. Partial protection of mice against *S. japonicum* infection was obtained by vaccination with the β -galactosidase-SJ26 fusion protein [10,11].

Furthermore, in our laboratory, we have previously described the presence of a 26-kDa molecule in the excretion-secretion products of schistosomula. This antigen preferentially induced the production of IgE antibodies that were cytotoxic in vitro against schistosomula and protective in vivo against a challenge infection [12,13]. Considering the possible correspondence between this molecule and the Sm GST 26 molecule, and due to the predicted vital role of GSTs in the parasite life cycle, we were particularly interested in the Sm GST 26 antigen. In this paper we report the full-length nucleotide sequence coding for a Sm GST 26 polypeptide. An immunoelectron microscopic study of the localization of Sm GST 26 in the adult parasite is reported. Differences in localization compared with Sm GST 28 in the adult worm and other stages are emphasized. The possible use of Sm GSTs as a component of a molecularly defined vaccine against schistosomiasis is discussed.

Materials and Methods

Parasites and antigen preparations. A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters. Adult schistosomes were recovered by portal venous perfusion of infected hamsters on day 40 and then washed with minimal Eagle's medium (MEM). Total adult schistosome antigens were prepared by homogenizing worms in the equilibration buffer: 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, containing 1.15% KCl (w/v), 0.5 mM phenyl

methyl sulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM EDTA using an Ultra-turrax homogenizer. The homogenate was then sonicated and centrifuged at 10 000 rev./min for 20 min at 4°C in a Sorvall HB-4 rotor. Total *S. mansoni* GSTs were purified from the homogenate by elution from GSH-agarose beads (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) [14]. 5 μ g of purified GSTs were ¹²⁵I-labeled using the chloramine T method of Greenwood et al. [15]. Radiolabeled parasite GSTs were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis according to Garrels et al. [16]. Metabolic labeling was carried out exactly as described [17] using [³⁵S]methionine (4.77 TBq/mmol; Amersham, U.K.). The immunoprecipitation procedure and immune complex analysis were performed by standard methods [5,17].

Production of anti-Sm GST 26 antisera. Total *S. mansoni* GSTs were fractionated on 13% polyacrylamide slab gels using the discontinuous buffer system of Laemmli [18]. After Coomassie Brilliant Blue staining, the 26-kDa band was cut out. Electroelution from preparative slab gels was performed as previously described [5]. The electroeluted Sm GST 26 was extensively dialyzed against water and then concentrated with aquacide II (Calbiochem-Behring Corp., CA). New Zealand rabbits were immunized by injection of 1 ml (100 μ g protein) of purified Sm GST 26 as described by Vaitukaitis et al. [19] in the presence of complete Freund's adjuvant. Rabbits were boosted 2 weeks later by a subclavicular injection of 20 μ g protein with incomplete Freund's adjuvant and bled every week. Serum specificity was tested by Western blotting analysis with 5 μ g of Sm GSTs per lane in 13% SDS-polyacrylamide gels under reducing conditions. After transfer to nitrocellulose sheets [20], detection of antibody binding was as reported in the paragraph below.

cDNA expression library construction and immunoscreening. Total RNA was extracted by the method of Chirgwin et al. [21] and modified by Grausz et al. [22]. Poly(A)⁺ RNA was obtained by affinity chromatography over an oligo(dT)₁₂₋₁₈ cellulose column (Collaborative Research, Lexington, MA) [23]. The cDNA library, expressed in the λ gt11 vector, was constructed using the

Amersham kit. Briefly, from 5 μg of poly(A)⁺ RNA, 2 μg of ds cDNA was synthesized according to the method of Gübler and Hoffman [24]. *EcoRI* linkers were ligated onto the cDNA inserts, cleaved with *EcoRI* and the cut linkers removed by column chromatography. The $\lambda\text{gt}11$ DNA, cleaved by *EcoRI* and dephosphorylated, was ligated to the inserts. The ligation products were packaged in vitro and introduced into *E. coli* strain Y1090 giving 1.5×10^6 individual recombinants as judged by color screening with X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) and IPTG (isopropylthio- β -D-galactopyranoside). The cDNA library was immunoscreened with the rabbit antiserum raised against the Sm GST 26 antigen by the method of Huynh et al. [25]. Positive clones were detected using a biotin-streptavidin-peroxidase system (Amersham) and 4-chloro-1-naphthol as substrate (BioRad Labs, Richmond CA). This procedure was repeated until the clones were purified to 100%. Affinity purification of antibodies specific for the β -galactosidase-*S. mansoni* fusion protein was carried out using the techniques described by Olmsted et al. [26]. Purified antibodies were used in Western blotting analysis with total Sm GSTs.

DNA sequencing. cDNA inserts were subcloned into the phage vector M13tg130 [23,27]. Dideoxynucleotide sequencing was performed on both strands as described by Sanger et al. [28]. DNA and amino acid sequences were analyzed using programs purchased from DNASTar (Madison, WI). A computerized search of the National Biomedical Research Foundation (NBRF) protein sequence data base (Georgetown Medical Center, Washington, DC) was performed using FASTP [29].

Radiolabeling of DNA probes and Northern hybridization. Purified insert from subcloned M13 was radiolabeled by the multiprime DNA labeling system (Amersham) using [α -³²P]dCTP (111 TBq mmol⁻¹, Amersham). Northern transfer and hybridization were carried out by standard procedures [30]. After hybridization, nitrocellulose filters were washed under high-stringency conditions.

Immunocolloidal gold labeling. Immunocolloidal gold labeling of thin sections of Lowicryl K4M-embedded adult worms and larvae of *S. mansoni* was carried out as previously described [31] except for the modifications outlined below.

The sections were labeled with monospecific rabbit anti-Sm GST 26 antiserum and affinity-purified goat anti-rabbit IgG-colloidal gold conjugate (1:50 dilution; Auroprobe One; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium). Finally, the sections were subjected to silver enhancement according to a modification of Danscher's silver lactate hydroquinone physical developer [32]. Controls of specificity of the immunolabeling included the use of Auroprobe One alone (without any exposure to an antibody) or with normal control rabbit serum. No labeling above background was observed in these conditions.

Results

Production and characterization of anti-Sm GST 26 antiserum. Total *S. mansoni* glutathione S-transferases (Sm GSTs), which represent 0.5–1% of total adult worm proteins were purified by affinity chromatography on a GSH-agarose column. The two-dimensional electrophoretic analysis of [¹²⁵I]labeled Sm GSTs (Fig. 1A) reveals the presence of two groups of molecules, of 28 kDa and 26 kDa and with pI values between 6 and 7. A one-dimensional SDS-PAGE profile of purified GSTs stained with Coomassie Blue (or silver) demonstrates the lower representation of Sm GST 26 relative to Sm GST 28 (approx. 10–20-fold less) (Fig. 1B). Other investigators have shown that this disproportion is less marked in the *S. japonicum* Philippine strain [4], and even less in the Chinese strain (A. Moloney, personal communication). After affinity chromatography, total Sm GSTs were fractionated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue, and the band corresponding to the 26-kDa antigen was cut out for electroelution (Fig. 1B). The electroeluted Sm GST 26 was injected into a rabbit until the serum was able to detect 50 ng of total GSTs in a dot-blot assay (data not shown). The monospecificity of this rabbit anti-Sm GST 26 antiserum was checked by immunoprecipitation of metabolically labeled antigens of adult worms (Fig. 2B), by im-

38

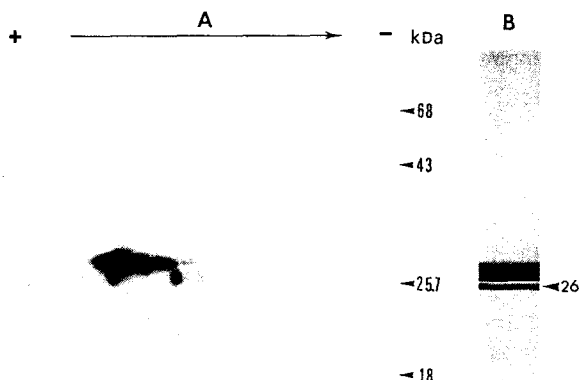


Fig. 1. (A) Two-dimensional electrophoretic analysis of [^{125}I]labeled *S. mansoni* adult worm glutathione *S*-transferases. Soluble Sm GSTs were purified by affinity chromatography on a GSH-agarose column and [^{125}I]labeled [19]. 10^4 cpm of TCA-precipitable labeled Sm GSTs were separated by isoelectric focusing using pH 3.5–10 carrier ampholines (LKB, Bromma, Sweden). A 13% SDS-polyacrylamide gel was used for the second dimension. Labeled GSTs were made visible by gel fluorography. Molecular weight marker proteins are indicated with sizes in kDa. (B) Coomassie Blue-stained SDS-PAGE profile of purified *S. mansoni* GSTs. After affinity chromatography, soluble Sm GSTs were run on a 13% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. The gel was Coomassie Brilliant Blue-stained and destained with acetic acid/methanol/water (1:2:4, v/v/v). The stained band corresponding to Sm GST 26 is indicated by an arrowhead.

munoprecipitation of *in vitro* translation products of poly(A) $^+$ RNA (data not shown) and by Western blotting analysis of total *S. mansoni* GSTs (Fig. 2A). No cross-reactivity between Sm GST 26 and Sm GST 28 was detected in any case.

Identification of clones encoding Sm GST 26. A cDNA library, synthesized from mRNA isolated from adult worms, was constructed in $\lambda\text{gt}11$ and antiserum raised against Sm GST 26 was used to screen 1.5×10^6 independent recombinant phage for expression of the β -galactosidase-schistosome fusion protein. An initial screening of the total recombinants resulted in the identification of 8 antigen-expressing clones. After a second screening, 6 of the clones initially identified remained positive (named G2-1 to G2-6). Antibodies selected from expressed fusion protein of these clones were used to screen Western blots of total *S. mansoni* GSTs (data not shown). This allowed us to retain 4 clones (which selected antibodies

that recognized only the 26-kDa form) for further studies. The inserts ranged in size between 200 and 1000 bp. The inserts of these clones were introduced in the polylinker site of the M13gt130 vector (mp7 family). Two inserts which hybridized together (G2-1 and G2-6, of approximately 700 bp) were sequenced in both DNA strands.

Characterization of the Sm GST 26 sequence. The nucleotide sequences of the G2-1 and G2-6 inserts were determined by using standard syn-

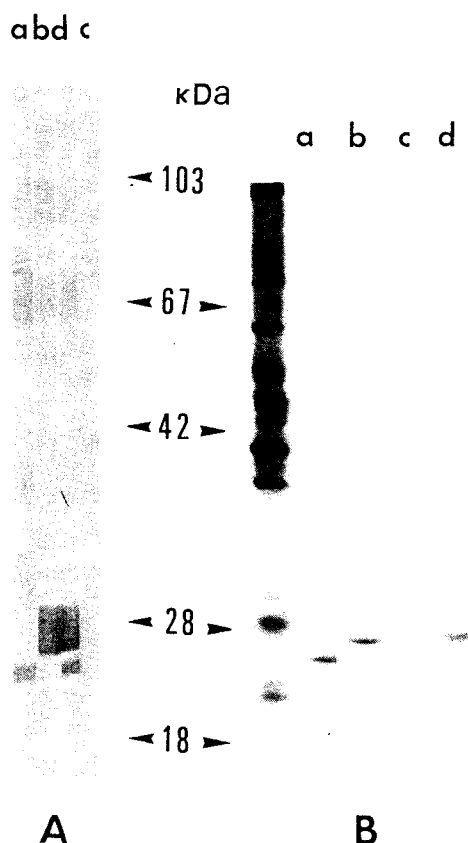


Fig. 2. Western blot analysis of *S. mansoni* GSTs (A) and immunoprecipitation analysis of [^{35}S]methionine metabolically labeled antigens from adult worms (B) probed with rabbit antiserum immunized against purified Sm GST 26 (a), against recombinant Sm GST 28 (b), against total Sm GSTs (d) and probed with normal rabbit serum (c). In each immunoprecipitation assay, an equal number of TCA-precipitable counts (10^5 cpm) was added to 10 μl of antiserum. The immunoprecipitates were fractionated on a 13% SDS-polyacrylamide gel and analyzed by fluorography. The pattern of total metabolically labeled antigens is shown on the left-hand side. Molecular weight marker proteins are indicated with sizes in kDa.

thetic oligonucleotide primers corresponding to the M13tg130 polylinker. The full-length sequence was obtained by using several synthetic oligonucleotides corresponding to a newly read sequence (in the 5' and 3' regions). The two inserts G2-1 and G2-6, which contained overlapping sequences, gave the longest possible cDNA, of 722 bp. The entire nucleotide sequence is illustrated in Fig. 3 along with the deduced amino acid sequence. Computer analysis detected a single open reading frame of 218 amino acids beginning by the initiation codon AUG at nucleotide 1 and terminating by UAG at nucleotide 654. The predicted molecular weight of the polypeptide was 25401. It seems very likely that translation is initiated from the first AUG codon at nucleotide 1, since translation initiated from the methionine residues at positions 69 or 81 would result in shorter proteins of 17.5 and 16 kDa, respectively. The entire sequence encoding the polypeptide (654 bp) plus a non-coding 3' region (68 bp) is represented in Fig. 3. The polypeptide contains two potential *N*-glycosylation sites (amino acid positions 139 and 194), 27 leucine (12.3%) and 19 lysine (8.7%) residues. The full sequence analysis suggests that the polypeptide is not an integral membrane protein and no signal sequence is ap-

parent.

A Northern blot was performed on RNA prepared from *S. mansoni* adult worms using the ³²P-labeled insert from clone G2-1. The size of the detected message after high-stringency washing, was approximately 1.0 kb (data not shown).

Homology to glutathione S-transferases. The NBRF protein sequence database was screened for sequences related to the predicted polypeptide sequence of Sm GST 26. The highest homology was scored with the Sj GST 26 sequence [10]. In terms of amino acid alignment, 79.8% of identity (174/218) was found with major differences in the N-terminal (positions 31–47), central (107–148) and C-terminal (167–197) regions (Fig. 4). Other comparisons led to the discovery of homology with mammalian GST isoenzymes. According to the enzyme activity, antigenicity and structure, the mammalian GSTs are divided into at least three distinct classes [33]: class μ (subunits 3,4,6), class α (subunits 1,2) and class π (subunit 7).

When we compared the Sm GST 26 and mammalian GST polypeptide sequences, the best homology was scored with class μ GST isoenzymes. For instance, the polypeptide sequences of rat

ATGGCACCTAAGTTCGGTTATTGGAAGTCAAAGGCCTGTACAACCAACTCGACTTCTTTTGAACACCTTGAAGAACTTATGAGGAA	90
M A P K F G Y W K V K G L V Q P T R L L L E H L E E T Y E E	30
CGTGCCTATGATCGCAATGAAATCGATGCGCTGGAGCAACGATAAAATTTAAATTAGGCCTGGAGTCCCAAATCTTCCTTATTATATTGAT	180
R A Y D R N E I D A W S N D K F K L G L E F P N L P Y Y I D	60
GGTGATTTTAAATTAACACAATCTATGGCTATCATACGTTATATAGCTGACAAACACAACATGTTGGGGGCTTGTCCAAAAGAACGTGGC	270
G D F K L T Q S M A I I R Y I A D K H N M L G A C P K E R A	90
GAAATTCGATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGGATGGGTGTTTTAAGAATCGCATAACAATAAGGAATATGAAACCCTCAAAGTT	360
E I S M L E G A V L D I R M G V L R I A Y N K E Y E T L K V	120
GATTTTCTCAACAACTTCTGGGAGGCTGAAAATGTTGCAAGATCGTTTGTCTAACAAACTTATTTGAACGGTAATTGTGTAACATCAT	450
D F L N K L P G R L K M F E D R L S N K T Y L N G N C V T H	150
CCTGACTTTATGTTATACGATGCCCTTGATGTGGTTTTATACATGGACTCACAGTGCTTGAACGAGTTTCCAAAATTAGTTTCTTTCAA	540
P D F M L Y D A L D V V L Y M D S Q C L N E F P K L V S F K	180
AAGTGTATTGAAGATTTACCACAAATCAAGAACTACTTAAATTCTAGCAGGTACATAAAATGGCCTCTGCAAGGTTGGGATGCCACGTTT	630
K C I E D L P Q I K N Y L N S S R Y I K W P L Q G W D A T F	210
GGTGGTGGAGATACTCTCCAAAATAGATTAAACAGTAAATCTGGTAAATAACATAAAAAGCCTGTTATATGTTTACTAAATAAAAAATAA	720
G G G D T P P K -	240

CG

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the open reading frame of the G2-1 and G2-6 inserts. The predicted coding region of the nucleotide sequence consists of 654 bp. The termination codon UAG, nucleotides 655–657, is marked (–). Nucleotides and amino acids are numbered in the right-hand column. The two potential *N*-glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr) of the polypeptide are indicated by asterisks.

40

```

S.m GST 26 MAPKFGYWKVKGVLVQPTRLLEHLEETRYAYDRNEIDAWSNDK
S.j GST 26 MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEHLRYERDEGDKWRNKK

          50
FKLGLFPPNLPYYIDGDFKLTQSMAIIRYIADKHNLGACPKERA
FELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNLGGCPKERA

          100
EISMLEGAVLDIRMGVLRITAYNKEYETLKVDLNLKLPGRKMFED
EISMLEGAVLDIRYGVSRITAYSKDFETLKVDLNLKLPPEMLKMFED

          150
RLSNKTYLLGNCVTHPDEFMLYDALDVVLYMDSQCLNEFPKLVSFK
RLCHKTYLNGDHVTHPDEFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK

          200
KCIEDLPQIKNYLNSRYIKWPLQGWATFGGGDTPPK
KRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWATFGGGDHPK

```

Fig. 4. Comparison of the complete amino acid sequences of Sm GST 26 and Sj GST 26 [10]. The Sm GST 26 polypeptide sequence is above the Sj GST 26 polypeptide sequence. Optimal alignment is shown with identity marked by (=), a conservative amino acid substitution by (-), and a gap by (I). Potential *N*-glycosylation sites on the Sm GST 26 polypeptide sequence are marked with asterisks.

liver yb1 chain (subunit 3) [34] and yb2 chain (subunit 4) [35] gave an overall homology with Sm GST 26 of 36 and 29% respectively. Differences are distributed throughout the polypeptide chain, but as shown in Fig. 5, a particular region towards the N-terminal portion (positions 45–80), exhibited 71% identity with these rat liver GSTs (25/35). Similar results were obtained with human and mouse GST class μ isoenzymes (not shown). This highly conserved region may be involved in GSH anion binding [36].

Sequence comparisons with GST classes α and π showed only low levels of homology to the Sm GST 26 polypeptide sequence. For instance, the overall homology scores with the rat yc chain (subunit 2) [37], the rat ya chain (subunit 1) [38], and with the rat GST P (subunit 7) [39] were ranged between 10 and 15%. No significant homology was detected using the Sm GST 28 polypeptide sequence [6], but several amino acids can be superposed in the region described in Fig. 5 (particularly between residues 68–80).

Immunoelectron microscopic labeling. The typical distribution of Sm GST 26 immunoreactive sites on sections from adult schistosomes is shown in Fig. 6A–C. Preliminary studies showed that specific immunocolloidal gold labeling, necessarily conducted before glutaraldehyde post-fixation was more easily detected with silver-enhanced

	Residue N°	
S.m GST 28	48	IPGGRLPVAVKVTDDHGHVWVWMLSELAIRYMAKHH
S.m GST 26	45	KFKLGLFPPNLPYYIDGDFKLTQSMAIIRYIADKH
Rat Yb2 ch	49	KFKLGLFPPNLPYYIDGDFKLTQSMAIIRYIADKH
Rat Yb1 ch	49	KFKLGLFPPNLPYYIDGDFKLTQSMAIIRYIADKH

Fig. 5. Comparison of conserved amino acid sequences of Sm GST 28 [6], Sm GST 26, rat liver GST yb1 chain [34] and rat liver GST yb2 chain [35]. Identical amino acid residues between the Sm GST 26 sequence and mammalian GSTs class μ isoenzyme sequences are boxed. Conserved amino acid residues between Sm GST 26 and Sm GST 28 are connected by vertical blocks. Residue No. relates the first amino acid in this particular region to its position in the protein.

Auoprobe One (1 nm) than with 10 nm gold particles. Optimally visualized, gold particles appeared to be preferentially associated with the tegument and subtegumentary parenchymal cell processes (Fig. 6A). These processes, which contain varying quantities of glycogen and lipid droplets, are intensely labeled in the dorsal male tubercles (Fig. 6B). In the protonephridial region, anti-Sm GST 26 reacted with cytoplasmic digitations localized in the apical chamber delineated by the flame cell body (Fig. 6C), whereas it did not label the tubule cytoplasm, the flame cell body or the tuft of cilia forming the flame. A close examination of other tissues of the adult worms has shown no evidence of labeling above deliberately induced background by silver enhancement conditions.

Discussion

We report in this paper the molecular cloning and sequence characterization of a 26-kDa *S. mansoni* glutathione *S*-transferase, Sm GST 26. A cDNA *S. mansoni* adult worm library was constructed in λ gt11 and screened with a rabbit monospecific antibody probe raised against the Sm GST 26 antigen. After selection of positive recombinants, two clones were sequenced in the M13tg130 vector (G2-1 and G2-6 inserts). The nucleic acid sequence of the G2-1 and the G2-6 inserts allowed the characterization of 722 bp beginning by the initiation codon AUG. The polypeptide contains 218 amino acids and the predicted molecular weight is 25 401. Since 654 bp are needed to encode the Sm GST 26 polypeptide, and since the corresponding message size is ap-

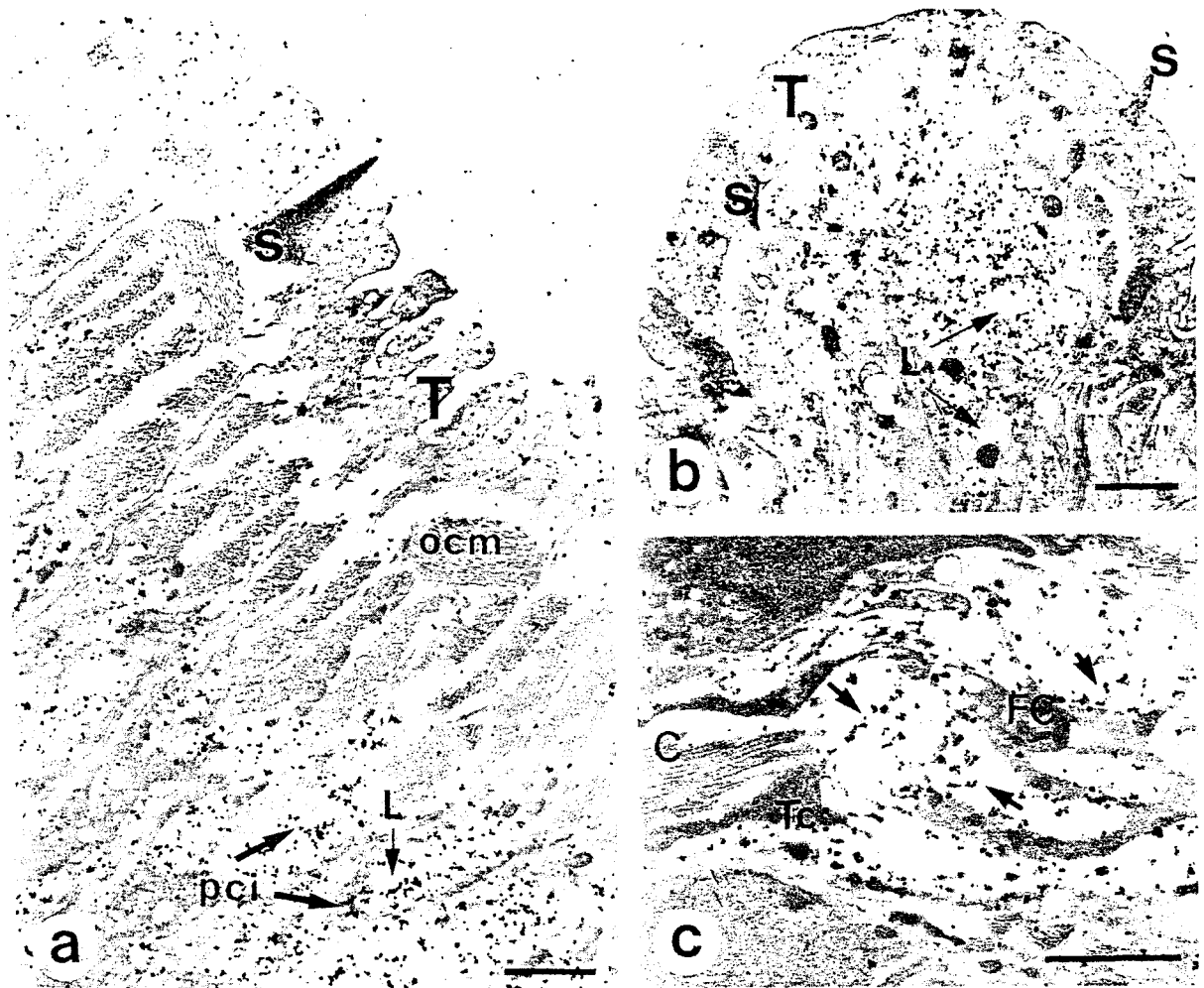


Fig. 6. Ultrastructural localization of Sm GST 26 in *S. mansoni* adult worms. Lowicryl sections of fixed parasites were labeled with specific rabbit anti-Sm GST 26 antiserum followed by Auroprobe One goat anti-rabbit IgG used in combination with silver enhancement. (a) Enlarged gold particles are associated with the tegument (T) and subtegmentary parenchymal cell interdigitations (pci). S, spine; ocm, outer circular cortical muscle; L, lipid droplets. (b) In the dorsal region of male *S. mansoni*, the use of the gold probe resulted in intense and specific labeling of the medullary cell processes forming the tubercle. S, spine; T, tegument; L, lipid droplets. (c) In the protonephridial region, the labeling by gold particles (arrows) is present over cytoplasmic digitations localized in the apical chamber delineated by the flame cell body (FC). Tc, tubule cytoplasm of the protonephridial cell in the vicinity of the tuft of cilia forming the flame (C). Bar, 2 μm .

proximately 1000 bp, it can be concluded that the message contains nearly 350 untranslated bp. Interestingly, two potential *N*-glycosylation sites have been detected in the Sm GST 26 sequence (situated in a β -turn conformation). This observation does not imply necessarily that native Sm GST 26 is effectively glycosylated. Indeed, all known GSTs are described, until now, as holoproteins. Moreover, in the rat liver GST yb1.

amino acid sequence [34], a potential *N*-glycosylation site is detected (position 200) without any evidence of *N*-glycosylation on the native protein. Furthermore, the apparent absence of a difference in molecular weight observed (on the same polyacrylamide gel, not shown) between the native Sm GST 26 and the *in vitro* translated product of Sm GST 26 mRNA renders glycosylation unlikely. Nevertheless, the possible exist-

ence of *N*-linked glycosylation cannot be discarded. Experiments to characterize such an oligosaccharide on the native Sm GST 26 molecule are under way.

Due to the extensive sequence homology with Sj GST 26 (Philippine strain) in terms of amino acid alignment, there is compelling evidence that the G2-1 and G2-6 clones represent a Sm GST 26 antigen. The strong identity at the N-terminal end of Sm GST 26 with Sj GST 26 reinforces the idea that the first AUG is the initiation codon. Tiu et al. [4] have previously claimed that Sj GST 26 and Sm GST 26 have a high level of homology, although no sequence data was presented in their report. Surprisingly, in spite of this homology, these authors, using a rabbit antiserum raised against total Sj GSTs, did not detect antibody cross-reactivity between the two parasite GST 26 molecules. The low representation of Sm GST 26 compared to Sm GST 28 has been suggested as explaining this; however, with our anti-Sm GST 26 antiserum, we have observed cross-reactivities with GST 26 of *S. japonicum* (Chinese strain), *Schistosoma bovis* and *Schistosoma haematobium* (data not shown).

When we compared the polypeptide sequence of Sm GST 26 with other described GSTs, Sm GST 26 seemed closely related to mammalian GST class μ isoenzymes. Rat liver GSTs yb1 and yb2 share 36 and 29% identity with Sm GST 26, and may have evolved from a common ancestral gene. The highly conserved sequence mentioned in Fig. 5 (positions 45–80), where 71% identity has been noted, may be involved in the maintenance of enzyme structure, and could represent a means of escape from the host immune system [36]. Studies of eventual immunological cross-reactivity between Sm GST 26 and mammalian class μ GSTs are in progress. On the other hand, although to a lesser extent than Sm GST 28, Sm GST 26 elicits antibody production during Brown Norway rat infection (data not shown). Its immunogenicity during human infection is now under investigation.

Sm GST 26 does not share significant homology with Sm GST 28 except for several superposed amino acids distributed in short sequences (see Fig. 5). In support of this observation, we could never observe any antibody cross-reactivity

between the two Sm GSTs, whatever the combination of serum or antigen used. The lack of homology between Sm GST 26 and Sm GST 28 mRNAs is thus not surprising, and suggests that these mRNAs are transcriptional products of distinct gene families which have evolved independently. This difference is also evidenced by their non-superposable tissue distribution in the adult worms. Indeed, although there is a similar representation of both Sm GSTs in the tegument and subtegumentary parenchymal cell processes, Sm GST 26 is localized specifically in digitations present in the apical chamber delineated by the flame cell body, suggesting an excretory nature of this GST. This last point was confirmed in the other parasite life-cycle stages by the detection of Sm GST 26 in the cercarial acetabular glands and in the nephridial system of miracidia (manuscript in preparation). Taken together, these data emphasize possible differences in function between the two GSTs, Sm GST 26 more probably being involved in the detoxification of the immediate environment of the parasite. Indirect immunofluorescence data confirms that Sm GST 26 is not exposed on the outer surface of adult worms, but this in no way limits its interest as a potential vaccine molecule. The role of excreted-secreted antigens in protection has been demonstrated [12], and more particularly, mechanisms by which released GSTs could induce protective immunity have been proposed [3].

The availability of Sm GST 26 as recombinant protein allows us to envisage its utilization in vaccination experiments against schistosomiasis in the near future. We previously described the presence of a 26-kDa antigen in schistosomula released products (SRP) that was considered as a major immunogen eliciting a protective IgE response against schistosomiasis [13]. These results were confirmed by the production of an anti-26-kDa rat monoclonal IgE antibody that significantly protected rats against a challenge infection [40]. Preliminary results of dot blot immunoassays of total Sm GSTs probed with this IgE monoclonal antibody suggest that Sm GST 26 and Sm SRP 26 could share at least a common epitope (data not shown). The possible identity between these molecules is at present being extensively studied and could be evidenced by two different

approaches: firstly, by the utilization of this IgE monoclonal antibody or the corresponding anti-antiidiotypic antibody [41] as immunoreactive probes against the recombinant Sm GST 26 molecule; secondly, by the immunization of rats with the recombinant Sm GST 26 molecule in order to reproduce the particular characteristics of induction of IgE synthesis, that was observed with the SRP 26-kDa antigen.

The availability of the two major forms of Sm GSTs as recombinant molecules will allow us to investigate the general and particular role of these GSTs both as potential vaccines and as tools for the study of the parasite survival mechanisms. First, fine analysis of the GST enzyme characteristics could provide important information about their respective functional properties and their involvement in the biology of the parasite. Second, it will be of particular interest to test combinations of the two GSTs in vaccination experiments (an expression vector containing both Sm GST 28 and Sm GST 26 cDNAs is under construction) to observe putative additive or synergic effects.

References

- 1 Butterworth, A.E. (1988) Control of schistosomiasis in man. In: *The Biology of Parasitism* (Englund, P.T. and Sher, A., eds.), Vol. 9, pp. 43–59, Alan R. Liss, New York.
- 2 Sher, A., James, S.L., Correa-Oliveira, R., Hieny, S. and Pearce, E. (1989) Schistosome vaccines: current progress and future prospects. *Parasitology* 98, 61–68.
- 3 Mitchell, G.F. (1989) Glutathione *S*-transferase: potential components of anti-schistosome vaccines? *Parasitol. Today* 5, 34–37.
- 4 Tiu, W.U., Davern, K.M., Wright, M.D., Board, P.G. and Mitchell, G.F. (1988) Molecular and serological characteristics of the glutathione *S*-transferase of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 10, 693–706.
- 5 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. Parasitol.* 17, 105–114.
- 6 Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvalho, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1987) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 326, 149–153.
- 7 Balloul, J.M., Boulanger, D., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvalho, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1987) Vaccination of ba-
- boons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli* In: *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites* (McInnis, A., ed.), pp. 77–84, Alan R. Liss, New York.
- 8 Mitchell, G.F., Cruise, K.M., Garcia, E.G. and Tiu, W.U. (1984) Anti-worm antibody specificities in 129/J mice resistant to infection with *Schistosoma japonicum*. *J. Parasitol.* 70, 983–985.
- 9 Smith, D.B., Rubira, M.R., Simpson, R.J., Davern, K.M., Tiu, W.U., Board, P.G. and Mitchell, G.F. (1988) Expression of an enzymatically active parasite molecule in *Escherichia coli*: *Schistosoma japonicum* glutathione *S*-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 249–256.
- 10 Smith, D.B., Davern, K.M., Board, P.G., Tiu, W.U., Garcia, E.G. and Mitchell, G.F. (1986) *M*₂₆₀₀₀ 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.
- 11 Mitchell, G.F., Garcia, E.G., Davern, K.M., Tiu, W.U. and Smith, D.B. (1988) Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of resistance to *Schistosoma japonicum* in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 885–889.
- 12 Auriault, C., Damonville, M., Verwaerde, C., Pierce, R.J., Joseph, M., Capron, M. and Capron, A. (1984) Rat IgE directed against schistosoma-released products is cy-

Note added in proof

A recently published sequence of a 26-kDa *S. mansoni* glutathione *S*-transferase [42] is identical to that described here except for the absence of the seven N-terminal amino acids.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM (167), CNRS (624), the Rockefeller Foundation, grants Nos. 07585 and 08387 from the Edna McConnell Clark Foundation and grant No. 002-408 from the EEC.

We are grateful for the excellent technical assistance of Anita Spindler, Josette Fontaine and Christian Drolez, and to Suzanne Van Wingene for maintaining the parasite life-cycle. We thank Philippe Boutin for assistance with computer analysis.

- toxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula in vitro. Eur. J. Immunol. 14, 132-138.
- 13 Damonville, M., Auriault, C., Verwaerde, C., Delanoye, A., Pierce, R.J. and Capron, A. (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.
 - 14 Simons, P.C. and Vander Jagt, D.L. (1981) Purification of glutathione S-transferase by glutathione-affinity chromatography. Methods Enzymol. 77, 235-237.
 - 15 Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Bolver, J.S. (1963) The preparation of ¹²⁵I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89, 114-123.
 - 16 Garrels, J.I. (1979) Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. J. Biol. Chem. 254, 7961-7977.
 - 17 Dissous, C., Dissous, C. and Capron, A. (1981) Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. Mol. Biochem. Parasitol. 3, 215-225.
 - 18 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
 - 19 Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E. and Ross, G.T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. 33, 988-991.
 - 20 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.
 - 21 Chirgwin, J.M., Przybyla, 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.
 - 22 Grausz, D., Dissous, C., Capron, A. and Roskam, W. (1983) Messenger RNA extracted from *Schistosoma mansoni* larval stages codes for parasite antigens when translated in vitro. Mol. Biochem. Parasitol. 7, 293-301.
 - 23 Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 - 24 Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25, 263-269.
 - 25 Huynh, T.V., Young, R.A. and Davis, R.W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in λ gt 10 and λ gt 11. In: DNA Cloning, a Practical Approach (Glover, D.M., ed.), Vol. 1, pp. 49-78, IRL Press, Washington, DC.
 - 26 Olmsted, J.B. (1981) Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. J. Biol. Chem. 250, 11955-11957.
 - 27 Kiény, M.P., Lathe, R. and Lecocq, J.P. (1983) New versatile cloning and sequencing vectors based on bacteriophage λ . Gene 26, 91-99.
 - 28 Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
 - 29 Lipman, D.J. and Pearson, W.R. (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227, 1435-1441.
 - 30 Young, B.D. and Anderson, M.L.M. (1985) Quantitative analysis of solution hybridization. In: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach. (Hames, B.D., Higgins, S.J., eds.), pp. 139-160, IRL Press, Washington, DC.
 - 31 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 M_{28K} protective antigen of *Schistosoma mansoni* EMBO J. 7, 465-472.
 - 32 Moeremans, M., Daneels, G., van Dijck, A., Langanger, G. and De Mey, J. (1984) Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining. J. Immunol. Methods 74, 353-360.
 - 33 Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jansson, H., Tahir, M.K., Warholm, M. and Jornvall, H. (1985) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7202-7206.
 - 34 Ding, G.J.F., Lu, A.Y.H. and Pickett, C.B. (1985) Rat liver glutathione S-transferase. Nucleotide-sequence analysis of Yb1 cDNA clone and prediction of the complete amino acid sequence of the Yb1 subunit. J. Biol. Chem. 260, 13268-13271.
 - 35 Ding, G.J.F., Ding, V.D.H., Rodkey, J.A., Benett, C.C., Lu, A.Y.H. and Pickett, C.B. (1986) Rat liver glutathione S-transferase. DNA sequence analysis of a Yb2 cDNA clone and regulation of the Yb1 and Yb2 mRNAs by phenobarbital. J. Biol. Chem. 261, 7952-7957.
 - 36 Ketterer, B., Meyer, D.J., Clark, A.G. (1988) Soluble glutathione transferase isoenzymes. In: Glutathione Conjugation: Its Mechanisms and Biological Significance (Sies, H. and Ketterer, B., eds.), pp. 73-135, Academic Press, London.
 - 37 Tu, C.P.D., Lai, H.C.J., Li, N., Weiss, M.J. and Reddy, C.C. (1984) The Yc and Ya subunits of rat liver glutathione S-transferases are the products of separate genes. J. Biol. Chem. 259, 9434-9439.
 - 38 Tu, C.P.D., Weiss, M.J., Karakawa, W.W. and Reddy, C.C. (1982) Cloning and sequence analysis of a cDNA plasmid for one of the rat liver glutathione S-transferase subunits. Nucleic Acids Res. 10, 5407-5419.
 - 39 Suguoka, Y., Kano, T., Okuda, A., Sakai, M., Kitagawa, T. and Muramatsu, M. (1985) Cloning and the nucleotide sequence of rat glutathione S-transferase P cDNA. Nucleic Acids Res. 13, 6049-6057.
 - 40 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.
 - 41 Velge-Roussel, F., Verwaerde, C., Grzych, J.M., Auriault, A. and Capron, A. (1989) Protective effects of anti-idiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* antigen. J. Immunol. 142, 2527-2532.
 - 42 Henkle, K.J., Davern, K.M., Wright, M.D., Ramos, A.J. and Mitchell, G.F. (1990) Comparison of the cloned genes of the 26- and 28-kilodalton glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 40, 23-34.

Les résultats exposés dans l'article 1 constituaient la première étape de notre programme, et il restait à approfondir certains points importants. L'obtention de la molécule recombinante s'avérait indispensable dans la poursuite de notre démarche.

1-2 Expression de la Sm26GST en *Escherichia coli*

L'expression de la Sm26GST en *Escherichia coli* a été réalisée en collaboration avec la Société Transgène à Strasbourg. L'insert G2-1 a subi une mutagenèse dirigée afin d'ajouter, en phase avec la cassette d'expression et en 5' du codon d'initiation ATG, un site Bgl II. Cette mutation a permis le sous-clonage de l'insert G2-1 dans le plasmide pTG959 en aval du promoteur pL du phage lambda (Brevet EP-0292404, Transgène S. A) et a ainsi donné naissance au vecteur pTG4170. Après transformation de la souche *E. coli* TGE901 par pTG4170, la production de la Sm26GST recombinante (Sm26GSTr), sous forme non-fusionnée, est assurée par choc thermique à 42⁰ C lors de la phase exponentielle de croissance des bactéries.

Si le taux d'expression de la Sm26GSTr est satisfaisant (10 à 15% des protéines totales, figure 5A, ligne b), nous avons toutefois été confrontés, après la lyse des bactéries, à des problèmes de solubilité et de rendement de purification (1 à 2 mg de Sm26GSTr / litre de culture). Cependant, la méthode standard de purification par chromatographie d'affinité sur colonne de GSH-agarose, permet l'obtention, à un haut degré de pureté (supérieur à 99%, figure 5A, ligne c), d'une molécule enzymatiquement active vis-à-vis du substrat synthétique : le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB). La valeur de l'activité spécifique de la Sm26GSTr (pTG4170) vis-à-vis du CDNB est de 60 ± 10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ tandis que celles de la Sm28GSTr (pTG54) et des SmGSTs sont respectivement de 90 ± 10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ et de 80 ± 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

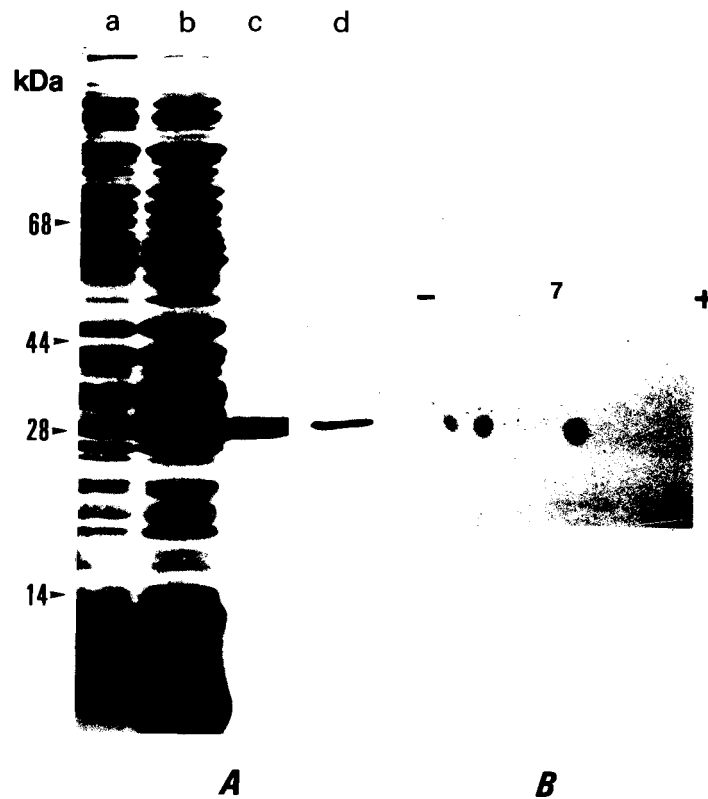


Figure 5 . Expression, purification et analyse de la Sm26GSTR.

(A)- Après culture de la souche TGE901/pTG4170, l'extrait cellulaire est centrifugé puis lysé dans le tampon EQ-2 contenant 0.2% Triton X-100. Après sonication et centrifugation, l'extrait soluble (ligne a) est passé sur une colonne de GSH-agarose. L'élution se déroule comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les fractions soluble (ligne a) et insoluble (ligne b) des extraits TGE901/pTG4170 sont analysées en gel de polyacrylamide coloré au Bleu de Coomassie. La fraction purifiée sur colonne de glutathion-agarose est représentée (ligne c) ainsi que son analyse en Western-blotting à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la Sm26GSTR (ligne d).

(B) - Analyse bidimensionnelle de la Sm26GSTR purifiée par chromatographie d'affinité selon Garrels et coll. (1979) . 10 µg de Sm26GSTR sont déposés dans le capillaire de première dimension (pH 4-8) et séparés sur gel de polyacrylamide à 13% coloré au Bleu de Coomassie.

L'analyse de la Sm26GSTR en gel bidimensionnel démontre la présence d'un tache majeure et de deux taches satellites migrant vers des pH basiques (Figure 5B). Des modifications biochimiques semblent donc exister pendant les étapes d'expression et/ou de purification de la molécule recombinante (déamidation,...) .

1-3 Exploration du pouvoir protecteur de la Sm26GSTR

Afin d'évaluer le pouvoir protecteur de la Sm26GSTR dans différents modèles expérimentaux d'infestation, différents protocoles d'immunisation ont été élaborés en collaboration avec le Dr Grezel dans notre laboratoire.

1-3-1 Dans le modèle expérimental du rat.

1-3-1-1 Protocoles expérimentaux

Des rats Fischer mâles de 8 semaines provenant d'Iffa-Credo (L'Arbresle, France) reçoivent deux injections sous-cutanées à 15 jours d'intervalle de 25 µg d'antigène en présence de 1.25 mg d'alun (groupes 3, 4, 5, 6) ou de 0.5 ml d'adjuvant complet de Freund (ACF, première injection intra-dermique, groupes 1, 2, 8, 9). Les rats sont saignés 13 jours après le rappel d'immunisation.

Les antigènes suivants ont été utilisés (voir Matériels et Méthodes) : Sm26GStr (groupes 1 et 3), Sm26GStr électroéluée (groupe 8), Sm28SWAP électroéluée (groupe 5) et BSA (groupes n° 6 et n° 9). Les rats des groupes n° 2 et n° 4 représentent les témoins ne recevant que l'adjuvant d'immunisation et le groupe n° 7 le témoin d'infestation. L'infestation est réalisée par passage transcutané de 1000 cercaires après anesthésie des animaux 30 jours après le rappel d'immunisation par la méthode de l'anneau (Smithers et coll. 1965c). La perfusion est pratiquée 21 jours après l'infestation sur les foies isolés et ligaturés. Après passage de liquide physiologique-héparine 1%-Tween 0.1% à travers les foies, les vers sont récupérés et comptés sous loupe binoculaire.

1-3-1-2 Réduction de la charge parasitaire

Dans chaque groupe, la moyenne du nombre de vers ainsi que les écarts types sont calculés et comparés aux groupes contrôles ne recevant que l'adjuvant d'immunisation. La significativité de la protection est calculée par un test t de Student. Les résultats de la perfusion sont illustrés Figure 6 pour le protocole alun et Figure 7 pour le protocole ACF.

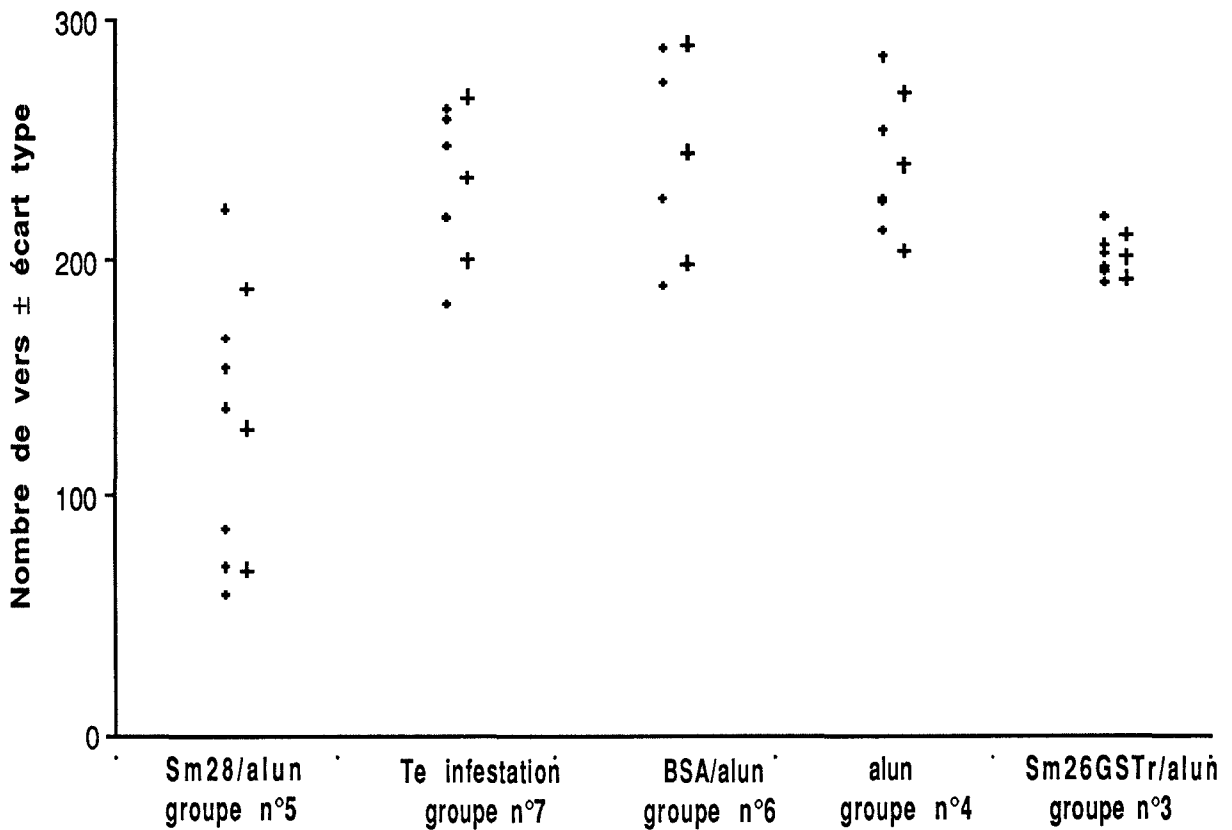


Figure 6 . Comparaison entre le nombre de vers récoltés par perfusion, dans les groupes de rats témoins et dans les groupes de rats immunisés par la Sm28SWAP et la Sm26GSTR en présence d'alun. Les moyennes et les écarts types pour chaque groupe sont indiqués.

Le groupe n° 5 (Sm28SWAP/alun), correspondant au contrôle positif, présente une réduction significative de la charge parasitaire de **45%** ($n = 7$, $p = 0.005$) par rapport aux groupes témoins alun n° 4 ($n = 4$) ou BSA/alun n° 6 ($n = 4$). De façon moins marquée, le groupe n° 3 (Sm26GST/alun) présente une diminution de la charge parasitaire de **17%** ($n = 7$) par rapport aux groupes témoins. Nous remarquons l'homogénéité des charges parasitaires individuelles relevées dans le groupe n° 3, ce qui rend l'expérience statistiquement significative avec $p = 0.03$.

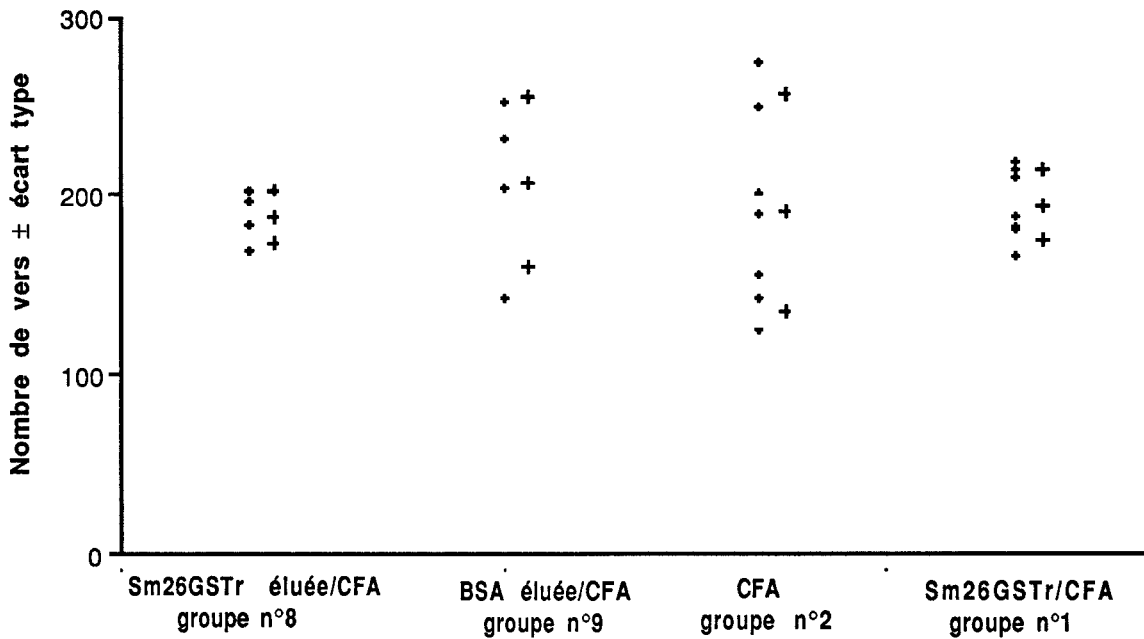


Figure 7 . Comparaison entre le nombre de vers récoltés dans les groupes de rats témoins et dans les groupes de rats immunisés par la Sm28SWAP et la Sm26GSTR en présence de CFA. Les moyennes et les écarts types pour chaque groupe sont indiqués.

La comparaison des moyennes des charges parasitaires ne démontre aucune différence significative entre les groupes n° 1 et n° 2. Cependant, dans le groupe n° 8, une réduction de 10% de la charge vermineuse est relevée par rapport au groupe témoin n° 9 ($p > 0.05$). De façon similaire au protocole alun, nous notons l'homogénéité des charges parasitaires individuelles chez les animaux immunisés par la Sm26GSTR contrairement aux groupes témoins où les écarts types sont plus importants.

1-3-1-3 Analyse de la réponse anticorps

La réponse humorale des rats immunisés est analysée par ELISA et Western-blotting (non montré). Les différents protocoles d'immunisation ont induit une réponse anticorps de type IgG, mais de façon plus intéressante les rats du groupe n° 3 (Sm26GST/alun) ont présenté une réaction IgE intense et spécifique anti-Sm26GSTR en Western-blotting (non montré). Une réponse de type IgE anti-Sm28GSTR a également été notée dans le groupe n° 5 (Sm28SWAP/alun).

Afin d'évaluer les propriétés biologiques des sérums, nous avons effectué des tests de

cytotoxicité *in vitro* en présence de schistosomules et de macrophages péritonéaux prélevés sur des rats non infestés (voir Matériels et Méthodes). Comme nous l'avons mentionné dans la partie introductive de notre mémoire, les anticorps et en particulier les IgE participent aux mécanismes effecteurs de l'immunité dans la schistosomiase et interviennent dans la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC).

En présence de macrophages, les sérums du groupe n° 3 (Sm26GST/alun) ont présenté une activité cytotoxique de $63 \pm 8 \%$ contre $36 \pm 1 \%$ avec le sérum témoin n° 4 (alun) et $55 \pm 12\%$ avec le sérum du groupe n° 5 (Sm28SWAP/alun). Cette cytotoxicité peut être réduite par chauffage des sérums à 56°C pendant 2 heures, ce qui suggère la participation des IgE anti-Sm26GSTr dans ce mécanisme larvicide.

1-3-1-4 Conclusion

Cette expérience préliminaire nous a permis d'extraire deux renseignements majeurs :

- en présence d'alun, la Sm26GSTr induit chez le rat une réponse IgE spécifique et cytotoxique *in vitro* vis-à-vis du stade larvaire de *S. mansoni* : les schistosomules.
- l'injection de la Sm26GSTr en présence d'alun induit chez le rat, après l'infection d'épreuve, une réduction de la charge parasitaire moyenne et significative.

Par la suite, en utilisant le même protocole d'immunisation (alun, 25 μg , 2 doses), nous avons reproduit ces résultats et obtenu **25%** de protection (n = 3).

groupe alun : 200, 216, 186 soit une moyenne de 200 ± 15 vers récupérés après perfusion.

groupe Sm26GST/alun : 169, 135, 148 soit une moyenne de 150 ± 17 vers récupérés après perfusion.

1-3-2 Dans le modèle expérimental de la souris

Afin d'évaluer les propriétés protectrices de la Sm26GSTr dans un autre modèle expérimental, nous avons étendu notre champ d'investigation au modèle de la souris. En effet, celui-ci permet d'appréhender certains phénomènes immunitaires, mis en place par l'animal,

autres que ceux qui sous-tendent à la protection. Ainsi, l'évaluation de la fécondité des vers femelles, de la pathologie hépatique (liée au dépôt des oeufs) et de la viabilité des oeufs (mesurée par le taux d'éclosion des miracidiums) est possible.

Un protocole similaire à celui pratiqué chez le rat est employé mais les doses antigéniques injectées sont de 1 µg par animal et l'infestation est réalisée avec 100 cercaires. La perfusion est pratiquée 30 jours après le rappel d'immunisation

A notre grande déception, que ce soit en termes de charge parasitaire ou du nombre et de la viabilité des oeufs, l'hétérogénéité des données individuelles recueillies a rendu l'expérience non significative et ininterprétable ($p > 0.05$).

1-3-3 Conclusion

Malgré des conditions d'adjuvantité probablement sub-optimales, la démonstration du pouvoir protecteur relativement moyen de la Sm26GSTr dans le modèle du rat semble être établie (17-25%). Il apparaît toutefois qu'une amélioration des protocoles d'immunisation permettrait probablement d'affiner les propriétés vaccinales de cet antigène : modification de la présentation antigénique (liposome, ..) et/ou utilisation d'immunostimulants (MDP, vecteurs vivants...). En effet, l'obtention d'un degré de protection important passe par une présentation optimale de l'antigène aux cellules du système immunitaire. A titre d'exemple, M. Strand aux Etats-Unis (communication personnelle), en utilisant une myosine-like molécule de *S. mansoni*, obtient des taux de protection oscillant entre 20 à 35% chez la souris avec des adjuvants classiques (ACF, alun) alors que 80% de réduction de la charge vermineuse sont enregistrés (95% chez le rat) par l'emploi d'adjuvant de type "protéosome" composé de la molécule majeure de surface du méningocoque.

1-4 Evaluation de la relation entre la Sm26GST et la SRP26

1-4-1 Introduction

A ce stade de notre travail, un point important concernait une éventuelle correspondance entre la GST de 26 kDa (Sm26GST) et l'antigène de 26 kDa excrété-sécrété par le schistosomule

(SRP26).

Pour cela, nous disposons de l'anticorps monoclonal B48-14, préparé par Verwaerde et coll. (1987), d'isotype IgE et dirigé contre un épitope de la SRP26. Si les propriétés biologiques de cet anticorps monoclonal sont nettes (haute cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules en présence de macrophages et induction d'une protection par transfert passif chez le rat), son isotypie et surtout sa faible affinité envers l'antigène ont rendu sa manipulation délicate. En employant différentes techniques (Western-blotting, dot-blotting, immunoprécipitation, ELISA et RIA), aucune reconnaissance n'a pu être mise en évidence entre la Sm26GST et la sonde anticorps B48-14. De la même manière, l'emploi de l'anticorps anti-idiotypique (Ab3, Velge et coll. 1991) ne nous a pas permis de mettre en évidence une réaction croisée avec la Sm26GST.

La seule alternative qui s'offrait à nous, était alors d'exploiter les propriétés biologiques de l'anticorps monoclonal B48-14 et notamment son pouvoir cytotoxique vis-à-vis des larves infestantes en présence de macrophages. L'inhibition de cette cytotoxicité par adjonction de Sm26GSTr dans le milieu de culture, conséquence possible d'une compétition entre la Sm26GST et la SRP26, constituerait un argument en faveur d'une relation structurelle entre ces deux molécules.

1-4-2 Utilisation de l'anticorps monoclonal B48-14

1-4-2-1 Définition des principes et conditions expérimentales

Ce travail a bénéficié des expertises du Dr M. Joseph et de H. Vorng. L'activité cytocide des macrophages se décompose en plusieurs événements : une étape d'activation cellulaire par fixation des IgE sur les cellules (via le récepteur $Fc\epsilon R_{II}$) puis une adhérence des cellules effectrices sur les schistosomules par liaison des anticorps sur les antigènes de surface des larves. Les macrophages activés libèrent alors des radicaux libres, des enzymes lysosomiales, des prostaglandines, du facteur d'activation des plaquettes (PAF), des leucotriènes... (Joseph et coll. 1980).

Dans le cadre de notre expérience, la première étape consistait à définir les dilutions de l'anticorps monoclonal B48-14 à utiliser (non montré). Pour une dilution finale dans le puits de culture inférieure au 1000^{ème}, le maximum de cytotoxicité est obtenu (60 à 70%) et chute pour

des dilutions comprises entre le 2000^{ème} et le 10.000^{ème}. Le seuil "non-létal" est atteint pour des dilutions supérieures au 10000^{ème}. Nous avons donc choisi, et cela durant toute l'expérience, une dilution au 1000^{ème} et vérifié que la cytotoxicité est liée à la présence d'IgE par chauffage à 56⁰ C pendant 2 heures.

Un sérum de rat infecté prélevé au 42^{ème} jour de l'infection (J42) donne un taux de mortalité des schistosomules de **75 à 85 %**.

Un sérum de rat sain donne une cytotoxicité moyenne de 20% et cette valeur constitue le bruit de fond. La valeur corrigée du taux de cytotoxicité du sérum à étudier est obtenue par soustraction de la valeur du taux de cytotoxicité de ce sérum par celle du sérum sain.

1-4-2-2 Test d'inhibition

Après incubation du B48-14 avec l'antigène, le pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité, est calculé en valeur corrigée (voir Matériels et Méthodes). Le nombre d'expériences réalisées par groupes expérimentaux ($n = x$) ainsi que les écarts types sont indiqués dans chaque figure.

1-4-2-2-1 Etablissement de l'innocuité des antigènes

Avant de débiter les tests d'inhibition, nous avons vérifié que l'addition d'antigène, qu'il soit sous forme native ou recombinante (jusqu'à 1 $\mu\text{g/puits}$), n'induisait pas de cytotoxicité non-spécifique en présence de macrophages, de schistosomules et de sérum sain (non montré).

1-4-2-2-2 Contrôle du système et exemple de calcul

Afin de valider la faisabilité de notre expérience, nous avons tenté d'inhiber l'activité cytotoxique d'un sérum anti-Sm26GStr par addition de Sm26GStr dans le milieu de culture (Figure 8).

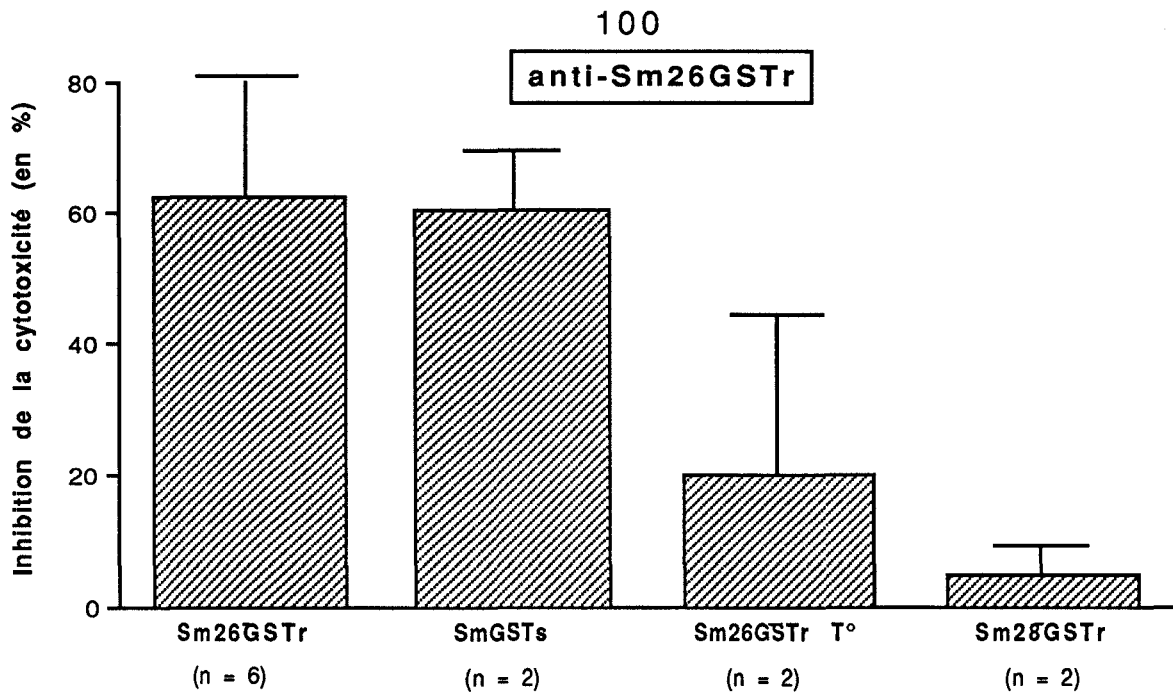


Figure 8 : Inhibition de la cytotoxicité induite par les macrophages en présence d'un sérum et de l'antigène contre lequel il est dirigé. Les pourcentages d'inhibition de la cytotoxicité induite par les macrophages du sérum anti-Sm26GSTR en présence de Sm26GSTR (100 ng), de SmGSTs (100 ng), de Sm26GSTR chauffé 3 minutes à 80⁰ C (100 ng) et de Sm28GSTR (100 ng) sont indiqués en valeur corrigée.

La Figure 8 démontre que la cytotoxicité induite par un sérum peut être en partie inhibée en présence de l'antigène contre lequel il est dirigé. En effet, le pourcentage de mortalité des schistosomules induit par le sérum anti-Sm26GSTR est de 60% et chute à 35% en présence de 100ng de Sm26GSTR/puits. L'inhibition de la cytotoxicité est donc de: $1 - (35 - 20 / 60 - 20) \times 100 = 62.5\%$. De la même manière, les GSTs natives de *S. mansoni* réduisent la mortalité des schistosomules de 60%. Le chauffage de la Sm26GSTR (destruction de certains épitopes et de l'activité enzymatique) restaure l'activité létale du sérum. Enfin, la Sm28GSTR (qui ne présente pas de réactions croisées avec le sérum anti-Sm26GSTR) ne modifie pas le degré de cytotoxicité du sérum, démontrant ainsi la spécificité du mécanisme.

1-4-2-2-3 Effet inhibiteur de la Sm26GSTR sur l'activité cytotoxique de l'anticorps monoclonal B48-14

Les effets de l'addition de doses croissantes de Sm26GSTR sur les degrés de cytotoxicité de l'anticorps monoclonal B48-14 sont illustrés Figure 9.

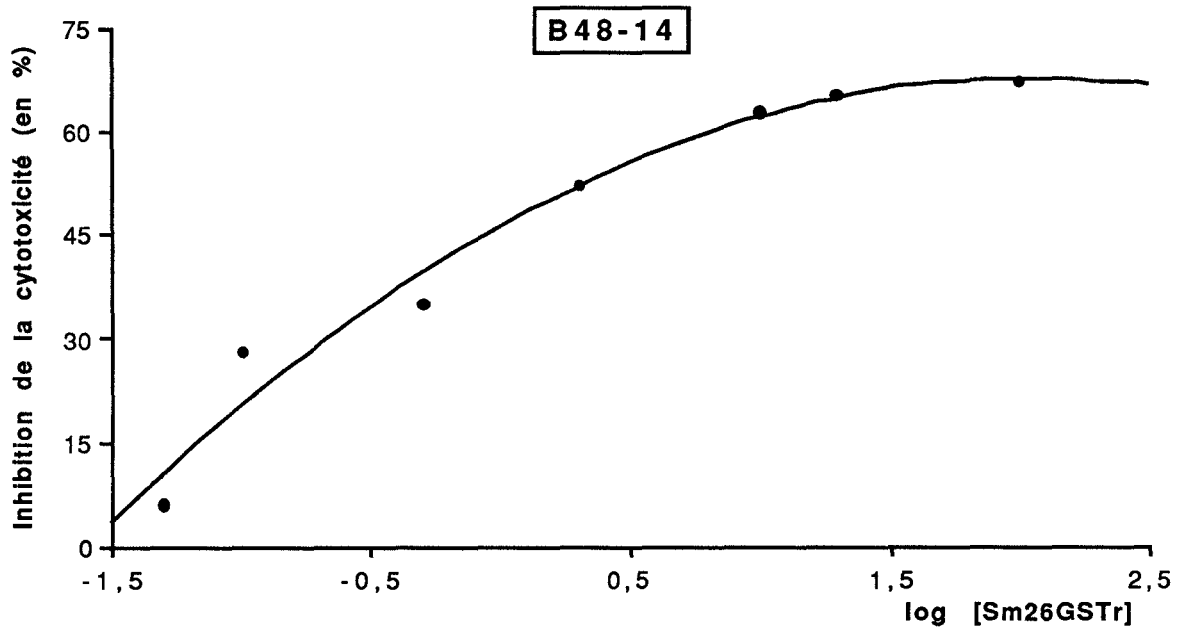


Figure 9 . Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de la cytotoxicité induite par les macrophages en présence de l'anticorps monoclonal B48-14 en fonction de quantité croissante de Sm26GSTR ajoutée dans le puits de culture. Le B48-14 est dilué au 1000^{ème} et les doses d'antigène varie de 0.5ng à 100 ng (en échelle logarithmique, 1 = 10ng; 2 = 100ng).

Nous constatons que l'augmentation de l'inhibition de la cytotoxicité (c'est à dire la diminution de la mortalité des schistosomules) est associée, de façon dose dépendante, à la présence de la Sm26GSTR. Au delà de 10 ng de Sm26GSTR/puits, le plateau maximal de l'inhibition est atteint et se situe autour de 63%.

A ce stade, nous pouvions donc supposer que l'inhibition de l'activité cytotoxique de l'anticorps monoclonal B48-14 était liée à la fixation de la Sm26GSTR sur celui-ci (par réaction antigène-anticorps et blocage des régions F(ab). Cependant, il restait à démontrer que cet effet n'était pas retrouvé dans un autre système de cytotoxicité. Nous avons choisi un sérum d'infection de rat prélevé à J42. Nous noterons que par ELISA nous n'avons mis en évidence qu'un très faible titre d'anticorps anti-Sm26GST dans le sérum J42.

1-4-2-2-4 Effet inhibiteur de la Sm26GSTR sur l'activité
cytotoxique du sérum d'infection J42

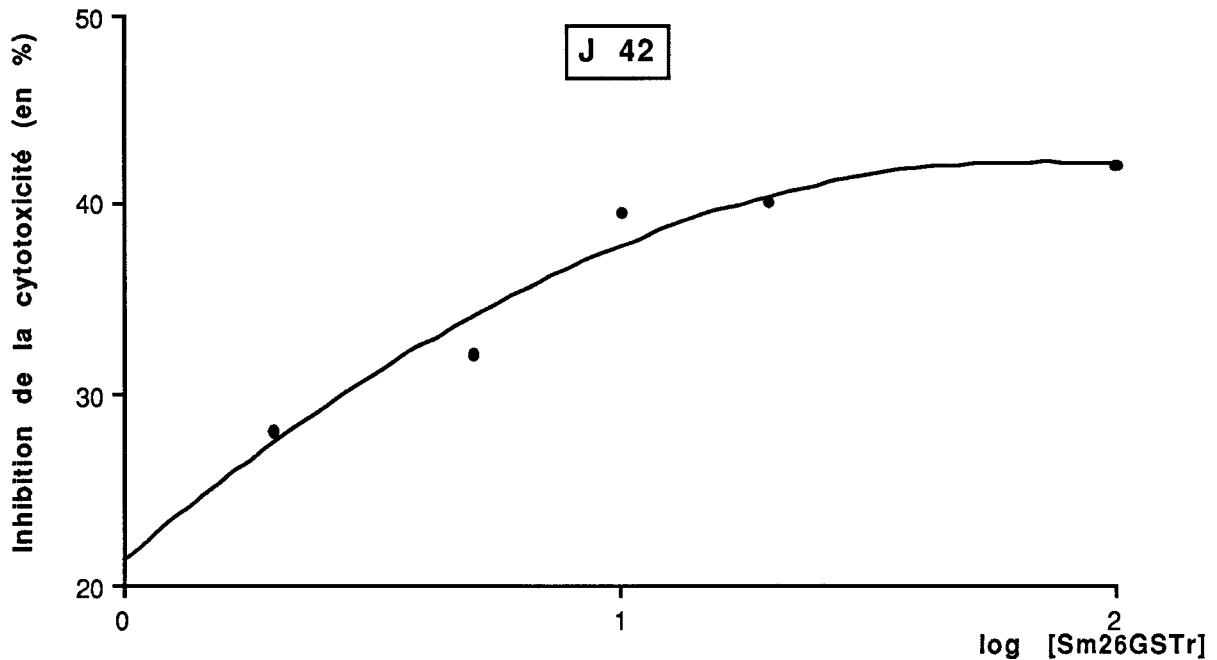


Figure 10 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de la cytotoxicité induite par les macrophages en présence du sérum d'infection J42 en fonction de quantité croissante de Sm26GSTR ajoutée dans le puits de culture. (en échelle logarithmique, 1 = 10ng; 2 = 100ng...).

De la même manière, l'addition de Sm26GSTR entraîne une inhibition de l'activité cytotoxique du sérum J42 et cela pour des doses comparables à celles qui inhibent l'activité cytotoxique de l'anticorps monoclonal B48-14. Le maximum d'inhibition avoisine 40% pour des doses égales ou supérieures à 10ng. Si, et de façon décevante dans le cadre de notre approche, l'inhibition de la cytotoxicité ne semblait pas restreinte au système de l'anticorps monoclonal B48-14, il fallait cependant à ce stade, découvrir l'origine de ce phénomène et démontrer qu'il était spécifique de la Sm26GSTR.

1-4-2-2-5 Contrôles expérimentaux

1-4-2-2-5-1 Par utilisation d'antigènes contrôles

Pour la suite de l'expérience, que ce soit avec le B48-14 ou le sérum J42, nous avons utilisé 10 ng de Sm26GSTR par puits. Les effets de l'addition d'antigènes témoins sur les pouvoirs cytotoxiques des macrophages en présence de l'anticorps monoclonal B48-14 ou du sérum d'infection J42 sont illustrés Figures 11 et 12.

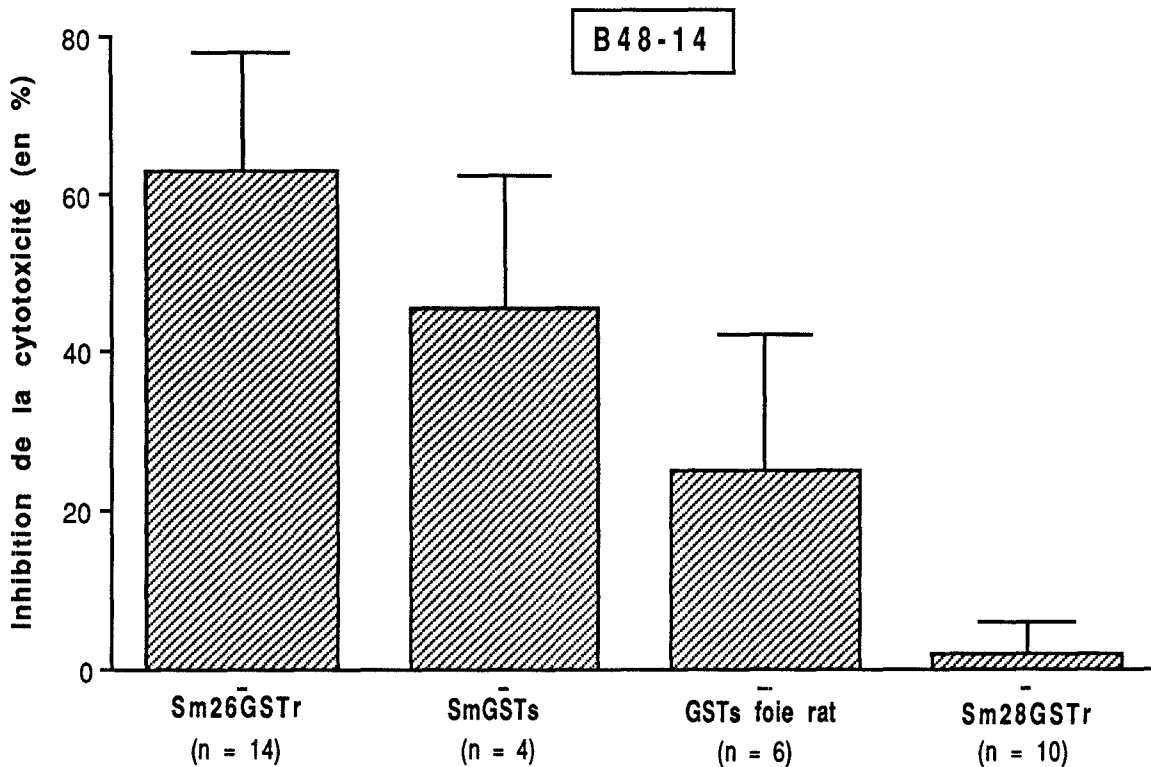


Figure 11 . Pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité induite par les macrophages en présence de l'anticorps monoclonal B48-14 suivant la nature de l'antigène ajouté dans le puits de culture : Sm26GSTR (10 ng), SmGSTs (100 ng), GSTs de foie de rat (100 ng) et Sm28GSTR (10ng).

La valeur moyenne de l'inhibition de la cytotoxicité induite par l'anticorps monoclonal B48-14 en présence de 10 ng de Sm26GSTR est de 63% et représente un résultat significatif ($n = 14$, $p > 0.01$). De façon logique, les GSTs natives de *S. mansoni* engendrent également une diminution marquée de la mortalité des schistosomules (53%). L'utilisation d'antigènes témoins révèle un degré d'inhibition de 25% avec les GSTs isolées du foie de rat et de façon contrastée aucune activité inhibitrice avec la Sm28GSTR.

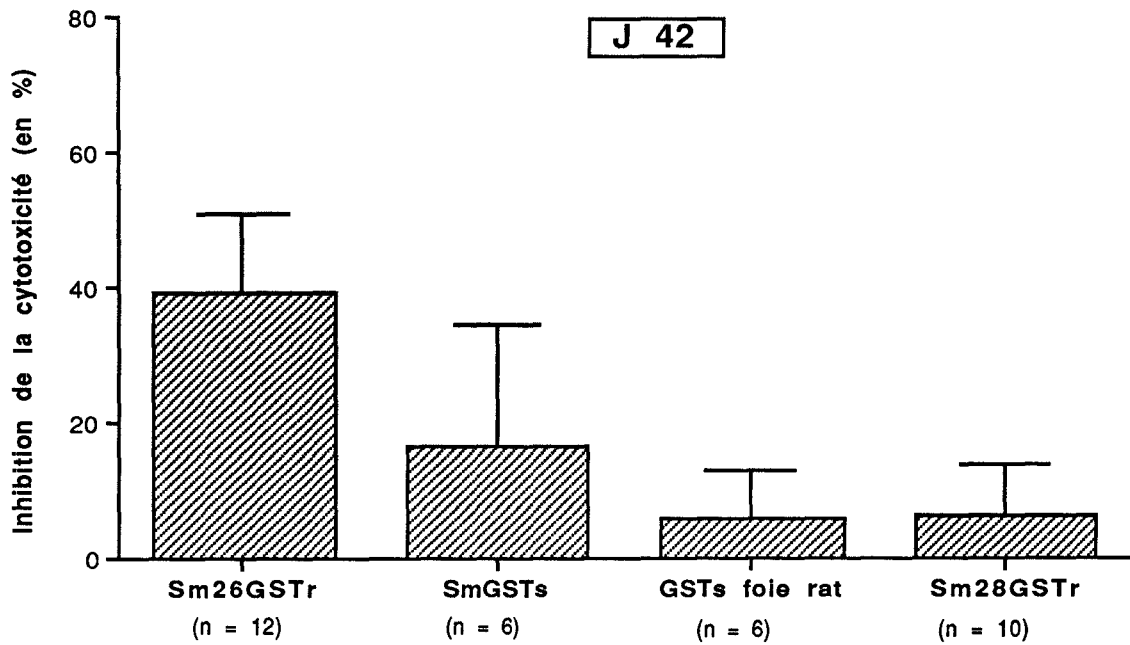


Figure 12 . Pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité induite par les macrophages en présence du sérum d'infection J42 suivant la nature de l'antigène ajouté dans le puits de culture : Sm26GSTR (10 ng), SmGSTs (100 ng), GSTs de foie de rat (100 ng) et Sm28GSTR (10ng).

Dans le cas de l'utilisation du sérum J42, l'addition de 10 ng de Sm26GSTR entraîne une réduction de mortalité des schistosomules de 40% (n = 12). Un effet comparable, mais de moindre amplitude, s'observe avec les SmGSTs (16.5%) tandis que les GSTs isolées du foie de rat et la Sm28GSTR n'induisent pas de diminution marquée de la cytotoxicité.

De façon comparable à la figure précédente, l'inhibition de la cytotoxicité semble spécifique de la Sm26GSTR par rapport aux GSTs isolées du foie de rat et de façon plus surprenante par rapport à la Sm28GSTR. Il restait cependant à démontrer que le phénomène de "protection des schistosomules" observé était lié à l'activité enzymatique de la Sm26GST.

1-4-2-5-2 Par inactivation de l'activité enzymatique de la Sm26GST

L'inactivation enzymatique de la Sm26GST devait logiquement restaurer les activités cytotoxiques des sérums. L'évaluation de l'efficacité des procédés d'inactivation repose sur le calcul des activités spécifiques des enzymes en présence ou en absence d'inhibiteurs. Deux méthodes d'inactivation ont été utilisées :

- chauffage à 80⁰ C pendant trois minutes: inactivation à 100 % : Sm26GST-T⁰
- addition d'inhibiteurs chimiques à une concentration de 100 μM / puits

(a) le produit A (propriété industrielle de Rhône-Poulenc Agrochimie) : inactivation de 10 à 40 % pour la Sm26GSTR et de 100% pour la Sm28GSTR : Sm26GST-A et Sm26GST-A

(b) le 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)-propane : inactivation à 100% pour la Sm26GSTR et pour la Sm28GSTR : Sm26GST-ép et Sm28GST-ép.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que le produit A ou le 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)-propane n'étaient pas toxiques pour les schistosomules et les macrophages (non montré).

Les Figures 13 et 14 illustrent les effets de l'inactivation enzymatique de la Sm26GST sur le pourcentage de mortalité des schistosomules en présence du B48-14 et du J42.

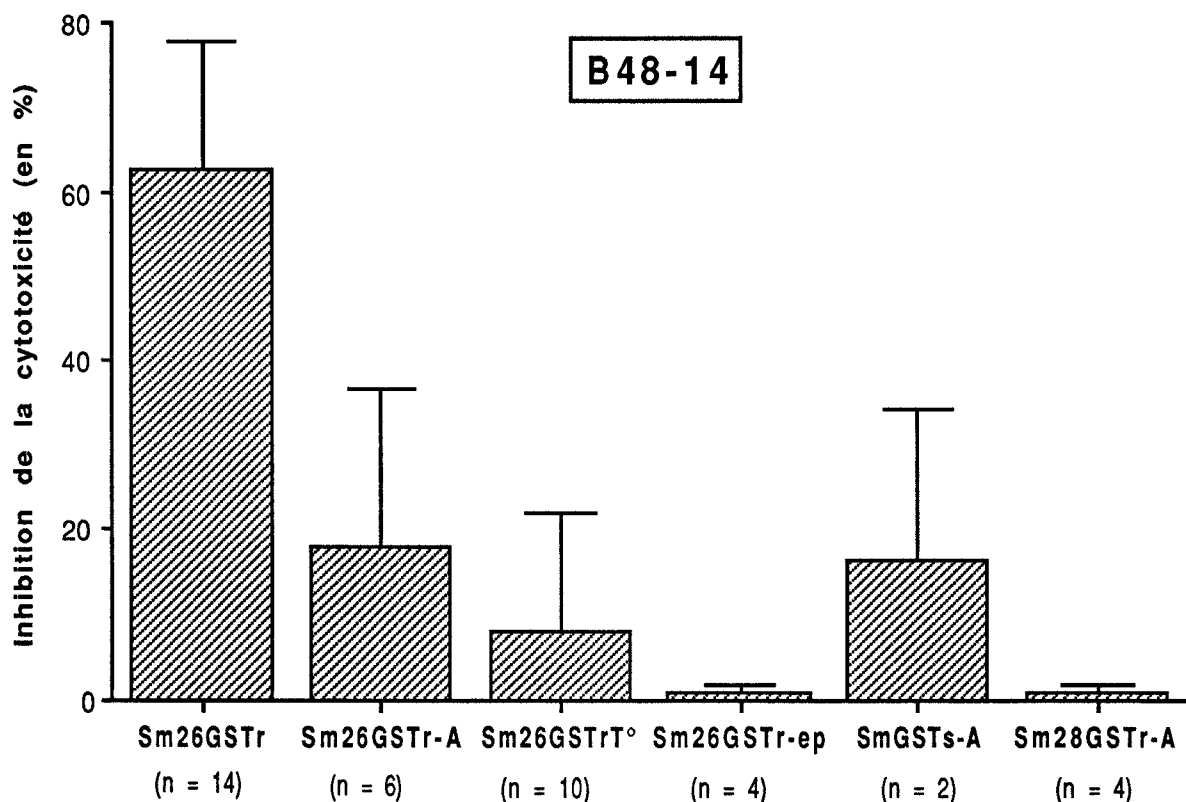


Figure 13 . Pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité induite les macrophages en présence de l'anticorps monoclonal B48-14 suivant l'activité enzymatique de l'antigène ajouté dans le puits de culture : Sm26GSTR (10 ng), SmGSTs (100 ng) et Sm28GSTR (10ng). Le produit A ou le 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)-propane est préincubé avec l'enzyme et les anticorps (Matériels et Méthodes) puis le tout est ajouté dans le puits de culture où sont cultivés les macrophages.

La destruction de l'activité enzymatique de la Sm26GST (qu'elle soit sous forme native ou recombinante) par chauffage ou addition d'inhibiteurs chimiques restaure l'activité cytotoxique de l'anticorps monoclonal B48-14. Nous voyons que le produit A, qui n'inhibe pas totalement l'activité enzymatique de la Sm26GST, ne réduit pas complètement l'activité détoxifiante de la

Sm26GST contrairement au 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)-propane.

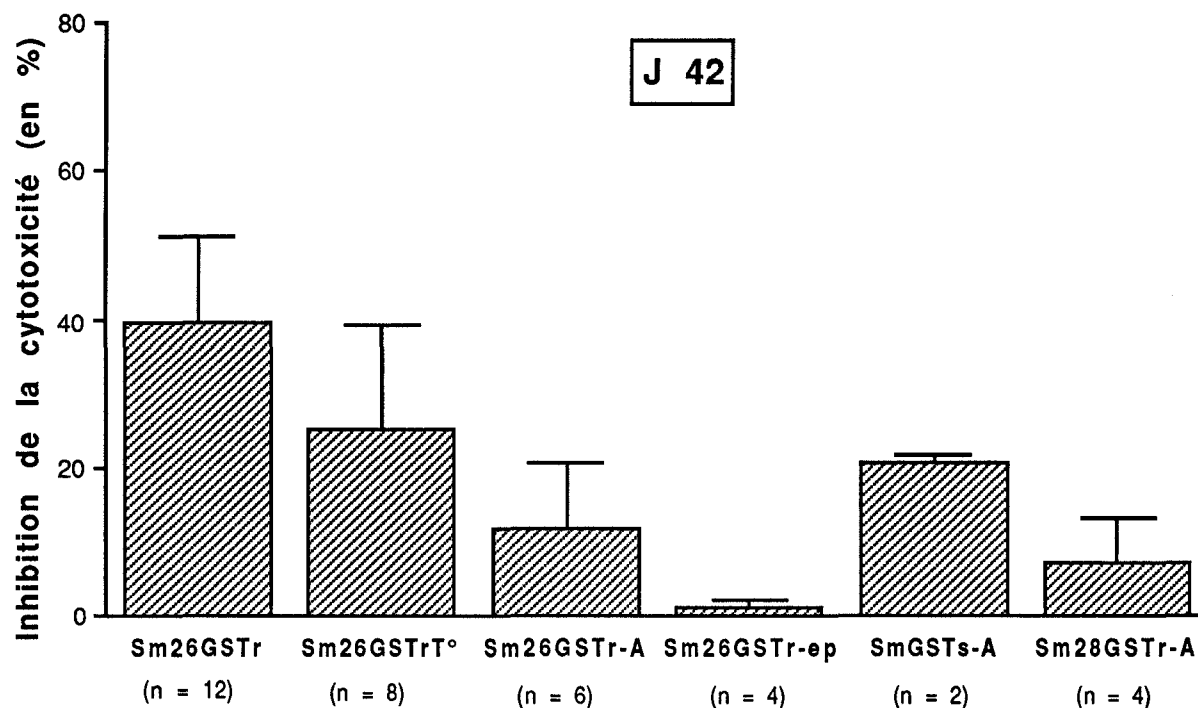


Figure 14 . Pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité induite par les macrophages en présence du sérum J42 suivant l'activité enzymatique de l'antigène ajouté dans le puits de culture : Sm26GSTR (10 ng), SmGSTs (100 ng) et Sm28GSTR (10ng).

De la même manière, l'inactivation thermique ou chimique de la Sm26GST entraîne une restauration de la cytotoxicité induite par le sérum J42. Il est possible que la fixation du produit A ou du 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)-propane sur l'enzyme modifie la conformation de celle-ci, empêchant ainsi sa reconnaissance par l'anticorps monoclonal B48-14. Cependant, le fait que la Sm26GSTR-A ou la Sm26GST-ép ne soit plus capable d'inhiber la cytotoxicité dans le système J42 écarte cette hypothèse.

Il semble donc, à la vue de ces résultats, que l'expression de l'activité enzymatique de la Sm26GST soit à l'origine des phénomènes d'inhibition de la cytotoxicité.

1-4-3 Conclusion

Si les techniques actuelles ne nous permettent pas de démontrer la correspondance biochimique entre la Sm26GST et la SRP26, nous avons cependant mis en évidence, dans un test de cytotoxicité *in vitro* en présence de macrophages, une activité détoxifiante de la Sm26GST vis-à-vis des schistosomules. "L'agression oxydative" des macrophages activés, via l'excrétion de composés toxiques pour le schistosomule (en particulier les radicaux libres), semble être largement atténuée par l'expression de l'activité enzymatique de la Sm26GST et cela de façon spécifique par rapport à la Sm28GST.

1/ Le fait que l'on ne puisse pas obtenir un degré d'inhibition supérieur à 60-65%, et cela dans différents systèmes cytotoxiques (B48-14, anti-Sm26GST et J42) laisse à penser que la totalité des mécanismes moléculaires létaux, mis en oeuvre par les macrophages activés, ne peut être contrôlée par l'activité enzymatique de la Sm26GST.

2/ L'hétérogénéité des systèmes de cytotoxicité B48-14 et J42 peut expliquer la différence entre les valeurs maximales des inhibitions engendrées par la Sm26GST dans ces deux modèles (63% contre 40% respectivement). En effet, le sérum J42 est un sérum polyclonal polyspécifique et possède, de plus, des facteurs cytotoxiques non-IgE dépendants (Bout et coll. 1986). Le sérum J42 pourrait alors provoquer une activation accrue des macrophages par rapport au système B48-14 (85% contre 65% de cytotoxicité respectivement). Les mécanismes létaux seraient alors différents suivant le type d'activation et plus ou moins bien contrôlés par la Sm26GST.

L'emploi d'un anticorps monoclonal cytotoxique en présence de macrophages, et non dirigé contre la Sm26GST, nous aurait probablement aidé à confirmer les propriétés détoxifiantes de la Sm26GST. Toutefois, à l'aide d'un sérum cytotoxique anti-Sm28GST, une inhibition de la cytotoxicité est également obtenue en présence de 10 ng de Sm26GST par puits ($66 \pm 11\%$, $n=2$, non montré).

Afin de confirmer la fonction détoxifiante de la Sm26GST, nous avons provoqué une cytotoxicité en présence de schistosomules et d' H_2O_2 (2mM). Le peroxyde d'hydrogène est en effet capable d'initier, par la voie d'Haber-Weiss, des peroxydations lipidiques à conséquence délétère pour la larve. De la même manière, et dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment décrites, nous avons constaté une réduction de la mortalité des schistosomules de $54 \pm 8\%$ ($n = 6$, non montré) par addition de 10 ng de Sm26GSTr/puits. Bien que les GSTs

n'aient pas d'action directe sur l' H_2O_2 , il semble que la Sm26GST intervienne dans la cascade des réactions biochimiques initiée par H_2O_2 et qui aboutit à la formation de dérivés hydroperoxydes et aldéhydiques létaux pour la parasite (voir Introduction).

2- Etude comparative des GSTs de *S. mansoni*

L'analyse comparative des deux composants moléculaires formant les SmGSTs est effectuée selon certains aspects biologiques, immunologiques et biochimiques.

2-1 Expression des SmGSTs au cours du cycle migratoire du schistosome

Nous avons recherché la présence puis évalué l'importance quantitative des SmGSTs aux différents stades du cycle évolutif du schistosome dans son hôte définitif : schistosomule, ver adulte et oeuf.

Le rapport 28/26 est donné par analyse densitométrique des gels colorés et l'estimation quantitative des SmGSTs dans l'extrait antigénique de départ (en %) est réalisée par la combinaison des rapports :

1/ (activité spécifique des SmGSTs dans l'extrait antigénique de départ) / (activité spécifique des SmGSTs purifiées) x 100.

2/ (quantité de protéines purifiées / quantité de protéines au départ) x 100. Nous ajouterons à ce stade, qu'aucune activité enzymatique vis-à-vis du CDNB n'est détectée dans l'effluent de la colonne GSH-agarose. La totalité de la fraction GST semble donc purifiée par chromatographie d'affinité.

Quelque soit le stade analysé, nous avons retrouvé des activités enzymatiques de type GST et avons purifié, à partir des extraits antigéniques de départ, les SmGSTs correspondantes (Figure 15).



Figure 15 . Analyse comparative de l'expression des SmGSTs au cours du cycle migratoire du schistosome. (A) Comparaison des profils électrophorétiques des SmGSTs suivant le stade évolutif du schistosome dans son hôte définitif. Pour chaque stade, schistosomule (ligne a), ver adulte (ligne b) et oeuf/miracidium (ligne c), les SmGSTs sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de GSH-agarose et sont analysées sur gel de polyacrylamide à 13% coloré au Bleu de Coomassie. Les schistosomules mécaniques sont préparés suivant la méthode de Ramalho-Pinto et coll. (1974) et les oeufs suivant celle de Boros et coll. (1970). (B) Comparaison des profils électrophorétiques des SmGSTs du stade adulte du schistosome suivant le sexe : Les vers adultes mâles (ligne a) et femelles (ligne b) sont séparés et lysés suivant la méthode classique. Les extraits antigéniques de départ sont utilisés pour le calcul des activités spécifiques vis-à-vis du CDNB et pour la chromatographie d'affinité.

L'ubiquité des SmGSTs démontre :

1/ l'importance métabolique de ces enzymes aux différents stades évolutifs du schistosome dans son hôte définitif.

2/ que les SmGSTs peuvent être des cibles potentielles de la réponse immune quelque soit le stade.

De façon surprenante, alors que le rapport 28/26 est identique aux stades adulte et schistosomule (20/1), celui-ci tend vers une valeur de 2 au stade oeuf/miracidium.

Au niveau quantitatif, les SmGSTs représentent 1% des protéines totales solubles aux stades adulte et oeuf/miracidium (activité spécifique : $2 \pm 0.5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) alors qu'elles ne

constituent que 0.5% des protéines totales au stade schistosomule ($1 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Ce résultat confirme les travaux de Narre et coll. (1988) mettant en évidence une augmentation parallèle du taux des GSTs et de la résistance aux agents oxydants au cours du cycle parasitaire. Par ailleurs, les activités spécifiques des extraits totaux du ver adulte mâle et femelle donnent respectivement les valeurs suivantes : $2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ et $0.7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Il semble donc que le mâle exprime trois fois plus de GSTs par rapport à la femelle, à quantité de protéines égales, et qu'il soit davantage impliqué dans les phénomènes de protection. Le rapport 28/26 est par contre sensiblement le même dans les deux sexes (Figure 15B).

L'ensemble de ces résultats a été confirmé par l'étude de la localisation ultrastructurale des GSTs chez *S. mansoni* (Taylor et coll. 1988 et Trottein et coll. 1990).

Nous noterons, au niveau de la relation hôte-parasite, que les GSTs de l'hôte intermédiaire *B. glabrata* ont été purifiées (27 et 25 kDa) mais n'ont démontré aucune communauté antigénique avec les SmGSTs.

2-2 Etude comparative des localisations ultrastructurales des SmGSTs

Les localisations ultrastructurales de la Sm28GST et de la Sm26GST sont rapportées par Taylor et coll. 1988 et Trottein et coll. 1990.

Au stade adulte, les SmGSTs sont détectées dans la région tégumentaire et dans les interdigitations des cellules du parenchyme sous-tégumentaire. Ces extensions, particulièrement abondantes au niveau des tubercules dorsales du ver mâle, sont riches en glycogène et en lipide. Il n'est donc pas surprenant de trouver les SmGSTs dans ces régions de stockage et de métabolisme intense. D'autre part, McLaren et coll. (1985) ont démontré que le mécanisme d'action schistosomicide des macrophages semble plutôt dirigé vers le compartiment sub-tégumentaire plutôt que contre la surface de la larve. La localisation majeure des SmGSTs dans cette région est donc logique avec les mécanismes de détoxification associés à ces enzymes. Il est à noter que les SmGSTs n'ont pas été détectées dans l'épithélium intestinal du schistosome (O'Leary et coll. 1988), contrairement à *F. hepatica* (Wijffels et coll. 1992).

La différence majeure de localisation entre les deux familles enzymatiques se situe dans la région protonéphridienne du ver adulte. Alors que la Sm28GST est essentiellement associée au cytoplasme des cellules tubulaires, la Sm26GST se localise massivement et spécifiquement dans

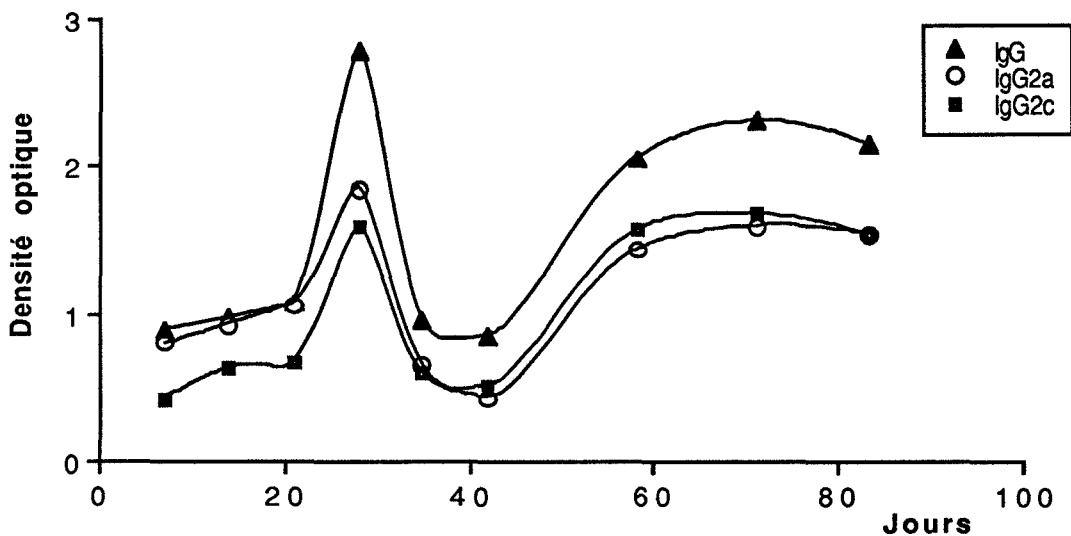
les digitations cytoplasmiques de la chambre apicale délimitée par la cellule flamme, suggérant une excrétion probable. Cette possibilité est d'ailleurs renforcée par le fait que l'on retrouve la Sm26GST dans les glandes acétabulaires du schistosomule (secrétion active lors de la pénétration de la cercaire à travers la peau). A ce stade, la Sm28GST a davantage une localisation tégumentaire et dans les glandes céphaliques qui interviennent dans la formation des membranes. Chez le miracidium, les SmGSTs sont présentes dans le système néphridien.

Aucune des deux formes des SmGSTs n'a été clairement identifiée à la surface du parasite. En immunofluorescence, nous n'avons pas mis en évidence la présence de la Sm26GST à la surface du ver adulte et du schistosomule (non montré). Cependant, la présence des SmGSTs dans la région sous-tégumentaire du ver adulte laisse penser que des lésions, mêmes mineures, pourraient entraîner une exposition temporelle de ces enzymes à la surface du parasite et même une libération dans le milieu extérieur.

2-3 Immunogénicité des SmGSTs au cours de l'infection expérimentale

L'immunogénicité naturelle des SmGSTs a été analysée de façon cinétique chez des rats Fischer et Brown Norway infestés de façon expérimentale par des cercaires de *S. mansoni*. Les réponses humorales, au cours de l'infection, vis-à-vis des SmGSTs (suivant les isotypiques) sont illustrées chez le rat Brown Norway Figures 16 et 17.

2-3-1 de la Sm28GST



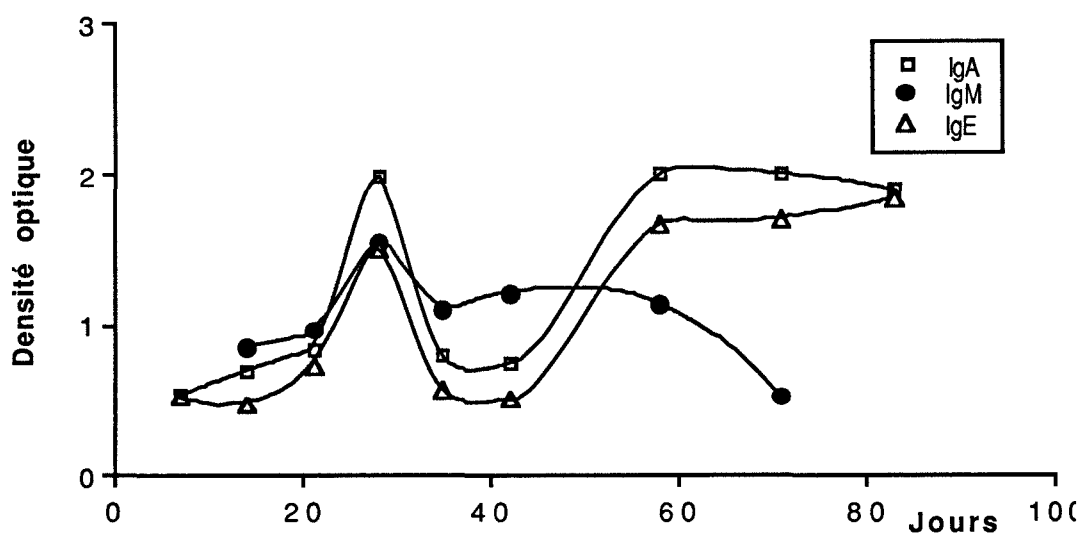


Figure 16 . Cinétique de la réponse humorale vis-à-vis de la Sm28GST au cours de l'infection expérimentale par *S. mansoni* chez le rat Brown Norway. Les rats sont saignés à différents temps après l'infestation et les sérums (collectés de 5 animaux différents) sont testés en ELISA contre la Sm28GSTr (0.3µg/puits). Les sérums sont utilisés à différentes dilutions suivant le type de révélation souhaitée : 400^{ème} en IgG totales, 200^{ème} en IgG2a, 100^{ème} en IgG2c, 100^{ème} en IgA, 200^{ème} en IgM et 100^{ème} en IgE. La révélation est réalisée soit avec un anticorps anti-IgG (H + L) de rat marqué à la peroxydase ou soit avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre un isotype particulier de rat puis finalement avec un anti-IgG (H + L) de souris marqué à la peroxydase. La lecture se fait à 492 nm avec comme révélateur l'orthophénylènediamine.

Chez le rat Fischer, aucune réponse humorale spécifique anti-Sm28GST n'a pu être détectée par les techniques du Western-blotting ou de l'ELISA (non montré). Chez le rat Brown Norway, l'ELISA révèle une augmentation progressive du titre en anticorps anti-Sm28GST jusqu'au 28^{ème} jour de l'infection (J28) pour les isotypes IgG (2a et 2c), E et A. Au delà de cette période, le titre diminue jusqu'à J42 pour ensuite atteindre une valeur maximale et constante vers J58. Le profil des IgM anti-Sm28GST démontre un pic à J28 puis une chute progressive jusqu'à J83. Ces résultats laissent penser que les stades précoces du cycle migratoire du schistosome (schistosomule ou ver adulte jeune) constituent la source antigénique originaire de la réponse anti-Sm28GST vers J28. Le fait que le titre en anticorps diminue de J28 à J42 laisse supposer l'existence de complexes immuns, non détectables en ELISA, liés à la libération de matériel parasitaire lors de l'élimination des vers par le rat vers J30 (phénomène du "self cure", Smithers et coll. 1972, Phillips et coll. 1975, Cioli et coll. 1976). L'existence d'un deuxième stimulus antigénique ainsi que la disparition des antigènes circulants expliqueraient l'augmentation progressive du titre après J42.

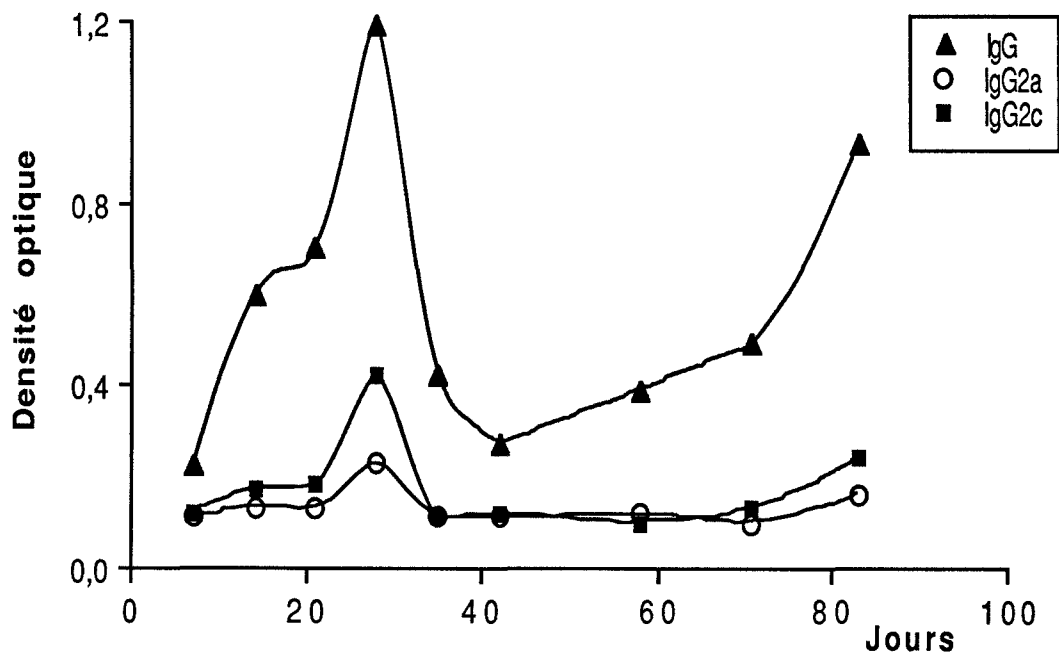
Dans le modèle de la souris BALB/c, Auriault et coll. (1990a) ont détecté une réponse

anticorps IgG dirigée contre la Sm28GST maximale au 35^{ème} jour de l'infection sans variation ultérieure du titre en anticorps. Une étude portant sur 129 enfants Kenyans vivant en zone d'endémie (Butterworth et coll. 1985) a révélé un taux de reconnaissance de la Sm28GST de 47% en IgG totales, 97% en IgE et 64% en IgA (Auriault et coll. 1990a).

L'ensemble de ces travaux démontre la bonne immunogénicité naturelle de la Sm28GST au cours de l'infection.

2-3-2 De la Sm26GST

Dans ce système, les sérums sont utilisés à des dilutions plus faibles.



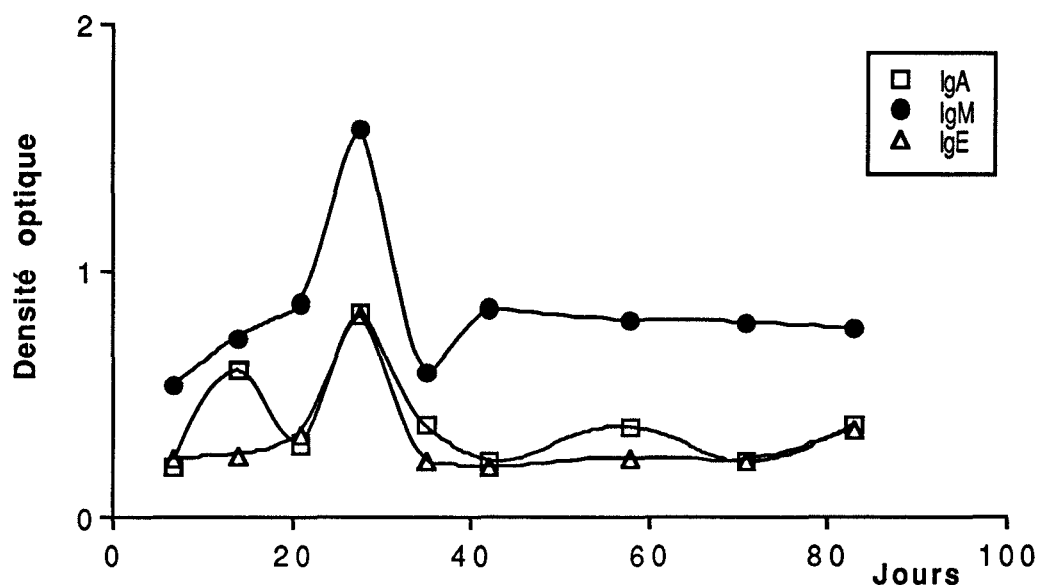


Figure 17 . Cinétique de la réponse humorale vis-à-vis de la Sm26GST au cours de l'infection expérimentale par *S. mansoni* chez le rat Brown Norway. Les sérums des rats sont testés en ELISA contre la Sm26GSTr (0.3µg/puits). Les sérums sont utilisés à différentes dilutions suivant le type de révélation souhaitée : 100^{ème} en IgG totales, 50^{ème} en IgG2a, 100^{ème} en IgG2c, 50^{ème} en IgA, 100^{ème} en IgM et 50^{ème} en IgE. La révélation est réalisée soit avec un anticorps anti-IgG de rat marqué à la peroxydase ou soit avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre un isotype particulier de rat puis finalement avec un anti-IgG (H + L) de souris marqué à la peroxydase. La lecture se fait à 492 nm avec comme révélateur l'orthophénylènediamine.

Aucune réponse humorale anti-Sm26GST n'est détectée en Western-blotting dans les sérums des rats infectés, tandis qu'en ELISA, un très faible titre d'anticorps spécifique est relevé chez le rat Brown Norway. La réponse présente un premier pic en IgG, M et E vers J28 et J15 pour l'IgA puis diminue progressivement pour reprendre une valeur maximale vers J80 pour le seul isotype IgG. Contrairement à la figure précédente, il n'y a pas d'augmentation ultérieure du titre pour les isotopes M, A et E.

La faible immunogénicité naturelle de la Sm26GST au cours de l'infection a été confirmée chez des sujets humains chroniquement infectés par *S. mansoni* au Kenya (M. Marguerite, communication personnelle). De la même manière, Lightowers et coll. (1989) ont identifié un faible titre en anticorps anti-Sj26GST (de faible affinité) chez des sujets humains mais n'ont pas établi de relation entre la prévalence de l'infection par *S. japonicum* et le titre d'anticorps anti-Sj26GST. De plus, par des méthodes très fines d'analyse, ces auteurs n'ont pas trouvé de complexes immuns circulants.

Les raisons de la mauvaise immunogénicité de la forme 26 kDa des GSTs de schistosome au cours de l'infection restent obscures : problème quantitatif ou d'accessibilité au système immunitaire, masquage d'épitopes immunodominants par fixation de dérivés lipidiques, temps

d'élimination très court (clearance).

2-4 Relations phylogénétiques entre les SmGSTs et les GSTs de vertébrés et d'invertébrés

Afin d'évaluer les relations phylogénétiques entre les SmGSTs et les GSTs de vertébrés et d'invertébrés (et particulièrement des helminthes), une recherche des homologies de séquence a été effectuée.

2-4-1 Comparaison entre la Sm28GST et la Sm26GST

La Sm28GST et la Sm26GST dérivent de deux familles géniques distinctes chez le schistosome et, quelque soit la technique employée, nous n'avons jamais mis en évidence la présence d'hétérodimère 28/26. Ce résultat est en accord avec les études réalisées sur les GSTs de mammifères.

Sm26GST	MAPKFGYWKVKGLVQPTRLLEHLEETYEERAYDRNEIDAWSNDKFKL-GLEFPNL	55
	K Y:: :G :::R: L : :YE: :R :::W:: K :: G :P::	
Sm28GST	MAGEHIKVIYFDGRGRAESIRMTLVAAGVDYED---ERISFQDWPKIKPTIPGGRLPAV	56
Sm26GST	PYYID-GDVK-LTQSMAIIRYIADKHNMLGACPKERAIEISMLEGAVLDIRMGVLRRIAYN	112
	: G: K : :S:AI RY:A:KH:M:G: :E ::::L G:: D: : : :	
Sm28GST	KVTDNHGHVKWMLESLAIARYMAKKHHMMGETDEEYYSVEKLIQAEQAEVEHEYHKTLMK	115
Sm26GST	KEYETLKV--DFLN-KLPGRKMFEDRLSNKT--YLNQNCVTHPDFMFLYDALDVVLYMD	166
	: E: K: ::LN K:P : :M: ::L:::T G: VT :D::L ::D V :D	
Sm28GST	PQEEKEKITKEILNGKVPVLFNMICESLKGSTGKLAVGDKVTLADLVLIIVIDHTDLD	174
Sm26GST	SQCL-NEFPKLVSFKKC-IEDLPQIKNYLNSSRYIKWPLQGWDFGGGDTPPK	218
	: L :::P:: : : : : : P:: :YL:::: : :	
Sm28GST	KGFLTGYKYPEIHKHRENLLASSPRLAKYLSNRPATPF	211

Figure 18 . Comparaison des séquences polypeptidiques entre la Sm28GST (Balloul et coll. 1987) et de la Sm26GST (Trottein et coll. 1990). La méthode d'alignement de Needleman et Wunsch a été employée et des délétions dans les séquences permettent une optimisation des degrés d'homologie (-). Les aa semi-conservés sont représentés par (:).

La comparaison des séquences polypeptidiques de la Sm28GST et de la Sm26GST démontre une identité globale de 24% (Figure 18). Cependant une région plus conservée apparaît dans la portion 68-84 (55% d'identité et 94% d'homologie sur 18 aa). Nous verrons par la suite que cette région abrite des aa conservés au sein des séquences des différentes familles des GSTs de mammifères, d'helminthes et de végétaux et constitue probablement le site de fixation du GSH (site G, Ketterer et coll. 1988).

Par ailleurs, une étude réalisée en Hydrophobic Cluster Analysis (HCA, non montrée) a permis de mettre en évidence une relation structurelle entre les deux formes des SmGSTs. Nous ajouterons qu'une région particulièrement conservée en HCA existe dans la partie C-terminale de toutes les GSTs analysées (J. P. Mornon, communication personnelle). Cette région intervient probablement dans le site actif des GSTs et notamment dans le site de fixation de l'agent électrophile (site H, Reinemer et coll. 1991).

2-4-2 Comparaison entre la Sm26GST et les GSTs de vertébrés et d'invertébrés

Avant d'aborder ce chapitre, nous mentionnerons qu'une deuxième forme enzymatique de 26 kDa à activité GST (la Sm26GST-2, masse moléculaire théorique 25,411 kDa) a été récemment identifiée et clonée chez *S. mansoni* (Wright et coll. 1991). Celle-ci, génétiquement distincte de la Sm26GST-1, possède 25% d'identité avec la Sm28GST et 82% d'identité avec la Sm26GST-1 (Figure 19). Le microséquencage de la partie N-terminale des SmGSTs a confirmé l'existence de cette deuxième forme enzymatique (Bouchon-Theisen. B, communication personnelle). Le P_i théorique de la Sm26GST-2 est plus basique que celui de la Sm26GST-1 (8.13 contre 5.92 respectivement) et permettrait en partie d'expliquer l'hétérogénéité des 26GSTs observée en gel bidimensionnel (Figure 1, article1). Chez les mammifères, des isoformes de GSTs peuvent coexister au sein d'un même organisme voire d'une même cellule (Ahmad et coll. 1990). Bien que ce phénomène soit mal compris, il est probable que la faculté du parasite d'exprimer les deux isoformes de 26 kDa crée de nouvelles spécificités ou activités enzymatiques liées à un mécanisme d'échappement participant à la survie du schistosome.

```

Sm26GST-1  MAPKF GYWKVKGLVQPTRLLLEHLEETYEERAY  DRNEIDAWSNDKFKLGLF 52
Sm26GST-2  ----L ----I-----Y-G-R----L-   ---DG-V-R-E-----D-
Sj26GST    -S-IL ----V-----Y---K---HL-   E-D-G-K-R-K--E-----
FhGST 51   -PA-L ----IR--Q--V--F--Y-G-E---HL- G-DDREK-FG---NM--DL
Yb1  GST    - -MIL---N-R--TH-I-----YTDSS---KR-AMG-APDY-RSQ-L-E----D-

Sm26GST-1  PNLPHYIDGDVKLTSMAIIRYIADKHNMLGACPKERAIEISMLEGAVLDIRMGVLR 108
Sm26GST-2  -----F-----L-----G-----I----Y----
Sj26GST    -----G-----Y--S-
FhGST 51   -----DKC-----V--M-----G---TT-E---L---I---AM-L---FV-
Yb1  GST    -----L---SR-I---N--M--L-R---LC-ETEE--IRADIV-NQ-M-N--QLIM

Sm26GST-1  IAYNKEYETLKVDFLNKLPGRKMFEDRLSNKTYLNGNCVTHPDFMPLYDALDVVLYMD 166
Sm26GST-2  -----F-----Q--M-----HN-----DK-----
Sj26GST    ---S-DF-----S--EM-----CH-----DH-----
FhGST 51   VC--PKF-EV-G-Y-KE--TT---WSNF-GDRH--T-SP-S-V---V-E---CIR-LA
Yb1  GST    LC--PDF-KQ-PE--KTI-EKM-LYSEF-GKRPWFA-DK--YV--LA--I--QYHIFE

Sm26GST-1  SQCLNEFPKLVSFKKCIEDLPQIKNYLNSSRYIKWP  LQGWDFGFGGDTTPPK 218
Sm26GST-2  PK--DN----I--QR--N--P-----N-----   ---S-----A---
Sj26GST    P---DA-----C--R--AI--DK--K--K--A--   ---Q-----H---
FhGST 51   P---ED----KE--SR-----K--A-ME-EKF----   -NS-I-S-----AA-A
Yb1  GST    PK--DA--N-KD-LARF-G-KK-SA-MK----LST-IFSK-AQ-SNK

```

Figure 19 . Comparaison des séquences polypeptidiques entre la Sm26GST et les GSTs d'helminthes et de vertébrés. La méthode d'alignement de Needleman et Wunsch a été employée et les délétions dans les séquences permettent un alignement optimal. Les aa conservés au sein des différentes séquences sont représentés par (-) : Sm26GST-1 (Trottein et coll. 1990), Sm26GST-2 (Wright et coll. 1991), Sj26GST (Smith et coll. 1986), FhGST51 (Panaccio et coll. 1992) et Yb1 (Ding et coll. 1985).

Mise à part la Sj26GST, les plus fortes homologies de séquence entre les Sm26GSTs et les GSTs d'helminthes se retrouvent avec les GSTs de *F. hepatica* (FhGST 51) dont on connaît l'actuel intérêt dans le domaine de la vaccinologie contre l'agent de la douve du foie (Sexton et coll. 1991). Quatre isoformes homologues (70 à 90% d'identité) ont été clonées et séquencées chez ce Trématode (Wijffels et coll. 1992 et Panaccio et coll. 1992). La Figure 19 montre une identité globale entre les Sm26GSTs et les FhGSTs comprise entre 52 et 56%. Comparée aux GSTs de mammifères, les Sm26GSTs montrent des identités élevées avec la famille μ (42-38%) et plus relâchées avec la famille π (33-28%) et α (32-28%). Il est difficile d'apparenter totalement la famille de 26 kDa des SmGSTs à une famille particulière de GST de mammifères d'un point de vue enzymatique bien que celle-ci possède de nombreuses caractéristiques de type μ (Crowley et coll. 1991).

En ELISA et dot-blotting (non montrée), des réactions croisées entre la Sm26GST et les GSTs de mammifères (isolées du foie de rat et de souris...) sont détectées mais pas en Western-Blotting suggérant l'existence d'épitopes conformationnels communs.

2-4-3 Comparaison entre la Sm28GST et les GSTs
de vertébrés et d'invertébrés

La Sm28GST est plus originale d'un point de vue phylogénique. En effet, elle est plus éloignée des GSTs de mammifères et d'invertébrés que ne l'est la Sm26GST. Nous ajouterons à ce stade qu'il est particulièrement remarquable qu'aucune GST apparentée à la forme 28 kDa des GSTs de schistosome n'ait pu être identifiée chez *F. hepatica* ni chez aucun autre helminthe dont les séquences de GST sont actuellement connues.

Chez les helminthes, excepté les autres espèces de schistosome (Henkle et coll. 1990 et Trottein et coll. 1992), la plus forte homologie (34% d'identité) est trouvée avec une GST isolée d'un Nématode (*C. elegans*, Weston et coll. 1989). Nous mentionnerons l'identification de 30% d'identité avec une GST isolée du cristallin de calmar (*O. sloanei*, Tomarev et coll. 1988).

D'un point de vue enzymatique, la Sm28GST possède des caractéristiques de type π (s.u 7-7) mais là encore, la classification au sein d'une famille particulière de GST est ardue (Taylor et coll. 1988). Comparée aux GSTs de mammifères, les degrés d'identité sont, par ordre croissant, de 28 à 26% avec la famille μ , de 28 à 25% avec la famille α et enfin de 25 à 23% avec la famille π . Cependant, trois zones de conservation plus prononcée, mises en évidence Figure 20, pourraient participer activement au mécanisme enzymatique ou au maintien de la structure tertiaire de la molécule.

	+7		+33
Sm28GST	KVIYFDGRGRAESI	RM TLVAAGVDY	ED
Yc rat	---YFDGRGR-E-I	R--L-AAGV--	E-
Ya rat	---YF--RGR-E-I	R--L-AAGV--	E-
Yp rat	---YF--RGR-E--	RM-L---G----	E-
Yb2 rat	---Y-D-RG-A--I	R -L-----Y	ED
Sm26GST	K--Y----G-----	R--L-----Y	E-
	+63		+91
Sm28GST	GHVKWMMLESLAIARYMAKKHHMMGETDEE		
Yb2 rat	G--K ---S-AI-RY---KH---GET-EE		
Sm26GST	G--K ---S-AI-RY-A-KH-M-G-----E		
Yc rat	G -K -----AI--Y-A-K----G-----		
Ya rat	G-----AI--Y-A-K----G-----E		
Yp rat	G--- ---S-AI-R-----G---E-		

	+152	+163
Sm28GST	VGDKVTLADLV	L
Yb4 rat	-GDKVT--D	- L
Yc rat	VG-----AD	V-L
Ya rat	VG---T--D--	L
Yp rat	VG-----AD--	L
Sm26GST	-----D-V	L

Figure 20 . Mise en évidence d'acides aminés conservés entre les GSTs de schistosomes et les GSTs de mammifères dans les régions 7-33, 63-91 et 152-163 : chaîne Yb4 de rat (Lai et coll. 1988), chaîne Yc de rat (Telakowski-Hopkins et coll. 1985), chaîne Ya de rat (Telakowski-Hopkins et coll. 1988), chaîne Yp de rat (Suguoka et coll. 1985) et la Sm26GST (Trottein et coll. 1990). Les aa conservés au sein des différentes séquences sont représentés par des lettres et les délétions dans les séquences permettent d'optimiser les alignements.

Malgré la mise en évidence de ces régions conservées, il semble qu'aucune réaction croisée en anticorps ne soient détectées entre la Sm28GST et les GSTs de mammifères (Balloul et coll. 1987) et particulièrement des GSTs isolées de foie de rat et de souris (non montré). D'autre part, l'analyse informatisée de la séquence de la Sm28GST ainsi que des études immunologiques démontrent que ces zones ne constituent pas les épitopes B majeurs de la molécule (Auriault et coll 1988).

3-Conclusion

Malgré des résultats de protection modeste mais significatif, la mise en évidence des propriétés de détoxification souligne l'importance métabolique de la forme 26 kDa des GSTs de schistosome. Cette molécule (ou certains de ses peptides) pourraient rentrer dans la composition d'un vaccin polyantigénique contre la schistosomiase.

L'analyse comparative de la Sm26GST et de la Sm28GST nous a permis de dégager des caractères communs (localisation ultrastructurale) et des différences majeures (caractéristiques biochimiques, expression au cours du cycle, immunogénicité au cours de l'infection, divergence de séquence). Il reste à déterminer le rôle métabolique respectif de ces deux enzymes chez le schistosome et à évaluer les mécanismes moléculaires responsables des phénomènes post-vaccinaux induits par immunisation avec les GSTs de schistosome.

ETUDE COMPARATIVE DES GLUTATHION-S-TRANSFERASES CHEZ LES ESPECES MAJEURES DE SCHISTOSOME

*

Introduction

*

Dans l'optique d'une campagne de vaccination pouvant être étendue aux différentes formes de schistosomiase humaine (à caractères intestinale et urogénitale) et animale, il était important d'étudier les GSTs chez les espèces majeures de schistosome infectant l'homme (*S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*) et le bétail (*S. bovis*). Cette étude passait, dans un premier temps, par le clonage moléculaire des gènes codant pour les GSTs de 28 kDa (28GSTs). En effet, malgré la mise en évidence de réactions immunologiques croisées entre les 28GSTs des différentes espèces de schistosome (Balloul et coll. 1987b), aucun argument expérimental nous permet de prédire qu'un effet vaccinal puisse être obtenu par immunisation avec la Sm28GST en système hétérologue d'infestation.

Des expériences de vaccination en système interspécifique démontrent la réelle nécessité d'utiliser des antigènes homologues lors d'essais de protection. Le babouin primo-infesté par *S. haematobium* est protégé contre une infection par *S. haematobium* mais pas contre *S. mansoni* (Webbe et coll. 1979). De la même manière, l'infestation de rongeurs par des cercaires irradiées de *S. bovis* protège contre l'infection par *S. haematobium* mais pas contre l'infection par *S. mansoni* (Agnew et coll. 1989).

De manière plus ciblée d'un point de vue moléculaire, une expérience préliminaire d'immunisation, menée au Soudan sur des bovins avec la Sm28GSTr, suivie d'une infestation naturelle par des cercaires de *S. bovis*, ne permît malheureusement aucune conclusion. Les faibles niveaux de transmission dûs à une période antérieure de sécheresse ne permirent pas une infestation naturelle suffisante (Boulanger et coll. 1991b). Toutefois, Boulanger et coll. (1991b) ont observé, chez le singe *patas patas* immunisé par la Sm28GSTr puis infesté par des cercaires de *S. haematobium*, une diminution de la ponte et une réduction des lésions vésicales analysées

par échotomographie. De façon contrastée, aucune protection significative ne fut obtenue dans ce système. Ce résultat peut trouver son explication au niveau des différences moléculaires entre la Sh28GST et la Sm28GST :

1/ Conservation des épitopes impliqués dans les phénomènes "anti-fécondité" (régions C- et N-terminales, Xu et coll. 1992).

2/ Modification des sites épitopiques impliqués dans la protection (région 115-131, Wolowczuk et coll. 1991b).

On comprend donc l'intérêt de cloner la GST de 28 kDa chez *S. haematobium* (agent étiologique majeur de la bilharziose en Afrique avec *S. mansoni*) et d'estimer ainsi les variations séquentielles au sein des régions immunologiquement stratégiques de la molécule. D'autre part, l'intérêt porté aux GSTs chez les autres espèces de schistosome a été récemment amplifié par les résultats résumés ci-dessous.

1- Démonstration du pouvoir protecteur des GSTs de *S. bovis* chez des bovins infestés par des cercaires de *S. bovis*

En collaboration avec les Dr Taylor de la London School of Tropical Medicine and Hygiene et Bushara de la Medical and Veterinary Faculty of Khartoum au Soudan, nous avons évalué le pouvoir protecteur des GSTs natives de *S. bovis* (SbGSTs) chez des bovins infestés de façon expérimentale par des cercaires de *S. bovis*.

Les vers de *S. bovis* ont été récupérés sur des bovins infectés dans la région de Khartoum. La purification des GSTs (voir Matériels et Méthodes), à partir des vers adultes de *S. bovis*, a permis l'obtention d'une quantité suffisante de matériel pour immuniser 10 veaux dans une expérience préliminaire. L'analyse biochimique des SbGSTs utilisées pour les immunisations est présentée dans l'article n° 2.

1-1 Protocole expérimental

Deux groupes de 10 veaux sont séparés : le premier correspond au témoin adjuvant seul et le second aux SbGSTs plus adjuvant. 190 µg de SbGSTs sont injectés par voie intra-musculaire en présence d'ACF à 15 jours d'intervalle (J0 et J15). A J28, une dose de 0.96 mg de SbGSTs

est réinjectée dans les mêmes conditions. L'infestation des veaux par 15 000 cercaires de *S. bovis* est pratiquée à J35. L'excrétion fécale des oeufs est suivie à partir de la 6^{ème} semaine et la perfusion effectuée à la 17^{ème} semaine.

1-2 Résultats

Dans le groupe témoin, 6 des 9 veaux présentèrent des diarrhées sévères et moururent au bout de 12 semaines, alors qu'un seul veau du groupe vacciné développa les mêmes symptômes.

De façon spectaculaire, les veaux vaccinés présentèrent, entre la 6^{ème} et la 10^{ème} semaine, une réduction moyenne de l'excrétion fécale des oeufs de 66% avec un pic de 82.5% à la 9^{ème} semaine (Tableau 3).

semaines	5	6	7	8	9	10
Contrôle	25±4	14±23	122±116	161±130	182±117	173±172
SbGSTs (2 doses)	3±4	6±6	32±31	50±45	32±44	66±85
Réduction		56.4%	73.9%	68.8%	82.5%	62.1%
P		NS	S	S	S	S

Tableau 3 . Mise en évidence de la diminution de l'excrétion fécale des oeufs chez des veaux immunisés par les GSTs de *S. bovis*. La cinétique du nombre d'oeufs émis, représentée en unités/gramme de selle, est suivie entre la 6^{ème} et la 10^{ème} semaine post-infection dans les groupes immunisés (n = 10) ou non-immunisés (n = 9). La significativité des résultats (test de student) est représentée par S (si p est inférieur à 0.05) et par NS (si p est supérieur à 0.05).

Le rapport d'autopsie des veaux sacrifiés à la 17^{ème} semaine révéla une diminution marquée et significative de 54% des oeufs hépatiques et de 68% des oeufs présents dans l'intestin large. Malgré une forte calcification, aucune diminution du nombre d'oeufs dans l'intestin grêle ne fut notée dans le groupe vacciné. La diminution de la charge vermineuse fut de 54% dans le groupe immunisé par les SbGSTs (non significatif).

Une deuxième expérience d'immunisation, visant à confirmer la première, fut alors reconduite à l'aide d'un protocole d'immunisation sensiblement différent.

Un premier groupe de 10 veaux fut immunisé avec 2 doses de SbGSTs (240 µg ; J0 et J105) et un second groupe avec 3 doses de SbGSTs (240 µg, 240 µg et 960µg ; J0, J14 et J28). L'infection d'épreuve par 10 000 cercaires a lieu 7 jours après le dernier rappel d'immunisation.

De façon identique à la première expérience, la réduction de la charge parasitaire ne fut pas significative. Cependant et de façon encourageante, les protocoles de double et de triple injection conduisirent à une réduction spectaculaire (et durable) de l'excrétion fécale des oeufs, de l'ordre de **60 à 75%** comme le montre le Tableau 4.

semaines	5	6	7	8	9	10	11	12
Contrôle	2±5	24±11	112±67	140±55	156±42	147±21	156±26	149±23
SbGSTs (3 doses)	1±1	6±5	53±20	64± 37	63± 40	54±32	53±27	40±23
Réduction P		72.6% S	56.6% S	54.5% S	59.3% S	63.3% S	66.1% S	72.8% S
SbGSTs (2 doses)		4±3	32± 22	42±27	43±27	43±27	46±18	40±15
Réduction P		84.8% S	68.4% S	69.7% S	72.4% S	71.1% S	70.6% S	72.9% S

Tableau 4 . Mise en évidence de la diminution de l'excrétion fécale des oeufs chez des veaux immunisés par les GSTs de *S. bovis*. La cinétique du nombre d'oeufs émis, représenté en unités/gramme de selle, est suivie de la 5^{ème} à la 12^{ème} semaine post-infection dans les groupes immunisés (2 ou 3 doses de SbGSTs, n = 10) ou non immunisés (n = 9). La significativité des résultats (test de student) est représentée par S (si p est inférieur à 0.05) et par NS (si p est supérieur à 0.05).

Après sacrifice des animaux, et suivant les deux groupes vaccinés (2 doses ou 3 doses), une diminution marquée et significative du nombre d'oeufs présents dans les tissus fut notée :

- **57 à 43%** des oeufs hépatiques ($0.0123 < p < 0.086$)
- **83 à 82%** des oeufs présents dans l'intestin large ($p = 0.0001$)
- **86 à 80%** des oeufs présents dans l'intestin grêle ($0.001 < p < 0.006$).

Ces résultats confirment, dans le modèle bovin/*S.bovis*, l'observation initiale selon laquelle

la fécondité des vers femelles peut être dramatiquement altérée par l'immunisation avec les GSTs de schistosome. L'impact d'une telle expérience est évident, tant sur le plan de la transmission de la maladie que sur le plan de la pathologie qu'elle entraîne.

Ces résultats laissent entrevoir avec optimisme le contrôle de la schistosomiase bovine à l'aide de vaccins moléculairement définis, et particulièrement à base de GSTs. Cependant, il est évident que ce type de préparation ne peut être envisagé à grande échelle et le clonage moléculaire puis l'expression de la Sb28GST s'avéraient donc indispensables.

2-Variations interspécifiques des GSTs de 28 kDa de schistosome

ARTICLE 2

2-1 Caractérisation biochimique et analyse comparative des GSTs chez les quatre espèces majeures de schistosome

Les GSTs de *S. mansoni* (SmGSTs), *S. haematobium* (ShGSTs), *S. japonicum* (SjGSTs) et *S. bovis* (SbGSTs) sont purifiées à partir des vers adultes. Chez ces quatre espèces de schistosome, la teneur moyenne en GSTs est uniforme (1% des protéines solubles totales) et le rapport 28/26 est sensiblement le même (20/1), sauf chez *S. japonicum* où les deux formes 28 et 26 kDa sont exprimées de façon similaire (1/1) (Figure 21A).

La Figure 21 démontre la présence de réactions immunologiques croisées entre les GSTs de 28 kDa, et également entre les GSTs de 26 kDa, chez les quatre espèces de schistosome analysées. Le même résultat est obtenu par immunoprécipitation des produits de traduction des vers adultes par le sérum anti-Sm28GST (Figure 21C). L'analyse comparative en gel bidimensionnel des quatre préparations de GSTs est illustrée dans l'article 2 (Figure 1).

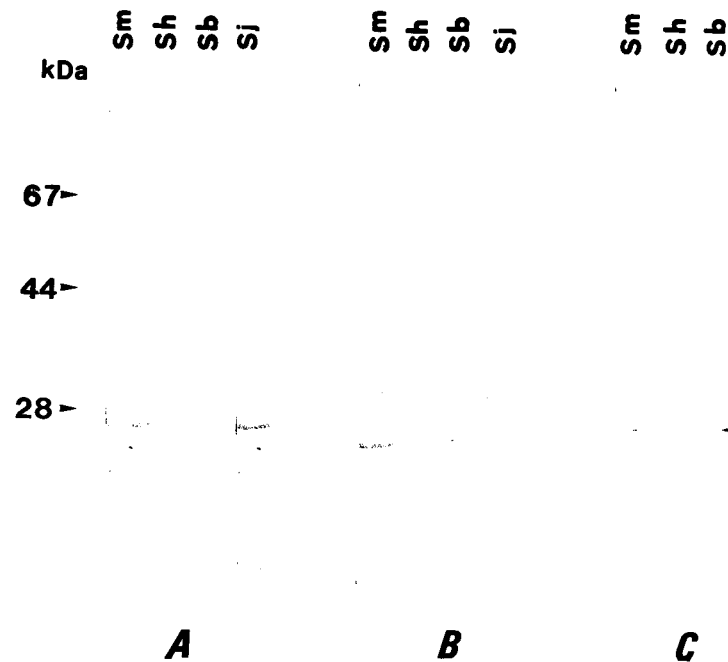


Figure 21 . Mise en évidence de communautés antigéniques entre les GSTs de schistosome. (A-B) Immunorévélation des GSTs de *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. bovis* et *S. japonicum* par un sérum de lapin anti-Sm28GST (A) ou anti-Sm26GST (B) par la technique du Western-blotting. 10 µg de GSTs purifiées sont séparées par SDS-PAGE à 13% puis électrotransférées sur filtre de nitrocellulose. Le sérum, dilué au 200^{ème} dans du PBS-BSA (3%, p/v), est incubé toute la nuit à 4⁰C. Après lavage, la révélation se déroule avec un anticorps anti-IgG (H +L) de lapin marqué à la peroxydase puis avec le 4-chloro-1-naphtol.

(C) Immunoprécipitation des produits de traduction des ARNs totaux de *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. bovis* par la sonde anti-Sm28GST. 100 000 cpm sont préincubés avec 10 µl de sérum puis avec 10 µl de protéine A-sépharose (10%, p/v). Après lavage et SDS-PAGE, les immunoprécipitats sont analysés par autoradiographie.

2-2 Clonage moléculaire de la Sh28GSTet de la Sb28GST

La construction des banques d'expression dans le vecteur λgt11 a été réalisée à partir des ARN messagers des vers adultes de *S. haematobium* et de *S. bovis*. L'immunocriblage de 3 10⁵ phages recombinants indépendants, par la sonde anticorps anti-Sm28GST, nous a permis d'isoler des clones dont les séquences correspondaient aux gènes recherchés. Si la copie complète de l'ADNc codant pour la Sb28GST est obtenue, il a fallu employer la technique de la "primer extension" pour caractériser les 7 bases manquantes de la partie N-terminale de la Sh28GST. La description des clones et l'analyse des séquences sont illustrées dans l'article 2.

Deux séquences différentes correspondant à la Sb28GST (98% d'identité) sont rapportées.

La comparaison des séquences en aa des Sm28GST (Balloul et coll. 1987), Sh28GST, Sj28GST (Henkle et coll. 1990) et Sb28GST est décrite.

La comparaison des 4 séquences polypeptidiques des GSTs de 28 kDa chez les 4 espèces principales de schistosome infectant l'homme et le bétail nous a permis de dégager les points suivants :

- Les homologies globales entre la Sh28GST et la Sb28GST sont élevées (98% d'identité) et plus relâchées avec la Sm28GST (92-90%) et avec la Sj28GST (78-77%). En fait, il est admis que *S. haematobium* et *S. bovis* sont des espèces très voisines l'une de l'autre et il est donc logique d'obtenir une telle identité. La divergence entre la Sj28GST (78%) et les autres 28GSTs va dans le sens de l'éloignement géographique de *S. japonicum* par rapport aux autres espèces de schistosomes Africains.

- 75% des aa sont invariables au sein des quatre séquences de 28GSTs, ce qui suggère une certaine identité structurelle entre ces enzymes. Il est probable que la majorité des aa variables soient situés à la surface de la molécule comme cela a été observé par Reinemer et coll. (1991). En effet, ces auteurs ont déterminé la topographie d'une GST de classe π et constaté que la majorité des aa variables (par comparaison avec divers séquences de GSTs de classe π de mammifères) correspondaient aux aa présents à la surface de la molécule. Nous pouvons penser que la sélection biologique est moins forte au niveau des régions ou des aa non-impliqués dans les processus enzymatiques.

- Deux zones particulièrement conservées sont détectées : 32-54 (96% d'identité) et 171-189 (95% d'identité). Une analyse informatisée des séquences des 28GSTs (Pcgene, programme hydrophathy) nous indique que la région 171-189 correspond à une zone hydrophobe.

- Des différences au sein des régions épitopiques de la Sm28GST sont relevées par rapport aux autres séquences. Il restait à évaluer, de façon expérimentale, l'incidence de ces mutations sur la conformation finale de la molécule ainsi que leurs conséquences sur le plan immunologique.

2-3 Définition d'épitopes spécifiques d'espèces

L'utilisation de sondes anticorps spécifiques, obtenues par immunisation de rats avec les peptides 24-43, 115-131 et 190-211 (correspondant à la séquence de la Sm28GST), nous a permis d'observer des différences dans les pouvoirs de reconnaissance de ces sondes vis-à-vis des formes de 28 kDa suivant les espèces de schistosome analysées :

1/ Seule la Sh28GST n'est pas reconnue par la sonde anti 115-131.

2/ Seule la Sj28GST ne réagit pas avec les sondes anti 24-43 et anti-190-211.

Ces résultats sont présentés dans l'article 2.

MOLBIO 01776

Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione *S*-transferases

François Trottein^a, Claude Godin^a, Raymond J. Pierce^a, Bertrand Sellin^b,
 Martin G. Taylor^c, Isabelle Gorillot^a, Maria Sampaio Silva^d,
 Jean-Pierre Lecocq^e and André Capron^a

^aCentre d'Immunologie des Maladies Transmissibles et Allergiques, Unité mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille, France; ^bCentre de Recherche sur les Méningites et Schistosomiasés, Niamey, Niger;

^cLondon School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London, UK;

^dInstituto Nacional de Saúde, Porto, Portugal; ^eTransgène SA, Strasbourg, France

(Received 17 January 1992; accepted 2 April 1992)

The 28-kDa glutathione *S*-transferase from *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) is a candidate vaccine antigen. To evaluate the antigenic and phylogenetic variations between the 28-kDa GSTs from 4 species of schistosome, we have cloned and sequenced the 28-kDa GSTs from *Schistosoma haematobium* (Sh28GST) and *Schistosoma bovis* (Sb28GST). Sb28GST and Sh28GST are more similar to each other (97%) than to Sm28GST (90%) and particularly to the 28-kDa GST from *Schistosoma japonicum* (Sj28GST, 77%). Antisera directed against the major Sm28GST epitopes revealed differences in the recognition of the 28-kDa GSTs from the other schistosome species suggesting that these regions have been subjected to evolutionary pressure. The consequences of such species-specific epitopes on the development of a multi-species anti-schistosome vaccine are discussed.

Key words: Schistosome; Glutathione *S*-transferase; Molecular cloning; B cell epitope; Vaccine development

Introduction

Three major species of schistosome infecting man, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma japonicum*, are

responsible for significant public health problems in a number of developing countries. Moreover, the cattle-infecting schistosomes, *Schistosoma bovis* in Africa and *S. japonicum* in Asia, cause important economic losses [1]. In retrospect, health education, sanitation and snail vector control do not appear to be sufficient measures to control schistosomiasis or to decrease the level of morbidity [2]. Furthermore, although schistosomicidal drugs exist, control of the disease remains difficult to maintain on a wide scale because of the rapidity of reinfection in endemic areas [3]. As a consequence, international control programs have focused on the elaboration of an effective defined antigen vaccine [4]. Among the antigenic candidates, the 28-kDa glutathione *S*-transferase (initially isolated from *S. mansoni*, termed Sm28GST) [5] has 2 properties of importance in an anti-schistosome

Correspondence address: François Trottein, Centre d'Immunologie des Maladies Transmissibles et Allergiques, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cédex, France.

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with the accession numbers M87799 and M87800.

Abbreviations: GST, glutathione *S*-transferase; Sm28GST, 28-kDa glutathione *S*-transferase of *Schistosoma mansoni*; CFA, complete Freund's adjuvant; PBS, phosphate-buffered saline; 2D-gel, two-dimensional gel; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; GSH, glutathione; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; aa, amino acid; UTR, untranslated region.

vaccine strategy: the active immunisation of rodent or primate laboratory animals with Sm28GST both reduces the worm burden [6–8] and alters the female parasite fecundity [9] after a cercarial challenge. This has an effect on the egg-induced pathology and could decrease the transmission of the disease. These observations have been confirmed in the Sudan by vaccination of cattle with native purified *S. bovis* GSTs followed by challenge with *S. bovis* cercariae (H. Bushara, personal communication). However, the possibility of antigenic cross-protection with heterologous species of schistosomes remains an open question [10]. In a recent study, outbred *Erythrocebus patas* monkeys immunised with Sm28GST and challenged with *S. haematobium* cercariae were not significantly protected (in terms of worm burden) although a delay in the development of bladder pathology and egg viability were noted (D. Boulanger, manuscript in preparation). In order to explain this partial cross-protection, it was necessary for us to clone the 28-kDa GSTs from different species of schistosome and to evaluate their phylogenetic relationships. We describe here the molecular cloning of the 28-kDa glutathione *S*-transferases from *S. haematobium* (Sh28GST) and *S. bovis* (Sb28GST) and we compare for the first time protein sequences of the 4 major species of human and cattle-infecting schistosomes. We also present evidence that modification(s) in the schistosome 28-kDa GST sequences, in regions corresponding to the major T/B cell epitopes of Sm28GST, may generate conformational alterations and hence may influence the development of an inter-species cross-protective vaccine.

Materials and Methods

Antigens and antisera. The Salamanca strain (Spain) of *S. bovis* was maintained in *Bulinus truncatus* snails and golden hamsters. The Liboré strain (Niger) of *S. haematobium* was isolated from man [11] and passaged once through *Bulinus truncatus* snails and *Erythro-*

cebus patas monkeys. The Puerto Rican strain of *S. mansoni* and the Chinese strain of *S. japonicum* (a kind gift from A. Moloney, LSHTM, London) were used in this work. Adult worms recovered by perfusion were homogenised and used to purify native GSTs by elution from glutathione-agarose beads (GSH-agarose, Sigma, St. Louis, USA) [12,13]. Recombinant Sm28GST was expressed in *Escherichia coli* strain TGE901 containing the plasmid pTG54 (provided by Transgène S.A, Strasbourg, France) and was affinity purified as described [14]. Rats were immunised by subcutaneous injection of 50 µg of purified recombinant Sm28GST protein in the presence of complete Freund's adjuvant (CFA) and boosted twice with incomplete Freund's adjuvant (IFA). 100 µg of the 24–43 or 115–131 synthetic peptides (octameric construction: octopus, [15]) and of the 10–43 or 190–211 peptides (conjugated to ovalbumin, [16]) were injected into rats with CFA as adjuvant in the same manner [17].

Electrophoresis and Western blots. Schistosome GSTs were fractionated on 13% SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) under reducing conditions [18]. After transfer to nitrocellulose sheets [19], strips were incubated overnight at 4°C with antisera diluted 1/1000 in phosphate-buffered saline containing 3% (w/v) bovine serum albumin (PBS-BSA). Detection of antibody binding was performed with anti-rat (Ig species-specific whole antibody, Diagnostics Pasteur, France) peroxidase-labelled antibodies (1/1000 in PBS-BSA) and 4-chloro-1-naphthol as substrate (Sigma) by standard methods. Two-dimensional gel electrophoresis was performed according to Garrels et al. [20]. Enzymatic activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by using 1 mM of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and 5 mM of reduced glutathione (GSH) as substrates [21].

Construction and screening of the cDNA libraries: sequencing of inserts. Total RNA was prepared from schistosome adult worms by the method of Chirgwin et al. [22] and poly-

adenylated (poly(A)⁺) RNAs were purified over an oligo-dT cellulose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) as described [23]. cDNAs were synthesised from poly(A)⁺ RNAs [24], ligated into λ gt11-*Eco*RI arms and packaged as recommended by the manufacturer (Amersham, U.K.). λ gt11 cDNA libraries were plated on bacterial host strain Y1090 without prior amplification and immunoscreened with the anti-Sm28GST antiserum as documented previously [25]. The positive clones were picked, replated until pure and cultured to prepare phagic DNA [23]. After enzymatic digestion with *Eco*RI, the cDNA inserts were gel-purified by the GeneClean method (Bio101, La Jolla, USA) and subcloned into the M13mp18 vector. Dideoxynucleotide sequencing was performed on both DNA strands as described by Sanger et al. [26] with standard and internal oligonucleotide primers.

Primer extension. Primer extension and sequencing of RNA were performed essentially as described [27] using the 24-base synthetic oligonucleotide OS1 complementary to bases +23 to +46 of the H89 cDNA sequence. 50 μ g of schistosome adult worm total RNA was annealed to [γ -³²P] labelled oligonucleotide (10⁶ cpm) and reverse transcribed for 10 min at 37°C then for 20 min at 42°C. Reaction products were resolved on a 10% polyacrylamide gel [23].

Results

Biochemical and immunological characteristics of schistosome glutathione-S-transferases. After affinity chromatography on GSH-agarose, the enzymatic activities of the glutathione S-transferases from *S. mansoni* (SmGSTs), *S. haematobium* (ShGSTs), *S. bovis* (SbGSTs) and *S. japonicum* (SjGSTs) were assayed with CDNB and GSH as substrates (not shown). The values of the specific activities were ranged between 80 and 120 μ mol min⁻¹ (mg protein)⁻¹ in agreement with those reported with SmGSTs by Taylor et al. [28]. Schistosome

GSTs, which represent 0.5 to 2% of the total soluble fraction of adult worm protein in the 4 species studied, are composed of 2 families of molecules, of 26 and 28 kDa [29,13]. The data in Fig. 1 highlight the prominence of the 28-kDa family relative to the 26-kDa family (approximately 20:1) except for SjGSTs in which they are present in an equimolar ratio. This difference between SjGSTs and the other schistosome GSTs is also emphasised by the two-dimensional gel (2D-gel) electrophoresis profiles and is mainly due to differences in mobility of the 26-kDa GSTs. Indeed, the 28-kDa GSTs (2 or 3 major isoforms) have similar migration characteristics with near-neutral pI values. SmGSTs, ShGSTs and SbGSTs (Fig. 1A, B and C) present 2 or 3 26-kDa isoforms with widely differing pIs whereas the 26-kDa isoforms of SjGSTs (1 major and 2 minor) have pIs shifted towards the acidic pH region (Fig. 1D).

Immunoprecipitation of in vitro translation products from schistosome adult worm RNA (not shown) and Western blotting data, performed with purified native schistosome GSTs and probed with anti-Sm28GST antiserum (Fig. 2A), reveal that the 28-kDa forms (and also the 26-kDa forms, not shown) are highly cross-reactive and allowed us to screen expression libraries with this probe. In order to determine whether antibody cross-reaction may be restricted to particular regions of the 28-kDa GST molecules, we have probed schistosome GSTs with monospecific anti-Sm28GST peptide antisera by immunoblotting techniques. Several synthetic peptides, derived from the Sm28GST sequence, have been constructed to identify the major epitopes eliciting T and B cell responses in immunised or infected animals [30]. This study focused on 3 peptides involved in protective responses (115–131; ref. 31) or in the control of pathology (10–43 and 190–211; I. Wolowczuk and C. Xu, manuscripts in preparation). Fig. 2 demonstrates that antibodies directed against these restricted regions recognize some, but not all, schistosome GSTs from the 4 studied species. Interestingly, the anti-115–131 antiserum does not cross-react with Sh28GST while it

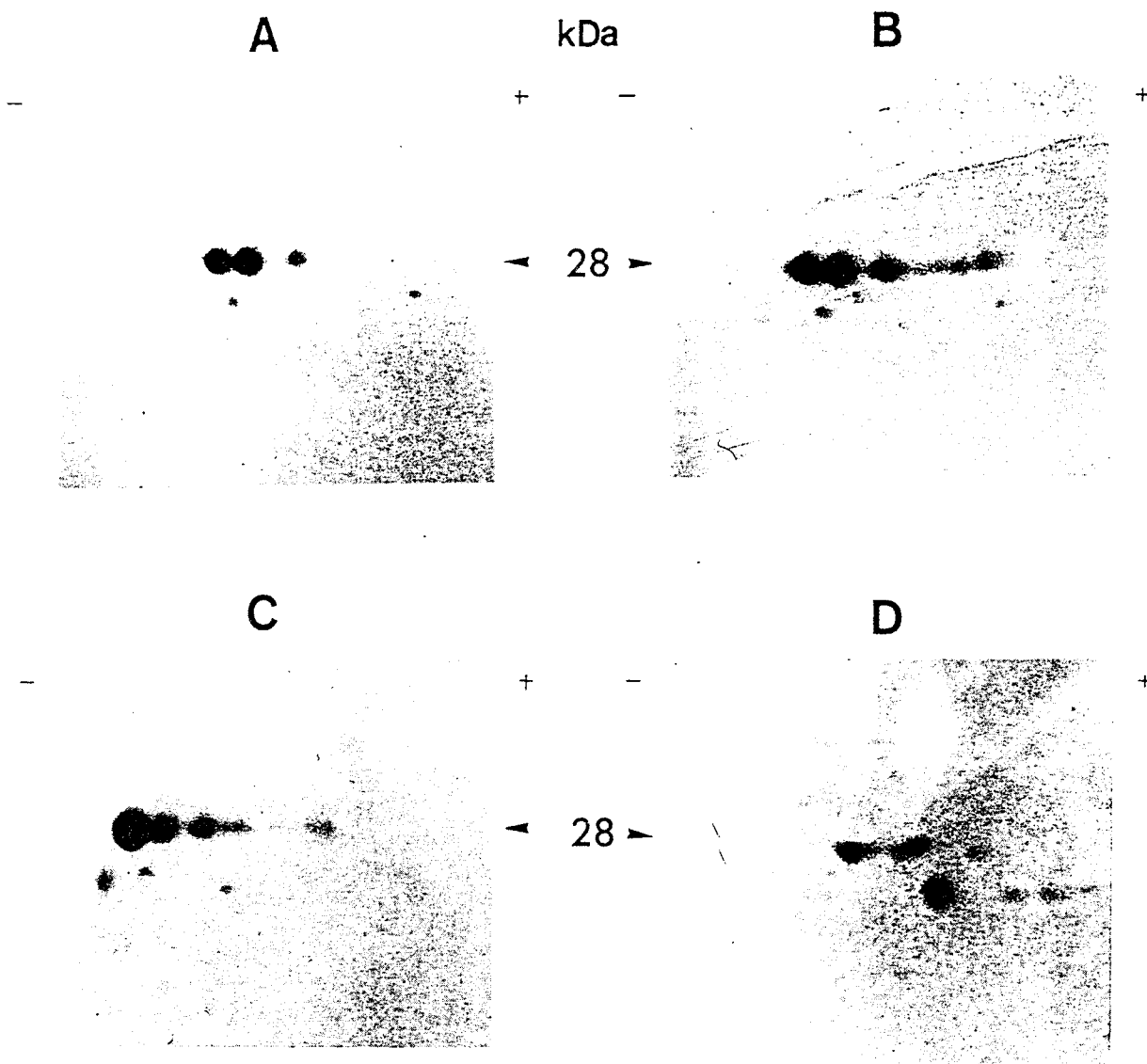


Fig. 1. Comparison of two-dimensional electrophoresis of schistosome glutathione *S*-transferases. Adult schistosomes were harvested, carefully washed with minimal Eagle's medium and homogenised in the affinity chromatography loading buffer [13]. The soluble fraction was then applied to a GSH-agarose column and extensively washed. The bound material was eluted with reduced GSH at basic pH, dialysed against 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, and concentrated by ultrafiltration to 1 mg ml⁻¹. 15 µg of *S. mansoni* GSTs (A), *S. haematobium* GSTs (B), *S. bovis* GSTs (C) and *S. japonicum* GSTs (D) were separated by isoelectric focusing using 3.5–10 carrier ampholines (LKB, Bromma, Sweden) and a 13% SDS-PAGE was used for the second dimension. The gels were Coomassie Brilliant Blue-stained and destained with acetic acid/ methanol/ water (1:2:4, v/v/v). The regions of interest (35–20 kDa, pH 7.5–6) are represented for each sample.

does with the other schistosome GSTs (Fig. 2B). On the other hand, Sm28GST, Sb28GST and Sh28GST are detected by the anti-24–43 (or 10–43, not shown) and the anti-190–211 antisera while these antisera fail to exhibit any cross-reactivity with Sj28GST (Fig. 2C and D).

The elucidation of the primary amino acid sequence of Sh28GST and Sb28GST proteins was therefore essential to further examine the structural basis for these results.

Molecular cloning and sequence comparison of

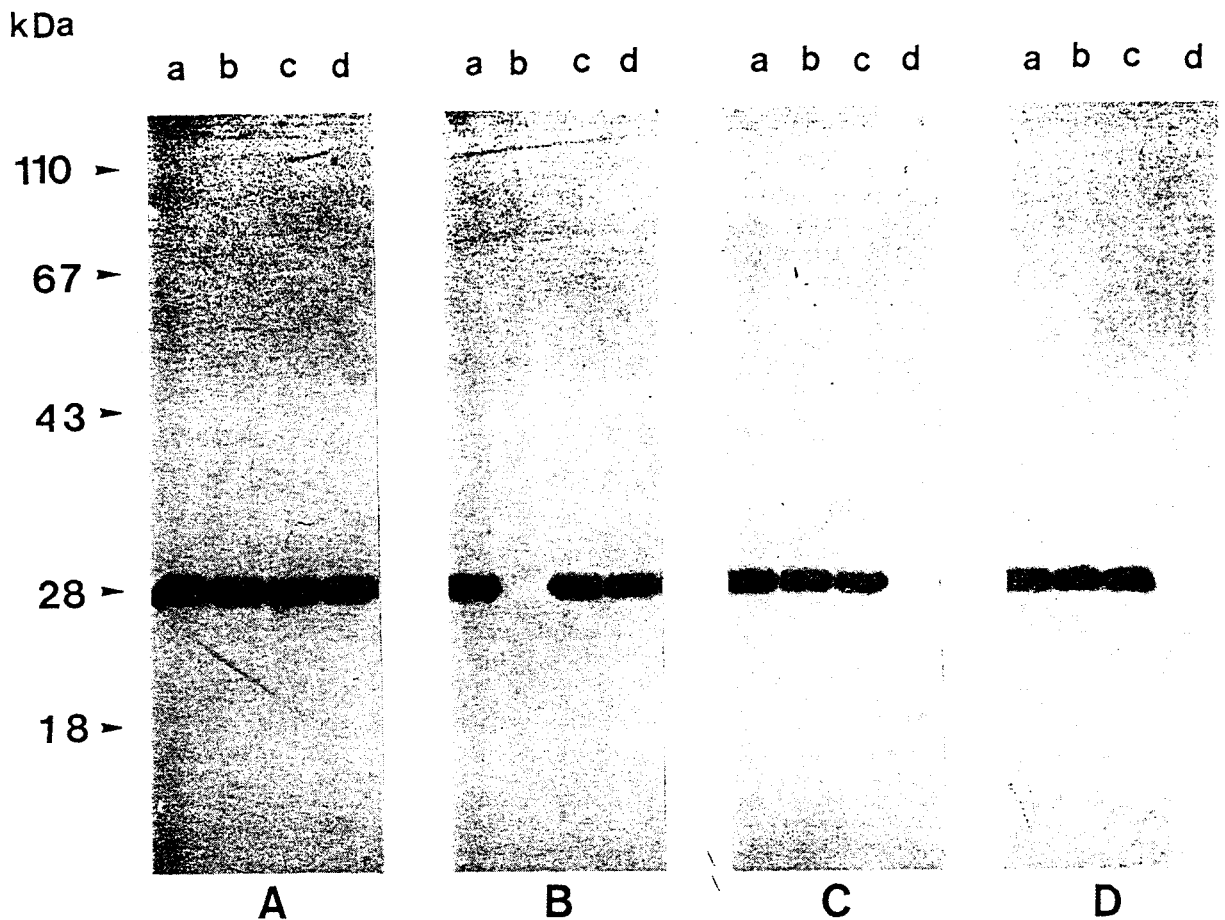


Fig. 2. Immunoreactivity of schistosome 28-kDa glutathione *S*-transferases with anti-Sm28GST peptide antisera. 5 μ g of SmGSTs (lane a), ShGSTs (lane b), SbGSTs (lane c) and SjGSTs (lane d) were separated on 13% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose paper and probed with antisera directed against the recombinant Sm28GST (A), the anti-115-131 peptide (B), the anti-24-43 peptide (C) and the anti-190-211 peptide (D). Molecular weight marker proteins are indicated with sizes in kDa.

schistosome 28-kDa glutathione-S-transferases. The immunoscreening of 3×10^5 independent recombinant phages from each library with the monospecific cross-reactive anti-Sm28GST antiserum resulted in the identification and further size selection of 2 clones from the *S. haematobium* library (H82 and H89) and 4 clones from the *S. bovis* library (B6, B12, B17 and B24). Inserts (680-791 bp) were subcloned into the M13mp18 vector and fully sequenced on both DNA strands. Fig. 3 represents the nucleotide sequence of the longest Sb28GST (B12) and Sh28GST (H89) cDNAs, the other inserts displaying identical overlapping sequences except the B6 cDNA clone described

below.

H89 cDNA is 782 bp long but does not extend to the start codon for translation, lacking the first 7 nucleotides of the coding region of Sh28GST. We therefore performed primer extension on *S. haematobium* RNA using the oligonucleotide primer OS1 (not shown) and obtained an extension of 23 nucleotides beyond the 5' end of the H89 cDNA (see Fig. 3). Primer extension on *S. mansoni* RNA allowed us to determine the sequence in the 5' non-coding portion to 20 nucleotides upstream from the initiation codon ATG.

B12 cDNA is 791 bp long and represents the

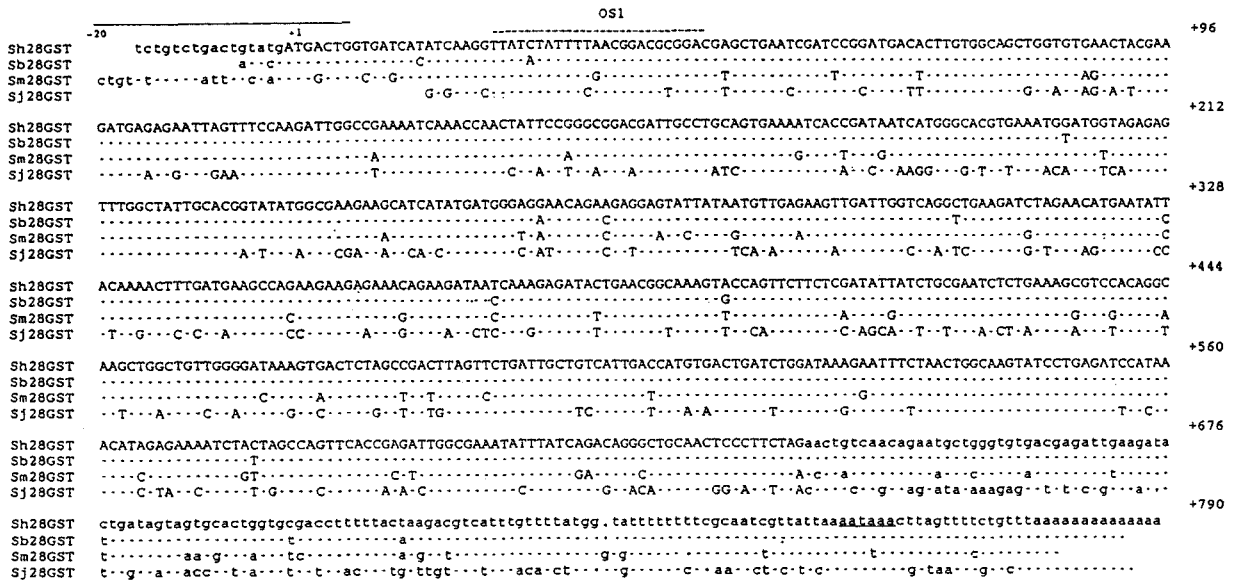


Fig. 3. Comparison of Sh28GST, Sb28GST, Sm28GST and Sj28GST [32] nucleotide sequences. The Sh28GST sequence (806 bp) is a composite of the H89 cDNA (positions +8 to +790) and of the primer extension experiments (line above, positions -16 to +7) sequences. The B12 cDNA (791 bp) represents the Sb28GST sequence. The Sm28GST sequence is composed of the published sequence [7] and of the sequence determined by direct RNA sequencing (positions -7 to -20). The coding regions span 633 bp (capital letters) and numbers refer to nucleotide positions in the cDNAs where the first nucleotide of the initiation codon ATG is +1. The lower-case letters represent the 5' and 3' non-coding regions and the consensus polyadenylation signal is underlined. Identical nucleotides between Sh28GST and the other schistosome 28-kDa GST sequences are represented by horizontal dashed lines with breaks to optimize the alignments. The broken overline indicates the complementary oligonucleotide sequence used in the primer extension experiment and the extended sequences is overlined.

complete nucleotide sequence coding for Sb28GST. Fig. 3 shows that all cDNA sequences are terminated by a poly(A) tail preceded by a consensus polyadenylation signal in the 3'-untranslated region.

The overall identity at the nucleotide level of Sh28GST and Sb28GST is 98.1% (776/791) and is similar in the translated region (TR, 98.4%, 623/633) and in the 3'-untranslated region (3'-UTR, 98%, 150/153). When we compare the degree of nucleotide sequence homology between Sh28GST (or Sb28GST) and Sm28GST, we observe the same phenomenon (90% in the TR/ 90% in the 3'-UTR). In contrast, the comparison of Sj28GST [32] with the 3 other geographically distinct species of schistosome 28-kDa GSTs reveals that the nucleotide sequence is more conserved in the TR than in the 3'-UTR (77-76%/ 64-62%).

The predicted coding regions of the nucleotide sequences of Sh28GST and Sb28GST cDNAs consist of 633 bp (211 amino acids).

A comparison of the schistosome 28-kDa GST peptide sequences (Fig. 4) shows that Sb28GST and Sh28GST proteins are highly conserved (97% identity, 205/211). Of the 6 aa differences, concentrated in the central region of the molecule (aa positions 69, 87, 89, 102, 110 and 124), 3 are conservative changes: Leu (69), Asp (89) and Val (102) in Sb28GST for Val (69), Glu (89) and an Ala (102) in the Sh28GST sequence. The comparison of Sh28GST (or Sb28GST) to Sm28GST reveals a degree of conservation at the aa level of 90% (or 91.9%) and differences are scattered throughout the sequences except in the C-terminal portion (aa positions 146-204) with only a single aa difference (a Gly versus a Glu, 98.3% identity over a span of 59 residues). The extent of identity between Sj28GST and the 3 other 28-kDa GSTs are less marked and are similar: 78.1% for Sb28GST, 77.1% for Sm28GST and 76.7% for Sh28GST. The comparison of the 4 28-kDa GSTs leads to

				30					70
Sb28GST	MTGDHIKVIY	FNGRGRAESI	RMTLVAAAGVN	YEDERISFQD	WPKIKPTIPG	GRLPVAKITD	NHGHVKWMLE		
Sh28GSTV		
Sm28GST	-A-E-.....	-D-.....DV	D-.....		
Sj28GST	V-L-.....P	-I-.....	E F-.....I	KR-D--T-S-		
				100					140
Sb28GST	SLAIARYMAK	KHHMMGETDE	EYYNVEKLG	QVEDLEHEYH	KTLMKPEEEK	QKITKEILNG	KVPVLLDIIC		
Sh28GSTG-E-A-.....YI		
Sm28GSTSA-VQ	ENM		
Sj28GSTFI-RN--D--DII--M--V-SI--P	E--SI--QA		
				170					211
Sb28GST	ESLKASTGKL	AVGDKVTLAD	LVLIAVIDHV	TDLDKFEFTG	KYPEIHKHRE	NLLASSPRLA	KYLSDRAATP	F	
Sh28GSTN-P		
Sm28GSTGG		
Sj28GST	-T-E--N-	T-.....	V--S--IK	H--T--K--E-H-A		

Fig. 4. Comparative analysis of the 28-kDa glutathione S-transferase polypeptides of *S. bovis*, *S. haematobium*, *S. mansoni* and *S. japonicum*. Sb28GST and Sh28GST sequences have been deduced from their cDNA sequences, Sm28GST [7] and Sj28GST [32] from the GenBank™ data base. Identities between Sb28GST and the other schistosome 28-kDa GSTs are represented by horizontal bars. Regions corresponding to the major B/T cell epitopes in Sm28GST are indicated (line above). The amino acid variations between the predicted coding regions of the B6 and the B12 cDNA clones are shown (asterisks above).

the identification of 2 clusters of conservation: in the N-terminal region (aa positions 32–54, 95.6% identity) and in the C-terminal region (aa positions 171–189, 94.7% identity).

Interestingly, a Sb28GST cDNA clone (termed B6, 790 bp) exhibited a divergent sequence compared to other analysed Sb28GST cDNA clones. Over the full-length nucleotide sequence, we noted 12 differences, 10 of which resulted in 6 aa changes: Glu (aa 4), Val (aa 6), Val (aa 69), Glu (aa 89), Glu (aa 102) and a Tyr (aa 110).

Discussion

In a comparative study, performed with native purified *S. mansoni*, *S. haematobium* and *S. bovis* GSTs, we have demonstrated similarities in their specific activities (towards CDNB), in their molar ratio 28/26 (20/1) and in their 2-D electrophoresis profiles. The microheterogeneity observed in the 2D-gel profiles may result from (1) chemical modifications during the purification or electrophoresis steps, (2) post-translation events or (3) presence of polypeptides with different primary sequences. On the other hand, GSTs of *S. japonicum* (Chinese strain) exhibit biochemical and immunological differences as previously mentioned with the Philippine strain by Tiu et al. [29]: a high level of expression of the 26-

kDa form relative to the 28-kDa form leading to equal amounts of the 2 families, a weak immunogenicity of Sj28GST compared to Sm28GST in mice [32] and a different 2D-gel profile. The consequences of such discrepancies are unknown but it may be the case that SjGSTs display different functions in *S. japonicum* physiology. Nevertheless, antibodies directed against Sm28GST cross-react with each schistosome 28-kDa GST species and allowed us to screen expression libraries with this probe.

The complete nucleotide sequences of the Sh28GST and Sb28GST cDNAs are depicted in Fig. 3. Primer extension, performed with Sh28GST and Sm28GST mRNAs, shows that their 5' non-coding regions seem to be unusually small (16 bp and 20 bp long respectively) and that they are 68.7% homologous (11/16).

We report here 2 distinct full-length nucleotide sequences coding for Sb28GST. The B6 cDNA clone displays microheterogeneity at 6 positions within the entire polypeptide (97% identity) and it is expected that structural variations occur between the 2 isoenzymes as reflected in the 2D-gel electrophoresis profile (Fig. 1). The microheterogeneity within the 28-kDa family may be explained by a heterogeneity in the worm population or by the co-expression of distinct mRNAs probably as a result of allelomorphism or of the occurrence of

a multigenic family. In our laboratory, we have previously observed sequence variations among the Sm28GST mRNA population using PCR techniques (unpublished data) and in Sm28GST genomic clones (A. McNair, manuscript in preparation). In the light of the preceding data and the demonstration that within a class of the mammalian GST isoenzymes, there is evidence for molecular differences [33] and that the likelihood of an allelomorphism in the mammalian GST locus has been documented [34], it is likely that co-expression of isoenzymes exists in the 28-kDa isoenzyme family. Likewise, the co-expression of a second 26-kDa GST in *S. mansoni*, probably due to the expression of a second gene, has recently been reported [35]. The significance and the role in the worm physiology of this microheterogeneity within the GST family remains to be explored.

Despite dissimilarities between *S. haematobium* and *S. bovis* in the morphology, physiology and definitive host-specificity, Sh28GST and Sb28GST proteins are highly conserved suggesting that they are closely related in evolutionary terms. This may be consistent with similar geographical distribution, identical intermediate-host specificity in some areas (*Bulinus*) and similar antigenic composition [36]. The comparison of the 28-kDa GST sequences shows that 75% of all residues are fully conserved in the 4 species of schistosome indicating a substantial structural relationship in this family. The highly conserved regions in the N- and C-terminal portions of the molecules might be essential for a specific and precise function common to these enzymes. The recent crystallisation [14] and the consequent elucidation of the 3-dimensional (3-D) structure of Sm28GST will yield information on the location of the active site(s) and the topography of the molecule. The success in crystallising recombinant Sm28GST and the possibility of obtaining sufficient pure recombinant Sh28GST and Sb28GST for crystallisation assays would allow us to investigate whether evolution has kept constant some immunologically and enzymatically strategic regions of this GST family. A comparative

study performed with different species of mammalian class π isoenzymes shows that the majority of the variable aa occur at the surface of the molecule [37]. If this is the case in our model, aa divergence would affect the topography of the molecules and consequently their immunoreactivity.

In order to know whether structural variations exist inside immunologically essential regions of schistosome 28-kDa GSTs, we have probed them with specific antisera directed against Sm28GST peptides. The experiments summarised in Fig. 2 support the notion of species-specific epitopes. On comparison with other schistosome GSTs, we observed that conformational differences exist in the epitopic regions of Sm28GST. For instance, in the 115–131 region of schistosome 28-kDa GSTs (see Fig. 5), 3 aa positions are variable: in Sm28GST, residues Gln (117), Glu (121), Thr (124) are respectively replaced by Glu (117), Gln (121) and Ile (124) in Sh28GST, by Glu (117) and Gln (121) in Sb28GST and by Pro (117) and Ser (124) in Sj28GST. The lack of any cross-reactivity of Sh28GST with the anti-115–131 antiserum appears to result from a single aa substitution. Indeed, the replacement of a polar aa Thr (or a Ser) by a non-polar Ile (124) seems to be critical for antibody binding while Glu (117) and Gln (121) may be replaced by respectively Gln and Glu in Sb28GST sequence without hampering antibody binding. In the same manner, the replacement of the Thr (or Ser) by the non-conservative change Pro (117) in Sj28GST sequence does not seem greatly to affect the overall conformation of the peptide. Studies using ELISA (not shown) revealed that the anti-115–131 antiserum recognised Sm28GST, Sb28GST and Sj28GST (up to a titer of 20 000) whereas Sh28GST was recognised at a lesser extent and at a lower antibody titer (below 1000). It has been demonstrated in our laboratory that the 115–131 peptide incorporates both T and B cell recognition sites of Sm28GST in various experimental models [31] and that rats immunised with the 115–131 octopus construct are partially protected against a challenge infection with *S. mansoni* cercariae (40–50%,

ref. 17). A possible explanation of the relative failure to protect *Erythrocebus patas* monkeys (in terms of worm burden) immunised with Sm28GST and challenged with *S. haematobium* cercariae may be the conformational alteration of this region, assuming that the 115–131 portion constitutes major T and B cell epitopes in Sh28GST. However, further investigation is needed to confirm the possible incidence of the mutation at position 124 in the mechanisms of protection.

The 24–43 (and 10–43) and 190–211 epitopes of Sm28GST are conserved in Sh28GST and Sb28GST. The conservative substitutions of Asp by Asn (12,30) or Asn by Asp (205) and of Pro by Ala (207) in Sb28GST and Sh28GST sequences may explain these data, but, as predicted by sequence dissimilarities, Sj28GST does not bear cross-reactive epitopes in these regions. A recent study has demonstrated that immunisation of mice with the 10–43 or the 190–211 peptides reduces female worm fecundity and egg viability (C. Xu, manuscript submitted). Although these effects and the inhibition of the Sm28GST enzymatic activity by these specific antibodies seem to be correlated [38], the immunological and biochemical mechanisms have not yet been completely elucidated. However, the fact that Sm28GST, Sh28GST and Sb28GST share cross-reactive epitopes in these immunologically essential regions suggests the possibility for the development of a multi-species cross-reactive vaccine against the transmission of schistosomiasis.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM U167, by CNRS 624, by the Edna McConnell Clark Foundation (Grant No. 11389), by the European Economic Community (grant No. TSI-M-0436-F) and by the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

We would like to thank Drs. C. Verwaerde, I. Wolowczuk, J. Khalife and D. Williams for kind and helpful discussions and M. Marguer-

ite, I. Ivanoff, and C. Xu for the gift of the anti-Sm28GST peptide antisera. We are grateful to S.A. Lafdal, J. Trolet and C. Drolez for excellent technical assistance, Dr. J.P. Kusnierz for the synthesis of the oligomers, Dr. J.M. DaCosta for providing adult *S. bovis* worms and the CERMES staff for collecting adult *S. haematobium* worms.

References

- 1 Taylor, M.G. (1987) Schistosomes of domestic animals: *Schistosoma bovis* and other animal forms. In: Immunology, Immunoprophylaxis and Immunotherapy of Parasitic Infections. (Soulsby, E.J.L., ed.), Vol. 2, pp 50–90. C.R.C Press, Boca Raton, FL.
- 2 Wilkins, H.A. (1989) Reinfection after treatment of schistosome infections. *Parasitol. Today* 5, 83–88.
- 3 Butterworth, A.E. (1988) Control of schistosomiasis in man. In: The Biology of Parasitism (Englund, P.T. and Sher, A., eds.), Vol. 9, pp 43–59. Alan R. Liss, New York.
- 4 Sher, A., James, S.L., Correa-Oliviera, R., Hieny, S. and Pearce, E. (1989) Schistosome vaccines: current progress and future prospects. *Parasitology* 98, 61–68.
- 5 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. Parasitol.* 17, 105–114.
- 6 Balloul, J.M., Grzych, J.M., Pierce, R.J. and Capron, A. (1987) A purified 28 000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138, 3448–3453.
- 7 Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvallo, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1987) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 326, 149–153.
- 8 Balloul, J.M., Boulanger, D., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvallo, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1987) Vaccination of baboons with a P28 antigen of *Schistosoma mansoni* expressed in *E. coli*. In: Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites (McInnis, A., ed.), pp 77–84. Alan R. Liss, New York.
- 9 Boulanger, D., Reid, G.D., Sturrock, I., Wolowczuk, I., Balloul, J.M., Grezel, D., Pierce, R.J., Otieno, M.F., Guerret, S., Grimaud, J.A., Butterworth, A. E. and Capron, A. (1991) Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 13, 473–490.
- 10 Agnew, M.A., Murare, H.M. and Doenhoff, M.J. (1989) Specific cross-protection between *Schistosoma bovis* and *S. haematobium* induced by highly irradiated infections in mice. *Parasite Immunol.* 11, 341–349.
- 11 Véra, C., Jourdane, J., Sellin, B. and Combes, C. (1990) Genetic variability in the compatibility between *Schis-*

- tosoma haematobium* and its potential vectors in Niger. Epidemiological implications. *Trop. Med. Parasitol.* 41, 143-148.
- 12 Simons, P.C. and Vander Jagt, D.L. (1981) Purification of glutathione S-transferases by glutathione-affinity chromatography. *Methods Enzymol.* 77, 235-237.
 - 13 Trottein, F., Kieny, M.P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Schmitt, D., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1990) Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41, 35-44.
 - 14 Trottein, F., Vaney, M.C., Bachet, B., Pierce, R.J., Colloc'h, N., Lecocq, J.P., Capron, A. and Mornon, J.P. (1992) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a protective cloned 28-kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. *J. Mol. Biol.* 224, 515-518.
 - 15 Posnett, D.N., McGrath, H. and Tam, J.P. (1988) A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor β chain. *J. Biol. Chem.* 263, 171-179.
 - 16 Schutze, M.P., Leclerc, C., Jolivet, M., Audibert, F. and Chedid, L. (1985) Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* 135, 2319-2326.
 - 17 Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R.J., Grezel, D., Reid, G.D., Tartar, A. and Capron, A. (1991) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm28 GST antigen in rat, mouse and monkey. Partial protection of Fischer rat after active immunization. *J. Immunol.* 146, 1987-1995.
 - 18 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 - 19 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.
 - 20 Garrels, J.I. (1979) Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. *J. Biol. Chem.* 254, 7961-7977.
 - 21 Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
 - 22 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.
 - 23 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 - 24 Gübler, U. and Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263-269.
 - 25 Huynh, T.V., Young, R.A. and Davis, R.W. (1985) Construction and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In: *DNA Cloning, a Practical Approach* (Glover, D.M., ed.), Vol 1. pp. 49-78, IRL Press, Oxford.
 - 26 Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
 - 27 McPheeters, D.S., Christensen, A., Young, E.T., Stormo, G. and Gold, L. (1986) Translation regulation of the bacteriophage T4 lysozyme gene. *Nucleic Acids Res.* 10, 459-472.
 - 28 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 S-transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28 K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 7, 465-472.
 - 29 Tiu, W.U., Davern, K.M., Wright, M.D., Board, P.G. and Mitchell, G.F. (1988) Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Parasite. Immunol.* 10, 693-706.
 - 30 Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Neyrinck, J.L., Drobecq, H., Tartar, A. and Capron, A. (1988) Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J. Immunol.* 141, 1687-1694.
 - 31 Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Vendeville, C., Tartar, A. and Capron, A. (1990) T-cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 93, 350-358.
 - 32 Henckle, K.J., Davern, K.M., Wright, M.D., Ramos, A.J. and Mitchell, G.F. (1990) Comparison of the cloned genes of the 26- and 28-kilodalton glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 23-34.
 - 33 Rushmore, T.H., Harris, L., Nagai, M., Sharma, R.N., Hays, M.A., Cameron, R.G., Murray, R.K. and Farber, E. (1988) Purification and characterization of glutathione S-transferase-P or 7-7 from normal liver and putative preneoplastic liver nodules. *Cancer Res.* 48, 2805-2812.
 - 34 Ahmad, H., Wilson, D.E., Fritz, R.R., Singh, S.V., Medh, R.D., Nagle, G.T., Awathi, Y.C. and Kurosky, A. (1990) Primary and secondary structural analyses of glutathione S-transferase π from human placenta. *Arch. Biochem. Biophys.* 278, 398-408.
 - 35 Wright, M.D., Harrison, R.A., Melcher, A.M., Newport, G.R. and Mitchell, G.F. (1991) Another 26-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 177-180.
 - 36 Agnew, M.A., Murare, H.M., Lucas, S.B. and Doenhoff, M.J. (1989) *Schistosoma bovis* as an immunological analogue of *S. haematobium*. *Parasite Immunol.* 11, 329-340.
 - 37 Reinemer, P., Dirr, H.W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gallay, O. and Huber, R. (1991) The three dimensional structure of a class π glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *EMBO J.* 10, 1997-2005.
 - 38 Xu, C.B., Verwaerde, C., Grzych, J.M., Fontaine, J. and Capron, A. (1991) A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* 21, 1801-1807.

1/ La sonde anti-115-131 reconnaît les Sm28GST, Sb28GST et Sj28GST
mais pas la Sh28GST

Le remplacement non conservatif de la Thréonine en IsoLeucine en position 124 est probablement responsable de la modification conformationnelle de la Sh28GST dans la région 115-131 (par rapport à la Sm28GST). En effet, les remplacements conservatifs des deux aa Gln et Glu de la Sm28GST par Glu et Gln de la Sh28GST en positions 117 et 121 ne peuvent expliquer l'absence de reconnaissance de la sonde anti-115-131 sur la Sh28GST car ses deux changements existent également chez la Sb28GST (Tableau 4).

Position	Sm28GST	Sh28GST	Sb28GST	Sj28GST
117	Gln	Glu	Glu	Pro
121	Glu	Gln	Gln	Glu
124	Thr	Ile	Thr	Ser
réactivité	+	-	+	+

Tableau 4 . Mise en évidence des acides aminés variables dans la région 115-131 des GSTs de 28 kDa de schistosome et conséquences des mutations sur l'immunoréactivité des GSTs natives vis-à-vis de la sonde anticorps 115-131. L'immunoréactivité positive ou négative de la molécule native vis-à-vis de la sonde anticorps anti-115-131 est représentée par + et -.

La région 115-131 participe à l'immunité protectrice dirigée contre la stade larvaire du parasite (Wolowczuk et coll. 1991b). La mutation en position 124 permettrait d'expliquer l'absence d'effet vaccinal (sur la charge parasitaire) après immunisation par la Sm28GST dans le système hétérologue d'infestation par *S. haematobium* (Boulangier et coll. 1991b). Cependant, la composante humorale dirigée contre cette région particulière de la molécule ne peut pas, à elle seule, rendre compte de la réduction de la charge vermineuse. En effet, malgré la conservation de l'épitope 115-131 au sein de la Sj28GST, l'immunisation par la Sm28GST chez le rat ultérieurement infesté par des cercaires de *S. japonicum* (souche Chinoise) n'entraîne pas de réduction de la charge parasitaire, alors que l'immunisation par les SjGSTs, dans un même protocole d'infestation, protège (Moloney. A, communication personnelle).

2/ Les sondes 10-43 et 190-211 reconnaissent les Sm28GST, Sh28GST et Sb28GST
mais pas la Sj28GST.

La modification conformationnelle des régions N- et C-terminales de la Sj28GST peut aisément s'expliquer par les nombreuses mutations présentes dans ces deux régions (Figure 4, article 2).

Dans le système hétérologue d'infestation (Sm28GST/*S. haematobium*), la réduction de la ponte et de la pathologie associée aux dépôts des oeufs dans les tissus va dans le sens de ces résultats : les épitopes N- et C- terminaux étant conservés.

Un certain nombre d'arguments expérimentaux soulignent l'importance cruciale de la composante humorale sur la réduction de la fécondité des vers femelles :

- des anticorps humains (IgA) anti-Sm28GST inhibent la ponte des vers femelles *in vitro*. Cette inhibition est abolie par adjonction du peptide 190-211 (Grezel et coll. 1992).
- l'immunisation de souris par les peptides 10-43 ou 190-211 réduit le dépôt des oeufs dans les tissus et altère la capacité d'éclosion des oeufs. Le transfert passif des antisérums correspondants (utilisés dans l'article 2) reproduit les mêmes effets (Xu et coll. 1992).

A la vue de ces informations, et considérant l'absence de réaction immunologique croisée dans les régions N- et C-terminales entre la Sm28GST et la Sj28GST, l'immunisation par la Sm28GST chez des animaux infestés par *S. japonicum* ne devrait pas entraîner d'effets sur la fécondité des vers femelles. La pertinence de cette hypothèse nécessite cependant une confirmation *in vivo* .

3-Conclusion

Les résultats exposés dans l'article 2 vont nous permettre de poursuivre notre démarche :

1/ L'obtention des copies complètes des ADNc codant pour la Sh28GST et la Sb28GST a permis, en collaboration avec la société Transgène à Strasbourg, l'expression de ces molécules dans le système levure. Des expériences de vaccination à grande échelle avec la Sb28GSTr, visant à reproduire les résultats initiaux enregistrés avec les SbgSTs natives, sont prévues dans

les semaines à venir sur des ovins et bovins au Niger et au Soudan. Cette expérience pourra rapidement nous renseigner sur l'impact réel d'une campagne de vaccination sur le terrain.

Enfin, il ne faut pas négliger le clonage moléculaire puis l'expression de(s) l'ADNc correspondant à la Sb26GST. Une préparation vaccinale à base de SbGSTs recombinantes pourra alors être disponible.

2/ De caractère hydrophobe, la région conservée 171-189 pourrait intervenir activement dans la fixation de l'agent électrophile hydrophobe. Cette hypothèse nécessite cependant des bases moléculaires plus fondées et semble passer, dans un premier temps, par la résolution de la structure tertiaire de la Sm28GST. A partir de celle-ci et par modélisation, les topographies et conformations spatiales des 4 GSTs de 28 kDa de schistosome pourraient être comparées. Cette approche pourra éventuellement nous aider à évaluer les incidences des mutations interspécifiques et à optimiser les propriétés d'une préparation vaccinale, à base de peptides synthétiques, dirigée contre les différents agents étiologiques de la schistosomiase.

CONTRIBUTION A L'ELUCIDATION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE D'UNE GLUTATHION-S-TRANSFERASE DE 28 KDA DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

*

Introduction

La résolution de la structure tridimensionnelle (3D) de la Sm28GST présente de multiples intérêts. En effet, la détermination complète de la structure 3D des GSTs reste encore un problème d'actualité, malgré un récent rapport de Reinemer et coll. (1991). Ces auteurs identifient les aa participant à la formation du site de fixation du glutathion et présentent la structure 3D d'une GST de classe π isolée du poumon de porc. Cependant, la localisation précise du site de fixation du substrat électrophile n'est pas établie (site H). L'élucidation de la totalité des aa fonctionnels du (des) site(s) actif(s) ainsi que la compréhension des mécanismes catalytiques de ces enzymes présentent donc encore un intérêt fondamental. De plus, dans le cadre d'une stratégie vaccinale, la détermination de la structure 3D de la Sm28GST et des aa présents à la surface de la molécule peut constituer de nouvelles voies d'approche visant à optimiser l'utilisation de peptides synthétiques. Trois méthodes permettent la résolution d'une structure 3D d'une macromolécule :

- 1/ La modélisation, si l'on possède un modèle moléculaire dont la structure 3D est connue.
- 2/ La résonance Nucléaire Magnétique (RMN).
- 3/ La cristallographie et l'analyse des données de diffraction aux rayons X du cristal.

La démarche visant à résoudre la structure 3D de la Sm28GST recombinante a été effectuée en collaboration avec les Dr Vaney et Mornon, du département des Macromolécules Biologiques, au sein du laboratoire de Minéralogie-Cristallographie dirigé par le Pr Petroff, Universités Pierre et Marie Curie et ParisVII. La partie expression, purification, analyse et cristallogénèse a été réalisée au CIBP. Ce chapitre n'a pas l'ambition de traiter les aspects techniques conduisant à la cristallographie mais de résumer les principes théoriques la gouvernant (et de les appliquer à la Sm28GST) ainsi que les méthodes utilisées pour le décriptage des données de la diffraction aux rayons X de cristaux de protéine.

1- Principes généraux de la cristallographie des macromolécules

1-1 Introduction

Les enzymes catalysent des réactions biochimiques avec une spécificité remarquable et les interactions physico-chimiques qui s'établissent avec d'autres molécules font souvent intervenir des atomes se trouvant dans des régions parfois éloignées dans la structure primaire d'une même protéine. La connaissance de la structure 3D des enzymes au niveau atomique revêt alors une importance capitale dans la compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant l'activité enzymatique. La définition de nouvelles drogues spécifiques d'enzymes parasitaires (drug design) constitue un exemple d'application de l'ingénierie des protéines. De même, les logiciels de graphisme moléculaire (conception assistée par ordinateur: CAO) permettent de simuler les variations conformationnelles de l'enzyme après remplacement d'un acide aminé par un autre et ainsi de conférer expérimentalement (par mutagenèse dirigée) de nouvelles propriétés fonctionnelles : spécificité différente envers un substrat ou un inhibiteur chimique. La définition des structures spatiales d'un antigène constitue également, pour les immunologistes, une source d'information importante dans le cadre de la connaissance de la topographie de la molécule. A l'heure actuelle, seules la diffraction aux rayons X de cristaux de protéine et la résonance magnétique nucléaire représentent des moyens d'investigation efficaces pour l'élucidation des structures 3D des macromolécules.

1-2 Cristallogénèse et diffraction des rayons X

Les rayons X monochromatiques, utiles pour cette technique, représentent des radiations dont la longueur d'onde est de l'ordre de 1 à 2 angström ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$), c'est à dire l'ordre de distance entre deux atomes. Si la molécule, soumise aux radiations, se trouve dans un édifice cristallin ordonné, l'amplitude de l'énergie diffractée sera cohérente et enregistrable. Dans un cristal, environ 10^{15} molécules (un million de milliards) sont arrangées de manière périodique, dans une orientation bien définie et uniforme, et sont "éclairées" par un faisceau simultanément. Lorsque le cristal est placé dans un faisceau de rayons X monochromatiques, les rayons X sont

diffusés dans des directions bien précises : ils sont diffractés. Les faisceaux diffractés sont alors collectés et constituent les taches de diffraction (ou taches de Bragg) à partir desquelles la structure du cristal et donc de ses molécules sont déduites. La diffusion des rayons X est due aux électrons des molécules qui constituent le cristal et trois données peuvent être recueillies : l'amplitude (proportionnelle au nombre d'électrons par unité de volume), l'intensité (dépendante de la position de chacun des atomes du cristal) et la phase (suivant la position du point dans l'objet). La relation entre la position des électrons dans l'objet, l'amplitude et la phase de l'onde diffusée permet, par raisonnement inverse (synthèse de Fourier), de calculer la densité électronique à partir des caractéristiques de la lumière diffusée.

1-3 Aspects physico-chimiques de la cristallogénèse

L'obtention de cristaux de protéine est une étape limitante et des problèmes quantitatifs (il faut au moins 10mg) et qualitatifs (pureté et intégrité structurale) peuvent se poser. Même si les progrès de la production en masse des protéines recombinantes ainsi que des procédés de purification et d'analyse ont favorisé l'essor de la cristallographie, la cristallogénèse reste un phénomène empirique et encore mal compris et les nombreux paramètres physico-chimiques la gouvernant la rendent ainsi incertaine. Cependant, la connaissance des caractéristiques physico-chimiques (solubilité, hydrophobicité...) et biochimiques (événements post-transcriptionnels de type glycosylation, acétylation, phosphorylation...) de la protéine à cristalliser est d'un grand secours pour l'expérimentateur. De plus, les étapes de purification et de stockage ne doivent pas générer de microhétérogénéité dans la solution protéique : protéolyse, déamidation, oxydo-réduction...

Le principe conduisant à la cristallogénèse est le suivant : la protéine doit, par addition d'agents précipitants, passer d'un état soluble vers un état de sursaturation qui évoluera soit vers un état de précipitation amorphe soit vers un état de cristallisation. Les germes cristallins peuvent alors donner naissance, par croissance lente (de un jour à plusieurs mois), à des cristaux de bonne qualité analysables par les méthodes de diffraction des rayons X. L'évolution de la protéine dépend de plusieurs facteurs que l'expérimentateur doit contrôler : nature et concentration de l'agent précipitant (sels, solvants organiques, polymères solubles), pH (généralement proche du pI), présence de substrat ou ligand, concentration de la solution

protéique (10 à 50 mg/ml) et température. La recherche des conditions de cristallisation revient à établir des critères de faisabilité et ceux-ci passent inévitablement par un criblage parfois long et fastidieux aboutissant à des conditions de cristallisation définies et reproductibles.

2- Cristallisation et étude préliminaire de la diffraction aux rayons X de la Sm28GStr

ARTICLE 3

L'article 3 décrit les procédés de purification et de cristallogenèse ayant abouti à la formation de cristaux diffractant à haute résolution aux rayons X.

2-1 Conditions expérimentales de la cristallisation

Après culture de la souche TGE901/pTG54, une double purification par chromatographie d'affinité, sur GSH- et S-hexylGSH-agarose, nous a permis d'obtenir la Sm28GStr à un haut degré de pureté. L'analyse par SDS-PAGE (1mg/dépôt), par HPLC et par HPE n'ont détecté la présence d'aucun contaminant. La première condition était donc remplie et il restait à définir les conditions physico-chimiques de la cristallisation de la Sm28GStr.

Le tableau 6 représente les conditions de cristallisation utilisées pour les cinq GST de mammifère dont les résultats de diffraction aux rayons X ont été publiés. Nous notons que seuls les travaux de Dirr et coll. (1991) ont débouché sur la détermination d'une structure tertiaire (Reinemer et coll. 1991). Alors que cette résolution de structure 3D est la première de toute une famille de protéines, une autre structure 3D de GST a été récemment résolue : il s'agit d'une GST de classe μ de rat (Gilliland, communication personnelle).

GST	Classe	Agent précipitant	pH	Ligand	Symétrie cristalline
Placenta de boeuf Schäffer et coll. (1988)	(π)	sulfate d'ammonium	8.0	S-hexylGSH	tétragonal (P4 ₁ 2 ₁ 2)
Poumon de porc Dirr et coll. (1991)	(π)	PEG	6.5	sulfonate-GSH	orthorhombique (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)
Placenta humain Parker et coll. (1990)	(π)	sulfate d'ammonium	6.6	S-hexylGSH	tétragonal (P4 ₁ 2 ₁ 2)
Foie de rat Sesay et coll. (1987)	(μ)	sulfate d'ammonium	6.9	analogue GSH	monoclinique (C2)
Foie humain Cowan et coll. (1989)	(α)	PEG	7.8	analogue GSH	monoclinique (C2)

Tableau 6 . Comparaison des conditions physico-chimiques ayant conduit à la cristallisation des GSTs de mammifère.

D'après ce tableau, l'utilisation du sulfate d'ammonium (ou de polyéthylène glycol, PEG) et d'un ligand à forte affinité nous semblait indiquée. De plus, la faculté de dimérisation (58 kDa) de la Sm28GST en condition basique nous incita à utiliser un agent réducteur de type DTT ou β -mercaptoéthanol durant les étapes de purification et de cristallogénèse afin d'éviter une hétérogénéité moléculaire incompatible avec la formation de cristaux. Seul le sulfate d'ammonium comme agent précipitant a été utilisé et la technique de McPherson et coll. (1976), par diffusion de vapeur en goutte suspendue, a été employée (voir Matériels et Méthodes).

2-2 Résultats préliminaires de la diffraction aux rayons X

200 conditions différentes ont été testées dont certaines ont débouché sur l'obtention de cristaux de Sm28GSTr (Figure 23). Après montage des cristaux dans des capillaires de quartz et diffraction des rayons X (longueur d'onde utilisée 1.54 Å dans le cas du cuivre), les paramètres cristallins ainsi que les groupes d'espace ont pu être déterminés : $a = b = c = 122.6$ et $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, groupe d'espace P4₁32 ou son enantiomorphe P4₃32). Les données de la protéine native ont pu être enregistrées sur un seul cristal jusqu'à une limite de 2.8 Å en résolution. Le nombre de réflexions totales mesurées pour la protéine native sur un seul cristal est de 73744 dont 10467 réflexions indépendantes avec un $R_{sym} = 0.08$ sur toute la gamme de résolution (R_{sym} est un

facteur d'accord entre les réflexions équivalentes d'un même cristal).

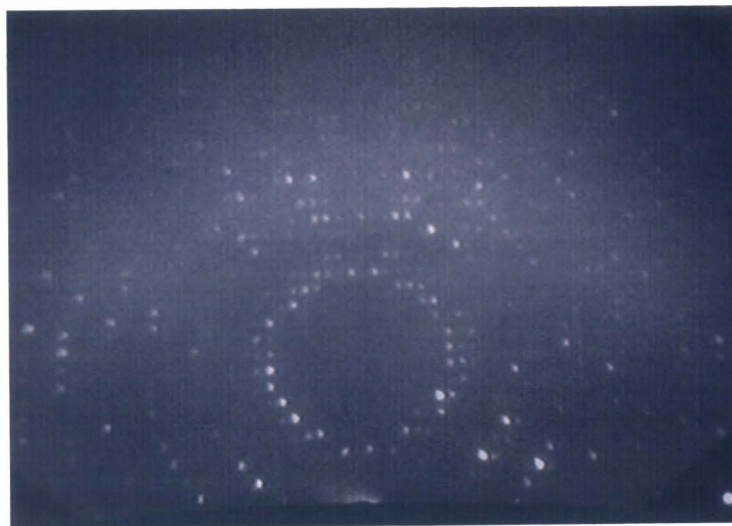
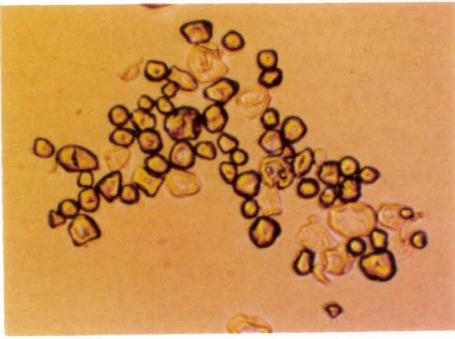


Figure 22 . Cliché de diffraction d'un cristal de Sm28GStr obtenue sur le détecteur bidimensionnel du système FAST.

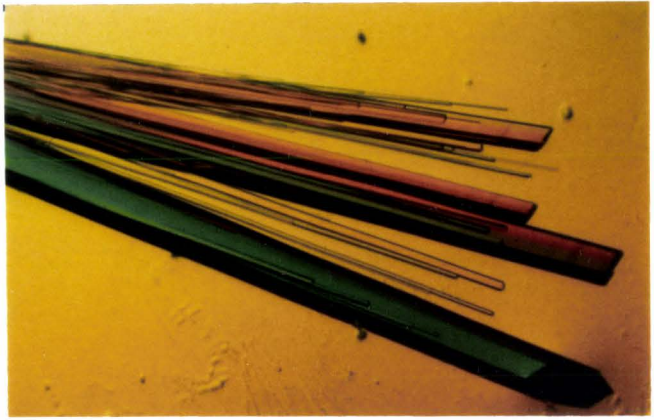
Ce cliché a été enregistré sur un générateur Enraf-Norius à anticathode tournante opérant à 40 KV et 70 mA. La distance cristal-détecteur est de 90 mm, la limite de résolution de 2.8 Å et le temps de pose de l'image de 180 sec.



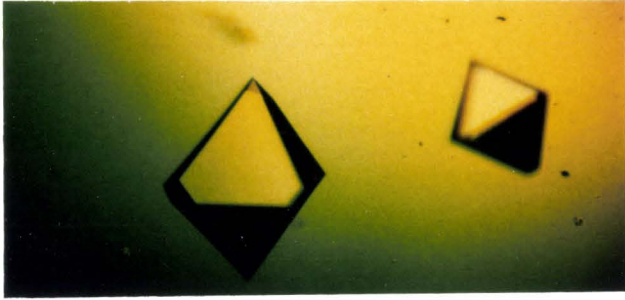
a



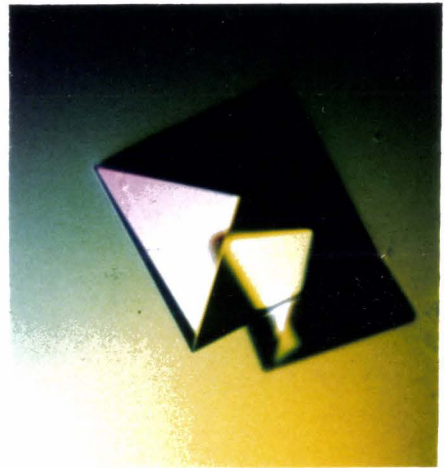
b



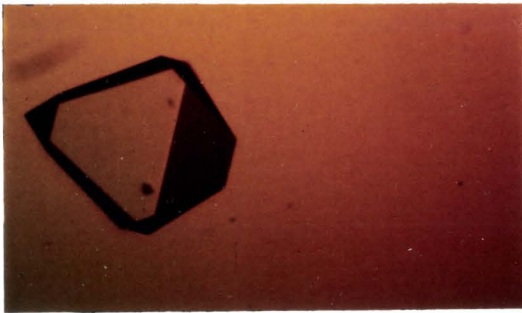
c



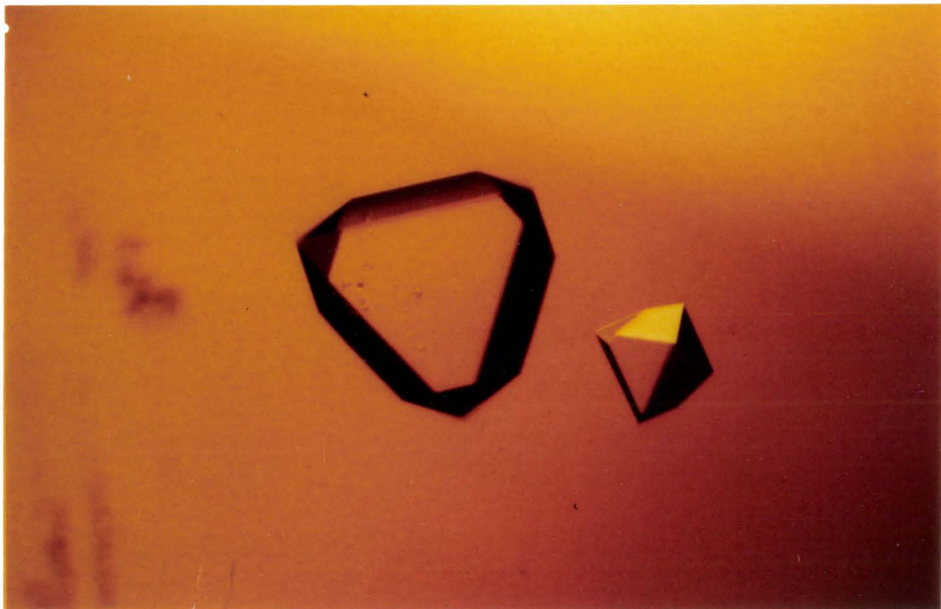
d



e



f



Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies of a Protective Cloned 28 kDa Glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*

François Trottein¹†, Marie-Christine Vaney², Bernard Bachet²
Raymond-John Pierce¹, Nathalie Colloc'h², Jean-Pierre Lecocq³
André Capron¹ and Jean-Paul Mornon²

¹Centre d'Immunologie des Maladies Transmissibles et Allergiques, Unité mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue de Professeur A. Calmette, 59019 Lille Cedex, France

²Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie, Universités Pierre et Marie Curie et Paris VII, CNRS URA 09, Tour 16, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

³Transgène S.A., 11 rue de Molsheim, 67082 Strasbourg Cedex, France

(Received 30 August 1991; accepted 29 November 1991)

Crystals of the recombinant 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* have been obtained by the hanging-drop method of vapor diffusion from ammonium sulfate solutions. The successful crystallization of this enzyme required the presence of a reducing agent and *S*-hexylglutathione. The crystals belong to the cubic space group $P4_132$ (or $P4_332$), with unit cell dimensions $a = 122.6$ Å and contain one molecule in the asymmetric unit. The crystals diffract to at least 2.8 Å resolution and are suitable for X-ray crystallographic structure analysis.

Keywords: crystallization, glutathione S-transferase, *Schistosoma mansoni*

Schistosomiasis is a chronic and debilitating parasitic disease that affects more than 200 million people and threatens over 500 million people in the Third World. The causal agents are helminth parasites of the genus *Schistosoma*. In the search for an anti-schistosomal vaccine, we have characterized and cloned a 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*, termed Sm28GST† (Balloul *et al.*, 1987a). The use of this native or recombinant protein in active immunization experiments led to a significant reduction in the worm burden in rats, mice, hamsters (Balloul *et al.*, 1987b) and baboons (Balloul *et al.*, 1987c). Moreover, the fact that a reduction in parasite fecundity is observed in vaccinated mice and baboons (Boulanger *et al.*, 1991)

reinforces the interest in this molecule, in that the egg-induced pathology and the level of transmission could be reduced in endemic areas by vaccination with Sm28GST. The glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) are a family of ubiquitous and multifunctional isoenzymes that are involved in detoxification and metabolism of many xenobiotics and endogenous compounds. Three evolutionary classes of cytosolic GSTs have been identified in mammals (Mannervik *et al.*, 1985): class α (subunits 1, 2), class μ (subunits 3, 4, 6) and class π (subunit 7). In *S. mansoni*, two families of GSTs have been detected with molecular masses of 26 and 28 kDa. One of them, Sm26GST, is related to the μ class (Trottein *et al.*, 1990). In contrast, Sm28GST is not closely related to any GST class, since it contains short regions homologous to mammalian class α (subunit 2) and class μ (subunit 3) GSTs, and since it possesses both glutathione (GSH) transferase and fatty acid hydroperoxide-GSH peroxidase (as subunit 7) activities (Taylor *et al.*, 1988). Although the precise role of Sm28GST in the parasite metabolism is unclear, it may play a pivotal function in the defence of the parasite

† Author for correspondence

‡ Abbreviations used: SmGSTs, glutathione S-transferases of *Schistosoma mansoni*; GSH, glutathione; EQ, equilibration buffer; DTT, dithiothreitol; SDS/PAGE, sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis; r.p.-h.p.l.c., reverse-phase-high pressure liquid chromatography; h.p.e., high-performance electrophoresis.

against the host immune response both by inhibiting lipid peroxidation and by scavenging hydroxyalkenals (Taylor *et al.*, 1988).

The expression of Sm28GST in *Escherichia coli* and its purification by a two-step affinity chromatography procedure allowed us to obtain sufficient quantities of pure material to initiate crystallographic studies. GSH and *S*-hexylGSH were used as affinity ligands, the latter probably inducing a higher stability of the enzyme-ligand complex. Some groups have reported success in crystallizing mammalian GSTs (Sesay *et al.*, 1987; Schäffer *et al.*, 1988; Cowan *et al.*, 1989; Parker *et al.*, 1990; Dirr *et al.*, 1991) although no data on the three-dimensional structure have been published except for a class π GST from pig lung (Reinemer *et al.*, 1991). The definition of the three-dimensional structure of Sm28GST is essential in determining the amino acids involved in the active site and in understanding the chemical mechanism of catalysis. Moreover, the three-dimensional characterization of the major epitopes of the molecule may constitute an essential step towards the construction of conformational peptides leading to an improved efficiency of immunization strategies. In order to do this attempts to crystallize recombinant Sm28GST have been initiated. We report here the first crystallization of a helminth glutathione S-transferase.

Sm28GST was expressed in *E. coli* strain TGE901 containing the plasmid pTG54 (provided by Transgène S.A., Strasbourg, France). After six hours of culture at 42°C, the cells were harvested by centrifugation at 2000 *g* for 20 minutes and the pellet was suspended in the equilibration buffer (EQ): 10 mM-potassium phosphate (pH 7.0), containing 1.15% (w/v) KCl, 0.5 mM-phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1 mM-EDTA and 50 μ g lysozyme/ml. After sonication, cellular debris was removed by centrifugation at 5000 *g* for 20 minutes. The supernatant was then passed through a GSH-agarose column as described (Simons *et al.*, 1981). After extensive washing with EQ (200 column volumes), Sm28GST was eluted with 10 mM-potassium phosphate (pH 9.1), containing 4 mM-GSH and 0.1 mM-dithiothreitol (DTT) and dialyzed against EQ plus 0.1 mM-DTT. The eluate was then applied to an *S*-hexylGSH-agarose column. After washing with EQ, elution was carried out with 50 mM-potassium phosphate (pH 9.1), containing 4 mM-*S*-hexylGSH and 1 mM-DTT. The eluate was extensively dialyzed against 50 mM-potassium phosphate (pH 7.4), containing 1 mM-DTT and then concentrated to 60 mg/ml by ultrafiltration (Amicon PM10). After the addition, to a final concentration of 0.02% (w/v) sodium azide, 1 mM-DTT and 4 mM-*S*-hexylGSH, the enzyme solution was filtered (0.45 μ m pore size) and stored at 4°C. The purity of the protein was checked by silver-stained SDS/PAGE, r.p.-h.p.l.c. and h.p.e. Enzymatic activity was tested spectrophotometrically at 340 nm with 4 mM-GSH and 0.5 mM-1-chloro-2,4-dinitrobenzene as substrates (Habig *et al.*, 1974). Crystals of Sm28GST were

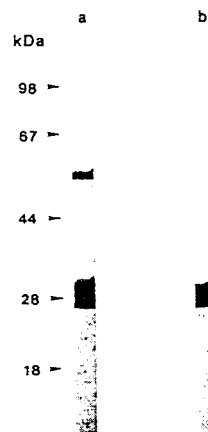


Figure 1. SDS/PAGE of Sm28GST in different redox states. After affinity chromatography (see the text), Sm28GST was dialyzed against 50 mM-potassium phosphate (pH 7.4) without DTT and concentrated by ultrafiltration. Protein samples (25 μ g) were incubated at room temperature for 24 h and run on a 13% SDS/PAGE without 2-mercaptoethanol (lane a) or in the presence of 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol (lane b). The gel was Coomassie Brilliant Blue-stained and destained with acetic acid/methanol/water (1/2/4, by vol.). Molecular mass marker proteins are indicated in kDa.

obtained by the hanging-drop vapor diffusion method with ammonium sulfate as precipitating agent (McPherson *et al.*, 1976).

Biochemical studies have revealed that reducing conditions are essential in order to avoid dimerization of Sm28GST, which may interfere with crystallogenesis. Indeed, in the absence of a reducing agent during purification and storage steps, there is formation of a dimeric form (Fig. 1, lane a) leading to a molecular mixture of monomer/dimer (molar ratio: 4/1). This dimer, with molecular mass of 58 ± 2 kDa, can be reversibly transformed into the monomeric form by the addition of DTT or 2-mercaptoethanol to the mixture (Fig. 1, lane b). These data and the unsuccessful attempts to dimerize Sm28GST in the presence of *N*-ethylmaleimide or 4-vinylpyridine suggest the presence of a disulfide bond between monomers in the dimer (B. Cavallini, personal communication). Consequently, to ensure molecular homogeneity, we have used 2-mercaptoethanol in crystallization experiments. A panel of crystallization conditions was tested using different combinations of initial protein concentrations (15 to 60 mg/ml), precipitant concentrations (40 to 80%, v/v, saturated ammonium sulfate) and pH (6 to 10) at room temperature. Attempts to crystallize the enzyme in the presence of saturated ammonium sulfate in concentrations greater than 55% (v/v) resulted in an irreversible precipitation of Sm28GST. The following conditions gave the best results: a 10 μ l hanging drop containing 5 μ l of Sm28GST solution plus 5 μ l of reservoir, which gives an initial protein concentration of 30 mg/ml. The reservoir contained 50 mM-potassium phosphate (pH 7.6 to 8.3), 48 to

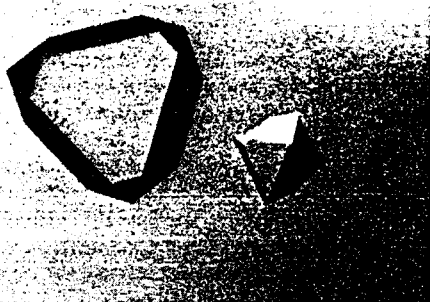


Figure 2. Photomicrograph of crystals of Sm28GST. Cubic crystals of Sm28GST were produced in hanging drops, set up in 24-well tissue culture plates (Linbro), by mixing 5 μ l of protein solution (60 mg/ml) and 5 μ l of reservoir buffer containing 50 mM-potassium phosphate (pH 7.63), 50% (v/v) saturated ammonium sulfate, and including 0.02% (w/v) sodium azide and 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol. Single drops were equilibrated over 1 ml reservoirs on siliconized microscope coverslips (Aquasil; Pierce), which were then sealed at the top with high-vacuum grease. The crystals shown are, respectively, 0.6 mm and 0.2 mm in each dimension.

50% saturated ammonium sulfate, 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol and 0.02% (w/v) sodium azide. Depending on the pH, crystals appeared within a few weeks as a cluster of needles (pH > 8) or with tetrahedral bipyramid morphology (pH < 8), although in one drop we noted polymorphic crystals. Observation under a polarized light microscope has shown no birefringence for one type of crystal (cubic crystals), while birefringence was noted for the other (needles), leading to the conclusion that Sm28GST could crystallize in at least two different crystal systems. Nevertheless, only cubic crystals seem large enough for collecting X-ray data (Fig. 2). Other crystallization conditions are now being tested to obtain other crystalline forms suitable for X-ray studies. We have noticed that the cubic form has never been described for other crystallized GSTs. Cubic crystals (0.7 mm \times 0.6 mm \times 0.6 mm) suitable for X-ray analysis of the native data set grew from 50% saturated ammonium sulfate at pH 7.82. X-ray precession photographs of these crystals indicate that they diffract strongly and are relatively insensitive to radiation damage. X-ray diffraction data were collected at room temperature on a FAST area detector system using CuK α radiation from a rotating-anode X-ray generator (Enraf-Nonius). The unit cell parameters were determined and refined with ENDEX and MADNES programs (Messerschmidt & Pflugrath, 1987): $a = b = c = 122.6$ \AA (1 $\text{\AA} = 0.1$ nm). The area detector was then set to a distance of 90 mm from the crystal with the 2θ arm of the detector positioned at an angle of 18° , allowing data collection of the native data set beyond 2.8 \AA resolution. Images of 0.15° were collected for a total crystal rotation of 90° from one crystal and were processed during data

collection with MADNES. The symmetry and systematic absences of the diffraction patterns indicate the cubic space group $P4_132$ (or its enantiomorph $P4_332$) with 24 asymmetric units per cell. The unit cell volume of $(122.6)^3$ \AA^3 gives a ratio of unit cell volume per unit molecular mass of 2.73 $\text{\AA}^3/\text{dalton}$, giving rise to an estimated solvent content of 55%, assuming that there is only one monomer in the asymmetric unit. These values are within the observed range reported by Matthews (1968) for other protein crystals. Heavy-atom derivatives are now being screened.

This work was supported by INSERM U167-CNRS 624, the Edna McConnell Clark foundation (grant number 11389) and the European Economic Community (grant number TS1-M-0436-F). We gratefully thank Transgène S.A., Strasbourg, France, for the gift of the expression vector producing Sm28GST. We thank C. Verwaerde, D. Williams and J. M. Grzych for kind and helpful discussions, and C. Godin and C. Drolez for excellent technical assistance.

References

- Balloul, J. M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvalho, D., Lecocq, J. P. & Capron, A. (1987a). Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature (London)*, **326**, 149–153.
- Balloul, J. M., Grzych, J. M., Pierce, R. J. & Capron, A. (1987b). A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **138**, 3448–3453.
- Balloul, J. M., Boulanger, D., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvalho, D., Lecocq, J. P. & Capron, A. (1987c). Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli*. In *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites* (McInnis, A., ed.), pp. 77–84, Alan R. Liss, Inc., New York.
- Boulanger, D., Reid, G. D., Sturrock, I., Wolowczuk, I., Balloul, J. M., Grezel, D., Pierce, R. J., Otieno, M. F., Guerret, S., Grimaud, J. A., Butterworth, A. E. & Capron, A. (1991). Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Immunol.* **13**, 473–490.
- Cowan, S. W., Bergfors, T., Jones, T. A., Tibbelin, G., Olin, B., Board, P. G. & Mannervik, B. (1989). Crystallization of GST2, a human class α -glutathione transferase. *J. Mol. Biol.* **208**, 369–370.
- Dirr, H. W., Mann, K., Huber, R., Ladenstein, R. & Reinemer, P. (1991). Class π glutathione S-transferase from pig lung: Purification, biochemical characterization, primary structure and crystallization. *Eur. J. Biochem.* **196**, 693–698.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M. & Jornvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione

- transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 82, 7202-7206.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- McPherson, A. (1976). The growth and preliminary investigation of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis. In *Methods of Biochemical Analysis* (Glick, D., ed.), vol. 23, pp. 249-345, J. Wiley, New York.
- Messerschmidt, A. & Pflugrath, J. W. (1987). Crystal orientation and X-ray pattern prediction routines for area detector diffractometer systems in macromolecular crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* 20, 306-315.
- Parker, M. W., Bello, M. L. & Federici, G. (1990). Crystallization of glutathione S-transferase from human placenta. *J. Mol. Biol.* 213, 221-222.
- Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gallay, O. & Huber, R. (1991). The three-dimensional structure of class π glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *EMBO J.* 10, 1997-2005.
- Schäffer, J., Gallay, O. & Ladenstein, R. (1988). Glutathione transferase from bovine placenta; Preparation, biochemical characterization, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a neutral class p enzyme. *J. Biol. Chem.* 263, 17405-17411.
- Sesay, M. A., Ammon, H. L. & Armstrong, R. N. (1987). Crystallization and a preliminary X-ray diffraction study of isoenzyme 3-3 glutathione S-transferase from rat liver. *J. Mol. Biol.* 197, 377-378.
- Simons, P. C. & Vander Jagt, D. L. (1981). Purification of glutathione S-transferases by glutathione-affinity chromatography. In *Methods in Enzymology* (Jakoby, W. B., ed.), vol. 77, pp. 235-237, Academic Press, New York.
- 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. & Ketterer, B. (1988). The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned M_r 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 7, 465-472.
- Trottein, F., Kieny, M. P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schmitt, D., Lecocq, J. P. & Capron, A. (1990). Molecular cloning and tissue distribution of a 26 kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41, 35-44.

Edited by R. Huber

Note added in proof. This work is dedicated to the memory of Dr Jean-Pierre Lecocq.

3- Elucidation de la structure 3D de la Sm28GST

3-1- Remplacement isomorphe

L'existence de monocristaux cubiques issus des expériences de cristallisation a permis de poursuivre les étapes ultérieures de la détermination de la structure 3D de la Sm28GST et notamment de permettre de ré-effectuer des mesures à plus haute résolution. En effet, alors que la résolution due à la diffraction des rayons X a atteint une valeur de 2.8 Å sur le système diffractométrique-détecteur bidimensionnel FAST ($\lambda = 1.54$ Å), l'utilisation du rayonnement du synchrotron de LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique) d'Orsay nous a permis d'obtenir une résolution de 1.87 Å (une résolution au-delà de 1.5 Å permet de voir les atomes individuellement). Les données de diffraction du synchrotron peuvent constituer un apport important d'informations dans la détermination précise des interactions entre atomes non-liés. De plus, l'élucidation de la valeur du facteur d'agitation thermique moyen des atomes composant la molécule (16 \AA^2) a confirmé la cohérence des données de diffraction.

Dans les conditions décrites de l'article 3, la Sm28GSTr a cristallisé dans un système cubique et 24 unités asymétriques sont présentes dans la maille cristalline (volume qui se répète par translation dans le cristal). Parmi les 7 systèmes cristallins, le système cubique présente le plus grand nombre d'axes de symétrie (d'ordre 2, 3 et 4). La description de protéines ayant cristallisé en système cubique existe dans la littérature, mais le groupe d'espace $P4_132$ est rare. Ce système de symétrie complexe et à groupe d'espace original, a entraîné une multiplication et une complexification des données de diffraction. La manipulation d'un logiciel existant, mais mieux adapté à ce cas de figure, a ainsi été nécessaire (Vaney. M. C, communication personnelle).

De même, si la localisation des tâches de diffraction et de leurs intensités sont enregistrables, leurs phases sont inaccessibles par les méthodes classiques de détection. Le marquage des protéines du cristal à l'aide de dérivés d'atomes lourds (par diffusion dans le cristal) constitue une voie d'approche pour résoudre ce problème. La comparaison des intensités diffractées avec et sans le métal lourd dépendent des phases dont on peut alors calculer les valeurs par raisonnement inverse. Les métaux lourds suivants ont été testés jusqu'à présent sans succès : UO_2 Acétate (uranium), K_2PtCl_4 (platine), CH_3HgCl (mercure) et $\text{Na}_4[\text{W}(\text{CN})_8]$ (tungstène).

Cependant, les données de diffraction recueillies après diffusion du diméthyl de plomb permettent de penser que l'atome lourd a diffusé correctement dans le cristal. La localisation précise des sites de fixation du plomb dans la molécule est en cours d'étude et permettra prochainement d'initier la construction de la structure 3D de la Sm28GStr.

3-2- Obtention d'un autre système cristallin

3-2-1 Conditions de cristallisation employées

Parallèlement, nous avons entrepris de cristalliser la Sm28GST dans un autre système dont les données de diffraction sont plus simples à décrypter (150 conditions différentes). Le même agent précipitant est employé (48-46% de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, pH 7.8-7.4) mais certains paramètres biochimiques sont modifiés : substrat différent et/ou addition d'inhibiteur enzymatique spécifique. Nous espérons ainsi modifier légèrement l'environnement et la conformation de la molécule afin de favoriser un autre système de cristallisation :

1/ les analogues du glutathion suivants ont été utilisés à une concentration finale de 5 mM : GSH, sulfonateGSH, S-butylGSH, ShexylGSH, S-(p-azidophénylacyl)GSH, S-(p-nitrobenzyl)GSH, S-(p-chlorophénylacyl)GSH et le CoenzymeAGSH-disulfide.

2/ deux inhibiteurs chimiques ont été employés : le produit A (propriété industrielle de Rhône-Poulenc Agrochimie) et le 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)-propane. Ceux-ci inhibent totalement l'activité enzymatique de la Sm28GST à la concentration utilisée : 4 mM.

Pour cela, une double purification sur colonne de GSH-agarose est réalisée par la méthode standard. Après dialyse intensive et concentration de la protéine à 60mg/ml, l'analogue du GSH ou l'inhibiteur chimique est ajouté dans la goutte comme précédemment décrit.

3-2-2 Résultats

- Le sulfonateGSH et le S-(p-chlorophénylacyl)GSH ont entraîné la formation de "houppettes" ou des paquets de cristaux tridimensionnels très fins non analysables aux rayons X (Figure 24 a et b).
- L'utilisation des inhibiteurs enzymatiques a donné des précipités amorphes (en sphérule, Figure

24), des cristaux en plaquettes et parfois des cristaux cubiques.

- Les autres conditions ont, une nouvelle fois, conduit à la formation de cristaux cubiques. De façon encourageante, l'utilisation des analogues S-(p-nitrobenzyl)GSH et S-butylGSH a donné naissance à des cristaux cubiques de très grande taille ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$). La croissance de ces cristaux a été malheureusement interrompue par l'épuisement de la goutte de départ. Des cristaux de telle taille sont extrêmement rares et des essais sont déjà en cours afin d'obtenir des cristaux de grande taille (par la technique de la goutte assise dont le volume est plus grand) utilisables pour la diffraction des neutrons. celle-ci permet en effet de déterminer la position des atomes d'hydrogène (par obtention de la carte des densités électroniques des hydrogènes) et ainsi d'interpréter de façon très fine les sites actifs et les mécanismes enzymatiques de la molécule.

- Seule, la condition suivante a entraîné la formation de cristaux non cubiques ($0.2 \times 0.3 \times 0.5 \text{ mm}^3$) ayant diffracté à basse résolution : GSH, pH 7.6, 48% $\text{NH}_4 (\text{SO}_4)_2$. La symétrie de ce cristal semble orthorhombique et les paramètres de la maille sont en cours d'analyse. Cette condition est actuellement exploitée afin d'améliorer les qualités des cristaux dans ce système.

3-3- Modélisation moléculaire et remplacement moléculaire

Si la relation entre structure 3D et fonction est étroite, le code entre la structure primaire et la structure tertiaire d'une macromolécule est souvent dégénéré (pas de correspondance univoque) et son élucidation reste un rêve pour les cristallographes (Keim et coll. 1981 et Bryant et coll. 1988). Cependant, la nature a parfois réussi à reproduire un plan architectural donné, accompagné d'une fonction biologique donnée, à partir de séquences primaires divergentes mais dérivant d'un ancêtre commun (Kuriyan et coll. 1991). Il est maintenant certain que la structure tertiaire des protéines se conserve mieux au cours de l'évolution que la structure primaire (Petsko et coll. 1991).

D'un point de vue séquentielle et enzymatique, la Sm28GST se situe au carrefour des 3 familles multigéniques de GST de mammifère (α , μ et π). Cependant, l'analyse comparative en Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) a permis de mettre en évidence des analogies structurelles avec la GST de classe π , dont le structure 3D a été publiée par Reinemer et coll. (1991). Ces auteurs ont identifié les aa dont les chaînes latérales participent au site de fixation du GSH (Tableau 5). La capacité de fixer le GSH étant commune à toutes les GSTs, il est logique de retrouver ces aa

à des positions équivalentes chez les GSTs de schistosome et chez les GSTs de mammifère de classe α et μ . Nous remarquerons dans le tableau ci-dessous que les aa de la Sm28GST sont conservés à 80% (90% en homologie) et que la GST de classe α montre des différences plus marquées.

GST π	Sm28GST	Sm26GST	Yp (π)	Yb1 (μ)	Yc (α)
Tyr 7	Tyr 10	Tyr 7	Tyr 8	Tyr 7	Tyr 9
Gly 12	Gly 13	Gly 12	Gly 13	Gly 12	Gly 12
Arg 13	Arg 14	Val 15	Arg 14	His 15	Arg 13
Trp 38	Trp 41	Trp 41	Trp 39	Trp 46	Leu 41
Lys 42	Lys 43	Lys 45	Lys 45	Lys 50	Arg 43
Gln 49	Arg 52	Gln 51	Gln 52	Asp 56	Gln 53
Pro 51	Pro 54	Pro 53	Pro 54	Pro 58	Pro 56
Gln 62	Glu 70	Gln 67	Gln 65	Gln 69	Glu 59
Ser 63	Ser 71	Ser 68	Ser 66	Ser 70	Thr 68
Glu 95	Glu 96	Glu 96	Glu 98	Glu 96	Glu 95
	-----	-----	-----	-----	-----
	8/10	9/10	10/10	8/10	6/10

Tableau 7 . Comparaison des aa impliqués dans le site de fixation du GSH d'une GST de classe π de mammifère avec les aa correspondants de GSTs de schistosome et de mammifère.

Les aa du site G de la GST de classe π isolée du poumon de porc (Reinemer et coll. 1991) sont comparés avec les aa correspondants chez les GSTs de schistosome et les GSTs de rat de classe π (Yp, Suguoka et coll. 1985), μ (Yb1, Ding et coll. 1985) et α (Yc, Telakowski-Hopkins et coll. 1985).

La modélisation de la Sm28GST à partir de la structure 3D de la GST de classe π de porc (publiée par Reinemer) et essentiellement à partir de la structure 3D de la GST de classe μ de rat (puisque nous disposons des coordonnées atomiques) semble possible et en particulier à partir du site G. La modélisation à partir du site H, qui détermine probablement les propriétés enzymatiques de chaque GST et paraît davantage spécifique de la famille, semble plus difficile qu'à partir du site G. Cependant, la comparaison des structures 3D de ces deux enzymes (μ et π) indique un même repliement à l'exception des boucles entre les éléments structuraux.

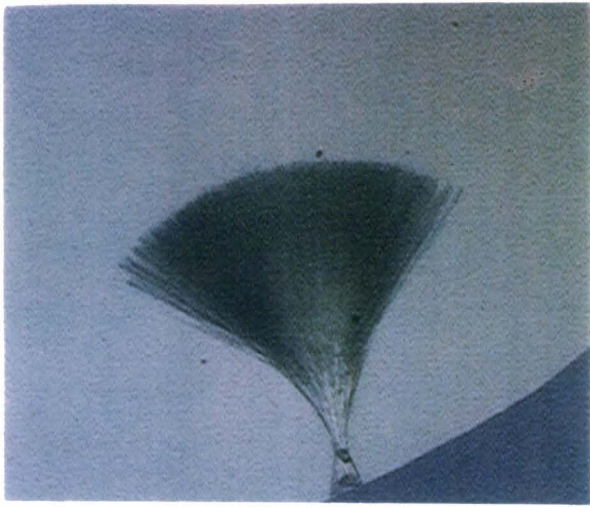
3-4 Conclusion

La conjugaison des approches par cristallographie et par modélisation vont permettre, dans un proche avenir, de résoudre la structure 3D de la Sm28GST. Plusieurs zones seront particulièrement analysées :

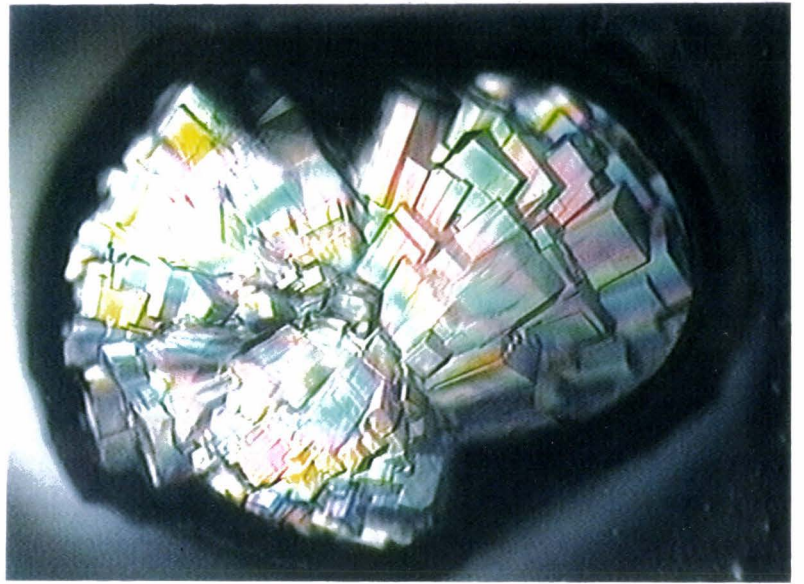
- Les régions N- (**10-43**) et C-terminales (**190-211**), qui semblent participer à la formation de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal S13 (Xu et coll. 1990 et 1992). Cet épitope est probablement situé à la surface de la molécule.
- Les régions **32-54** et **171-189**, très conservées chez les GSTs de 28 kDa de schistosome (Trottein et coll. 1992) et à caractère hydrophobe, sont probablement "enfouies" à l'intérieur de la molécule. Nous pouvons penser que la région 171-189 forme la poche hydrophobe pouvant accueillir le substrat électrophile (site H).
- La région **115-131** est un épitope T/B majeur impliqué dans la protection (Wolowczuk et coll. 1991). Cette zone est vraisemblablement exposée à la surface de la molécule.

Enfin, l'approche par modélisation permettra de comparer les topographies des GSTs de 28 kDa chez les 4 espèces majeures de schistosome. Cette étude pourra s'insérer dans un programme de lutte contre les principaux agents étiologiques des schistosomiasis humaines et animales, à partir de préparations peptidiques mieux adaptées aux variations interspécifiques.

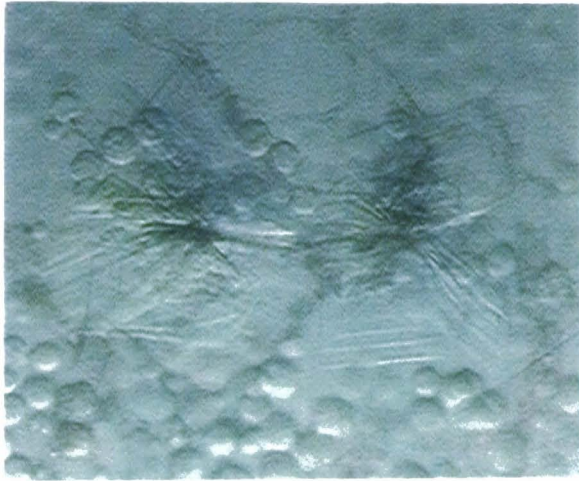
a



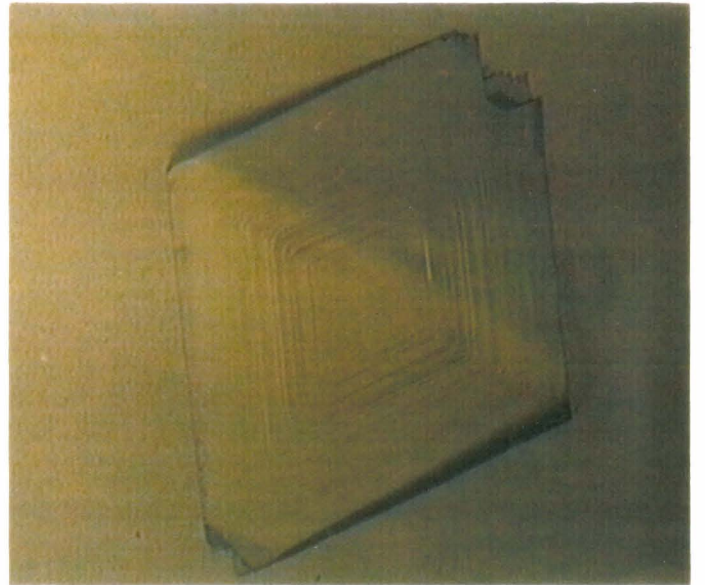
b



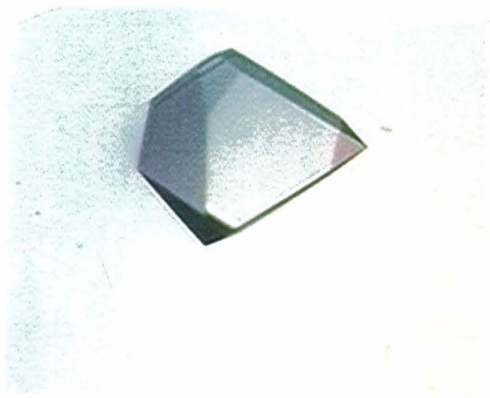
c



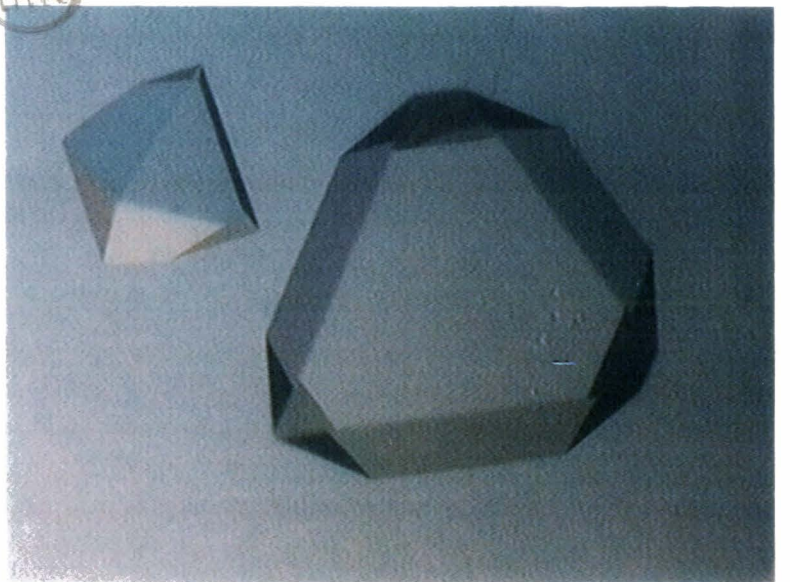
d



e



f



DISCUSSION
CONCLUSION

Notre travail de thèse s'inscrit dans le contexte général du développement d'un vaccin contre la schistosomiase, vaccin moléculairement défini à base de protéines recombinantes.

Les retombées directes de nos travaux sont les suivantes :

- * Contribution au développement d'un vaccin polyantigénique dirigé contre la schistosomiase par la caractérisation d'un candidat moléculaire supplémentaire : **Sm26GST**
- * Contribution au développement d'un vaccin dirigé contre les espèces majeures de schistosome infectant l'homme et le bétail par le clonage moléculaire des candidats vaccinaux majeurs : **Sb28GST** et **Sh28GST**
- * Contribution au développement d'un vaccin synthétique contre la schistosomiase par l'élucidation de la structure tridimensionnelle du candidat antigénique majeur : **Sm28GST**

La mise au point d'un vaccin sûr et efficace contre les grandes endémies parasitaires représente encore de nos jours un réel défi pour la communauté scientifique. Contrairement à certaines parasitoses (paludisme, leishmaniose), l'obtention d'une immunité stérilisante n'est pas forcément obligatoire dans le cas de la schistosomiase. En effet, une préparation vaccinale, à base de molécules synthétiques ou recombinantes, réduisant durablement la morbidité des populations, limitant les formes aiguës de la maladie et contrôlant la transmission serait acceptable. Par ailleurs, ce vaccin doit être efficace contre les espèces majeures de schistosome infectant l'homme (*S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*) et la notion de polyspécificité doit être introduite.

L'importance économique de la schistosomiase bovine et ovine (principalement dûe à *S. bovis*) pour les pays Africains exportateurs de viande laisse présager qu'un programme de vaccination limitant la pathologie (et un retour au poids normal de l'animal) et réduisant la mortalité des jeunes animaux constituerait un moyen efficace d'aide au développement pour les pays concernés.

La mise au point d'un vaccin repose sur l'élucidation et la compréhension des mécanismes immunitaires responsables de la résistance à la réinfection chez l'animal de laboratoire et chez l'homme. Cette résistance peut être partiellement induite par immunisation avec des préparations parasitaires atténuées ou avec des molécules parasitaires plus ou moins purifiées. Dans notre laboratoire, l'espoir majeur est fondé sur une enzyme à activité glutathion-S-transférase de 28 kDa

isolée de *S. mansoni* (Sm28GST). L'immunisation par cette protéine induit, dans de nombreux modèles animaux, une nette réduction de la charge vermineuse et affecte de façon qualitative et quantitative la fertilité des vers femelles. L'impact sur la pathologie associée aux dépôts des oeufs tissulaires et sur la transmission de la maladie est évident. Il semble donc que toutes les conditions soient réunies pour la mise en place d'une campagne de vaccination chez l'homme. Cependant, au début de notre programme, divers questions se posaient :

- Parmi les deux composants enzymatiques constituant les SmGSTs, quelle est l'importance ou le rôle de la forme minoritaire de 26 kDa dans la physiologie du schistosome ?

- Dans le contexte d'une vaccination basée sur l'emploi de plusieurs antigènes, actuellement conseillée par l'OMS, quelle peut être la place de la Sm26GST ?

Peut-on mettre en évidence des points communs ou des différences d'ordre biologique, biochimique ou immunologique entre les formes 28 et 26 kDa ?

- De même, si la Sm28GST est efficace en système homologue d'infestation, des échecs relatifs de protection croisée sont notés en système hétérologue d'infestation (Boulanger et coll. 1991b).

Peut-on apporter des éléments d'explication à ce phénomène et notamment par l'obtention des séquences polypeptidiques des 28GSTs chez les différentes espèces de schistosome ?

- Enfin, d'un intérêt appliqué et fondamental, la résolution de la structure tridimensionnelle de la Sm28GST constituerait une source de renseignements utiles pour l'amélioration des propriétés vaccinales de la molécule. Si l'approche par cristallogénèse semble la mieux adaptée, car à l'époque aucun modèle 3D de GST n'était disponible, comment et par quels moyens peut-on aborder ce domaine ?

Ces nombreuses interrogations ont orienté nos recherches vers trois axes principaux dont les résultats sont discutés ci-dessous sous forme de synthèse.

A l'heure actuelle, il est possible d'orienter une réponse immune vers un isotype particulier dirigé sélectivement contre un épitope précis d'une molécule. Par conséquent, la compréhension des **fonctions métaboliques des GSTs de schistosome**, l'élucidation des **mécanismes moléculaires sous-tendant les effets vaccinaux** ainsi que l'identification des **régions de la molécule impliquées dans un mécanisme particulier** (site catalytique, épitope inducteur ou cible d'une réponse immune) pourraient être d'un grand secours dans l'optimisation de l'efficacité d'une préparation vaccinale contre les schistosomiasis

1/ Fonctions métaboliques des SmGSTs

La réduction de la charge parasitaire et, de façon concomitante, l'altération de la fécondité des vers femelles semblent représenter des effets post-vaccinaux indépendants et complémentaires et pourraient trouver leur origine dans la dualité fonctionnelle des SmGSTs et particulièrement dans celle de la 28 kDa.

1-1 la Sm26GST

Dans la première partie de notre programme, nous avons cloné l'ADNc codant pour la Sm26GST et évalué les propriétés biologiques de la molécule recombinante *in vivo* et *in vitro*.

Nous avons mis en évidence *in vitro* une activité détoxifiante de la Sm26GST face aux composés létaux générés par des macrophages activés par des anticorps spécifiques (ADCC) ou par H_2O_2 . Cet effet protecteur, dont la valeur maximale atteint 60 à 65%, s'exerce vis-à-vis du schistosomule, stade cible des effecteurs immuns. Nous pouvons nous interroger sur l'existence *in vivo* du phénomène de détoxification engendré par la Sm26GST tant au niveau du schistosomule qu'au niveau du ver adulte.

- Ward et coll. (1987) ont noté, lors d'une infection expérimentale chez la souris, la présence de macrophages autour des larves pendant la phase d'élimination du parasite démontrant ainsi *in vivo* la relevance du mécanisme cytocide des macrophages.

- Parallèlement à notre observation, Davern et coll. (1990) ont identifié, dans des sérums de

patients infectés par *S. japonicum*, des complexes circulants de Sj26GST associés à des dérivés lipidiques d'origine tégumentaire (via le site actif de l'enzyme) : Sj26GST-phosphorylcholine. Ces auteurs ont établi une corrélation entre le taux de ce complexe circulant et la résistance à la réinfection après traitement par le praziquantel chez des sujets humains. Ce résultat, renforcé par le fait que des peroxydations lipidiques (médiées par certaines cellules immunes) génèrent des dérivés aldéhydiques capables de se fixer aux GSTs (Danielson et coll. 1987) suggère que la forme 26 kDa des GSTs de schistosome peut intervenir dans des réactions moléculaires résultant de l'altération des membranes (catabolisme de la phosphatidyl-choline...).

- Nous avons vu dans l'Introduction, que parallèlement à leurs activités catalytiques, les GSTs pouvaient fixer des molécules électrophiles toxiques assurant ainsi, par sacrifice de l'enzyme, des fonctions de transport, de stockage et de détoxification. Une étude portant sur la GST de 26 kDa de *S. japonicum* a révélé une forte activité vis-à-vis de certains alkénals* et notamment le 4-hydroxynonéal (Crowley et coll. 1991 et Barrett et coll. 1991) : produit secondaire des peroxydations lipidiques extrêmement toxique pour la cellule (Esterbauer et coll. 1982).

Il apparaît donc possible, à la vue de ces différentes observations, que la forme 26 kDa des GSTs de schistosome puisse jouer un rôle de détoxification consécutif à la libération des radicaux libres et à la genèse des processus de lipoperoxydation producteurs de dérivés aldéhydiques toxiques.

1-2 La Sm28GST

(a) Si la Sm28GST n'a pas d'action protectrice dans notre modèle particulier d'étude (problème d'accessibilité aux composés toxiques ?), il ne faut cependant pas négliger son intervention potentielle dans la détoxification des métabolites générés par les radicaux libres. Taylor et coll. (1988) ont en effet démontré une activité enzymatique de la Sm28GST vis-à-vis des hydroperoxydes d'acides gras (de l'acide linoléique). De plus, Boulanger et coll (1991) ont détecté une activité protectrice de la Sm28GST vis-à-vis de schistosomules cultivés en présence du butylhydroperoxyde. Par conséquent, il est probable que la Sm28GST constitue un moyen de

* La terminologie 4-hydroxyalkénal est empruntée du mot anglais "4-hydroxyalkenal" et représente une fonction aldéhyde α ou β insaturé possédant un groupement hydroxyle en position 4 ; le dérivé α étant très réactif.

défense contre les hydroperoxydes (grâce à sa fonction glutathion peroxydasique) et la Sm26GST puisse intervenir ultérieurement dans l'élimination des dérivés aldéhydiques cytotoxiques.

Il reste à déterminer les modes d'action des SmGSTs dans les mécanismes de détoxification et d'élimination des composés toxiques pour le parasite. Interviennent-elles de façon active et concertée dans une chaîne de réactions biochimiques ou ont-t-elles des fonctions moins spécifiques de fixation ?

(b) Parallèlement à leur rôle détoxifiant, les GSTs peuvent parfois intervenir dans l'anabolisme cellulaire grâce à leurs capacités de transformation et de transport de molécules. L'effet anti-fécondité observé par immunisation avec la Sm28GST dans divers modèles expérimentaux, va dans le sens d'une telle fonction *in vivo*. Les circuits métaboliques aboutissant à la formation de l'oeuf sont encore mal compris chez le schistosome mais nous pouvons penser qu'une perturbation du métabolisme du couple puisse avoir une incidence sur la fonction de reproduction. VanDeWaa et coll. (1987) ont démontré que des modifications dans les voies métaboliques pouvaient entraîner une diminution marquée de la ponte. Le mévilonate diminue la ponte de 90% *in vivo* et *in vitro* en bloquant sélectivement la 3-hydroxyméthylglutaryl-transférase-Coenzyme A réductase, enzyme essentielle dans la formation du cholestérol et des lipides non-stéroïdiens.

Des expériences sont actuellement en cours afin de démontrer l'implication et de préciser le mode d'action biochimique de la Sm28GST dans l'expression des phénomènes de la ponte.

En conclusion, la Sm28GST semble être impliquée dans les processus de détoxification et dans le métabolisme conduisant à la formation des oeufs du schistosome.

2- Accessibilité et neutralisation des SmGSTs

La démonstration de l'importance métabolique des SmGSTs semble confirmer l'hypothèse de Mitchell et coll. (1989) selon laquelle l'inactivation des GSTs de schistosome par une réponse immunitaire spécifique, pourrait rendre le parasite plus sensible face aux agressions des cellules

effectrices. Il reste cependant à démontrer *in vivo* :

- (a) que les GSTs soient accessibles aux agents de la réponse immunitaire.
- (b) que l'inexpression de l'activité enzymatique des GSTs contribue à une augmentation de la vulnérabilité du schistosomule et/ou du ver adulte.

(a) Les méthodes actuelles de détection ne nous ont pas permis de démontrer la présence des SmGSTs dans les produits d'excrétion-sécrétion des stades adulte et schistosomule (non montré). Pourtant, à la vue des résultats de microscopie électronique, qui démontre la localisation sous-tégumentaire des SmGSTs, des lésions membranaires mineures au niveau du ver adulte ou du schistosomule suffiraient à exposer ces enzymes à la surface du parasite ou leur libération dans le milieu extérieur (Davern et coll. 1990). De plus, pendant la formation des membranes (le schistosome a une structure multilamellaire, Torpier et coll. 1977 et McLaren et coll. 1980), il est possible que les SmGSTs soient présentes à la surface du schistosome. Cette hypothèse a été confirmée par l'identification de la Sm28GST lors d'un marquage de surface de schistosomule (Balloul et coll. 1985). L'immunogénicité naturelle de la Sm28GST au cours de l'infection laisse supposer l'existence de ce phénomène *in vivo*. Malgré une très faible immunogénicité naturelle durant l'infection, la localisation néphridienne de la Sm26GST suggère l'excrétion de cette molécule.

(b) L'inactivation enzymatique de la Sm26GST (par addition d'inhibiteurs chimiques ou par chauffage) abroge *in vitro* la protection apportée par l'enzyme pour les schistosomules contre l'attaque des macrophages activés. Cependant, l'adjonction du 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)-propane (inhibiteur chimique des SmGSTs utilisé comme témoin dans nos expériences) dans un milieu de culture contenant des schistosomules, n'a pas entraîné de mortalité accrue des larves cultivées pendant 16 heures. Il est possible que ce composé soit incapable de franchir la barrière tégumentaire du parasite et d'inactiver les SmGSTs endogènes du parasite. D'autre part, le schistosomule peut lui-même cataboliser ce composé.

Pour contourner ce problème, nous pouvons imaginer l'introduction de cet inhibiteur enzymatique dans des micelles lipidiques et évaluer par la suite son action sur la sensibilité du parasite (*in vitro*). La démonstration *in vivo* est extrêmement difficile : la production de mutants

délétés en l'une des deux enzymes (par double recombinaison homologue) est impossible chez le schistosome avec les techniques actuelles. De même, aucune lignée cellulaire de schistosome n'est actuellement disponible. La transfection des ADNc ou des gènes correspondants à la Sm28GST ou à la Sm26GST dans des lignées cellulaires d'insecte ou de mammifère est par contre réalisable. Parallèlement, la construction de souris transgéniques possédant le gène Sm28GST sera fort utile dans l'élucidation des fonctions précises de ces enzymes.

En conclusion, l'analyse de la localisation ultrastructurale des SmGSTs laisse entrevoir une expression transitoire de ces enzymes à la surface tégumentaire du schistosome. Celle-ci permettrait l'accessibilité et la neutralisation ultérieure des SmGSTs par des effecteurs immuns appropriés.

3-Stades cibles de l'immunité anti-SmGSTs

3-1 Le schistosomule

Il est logique de constater que le stade schistosomule, cible préférentielle des effecteurs immuns, dont l'expression repose sur la production d'agents oxydatifs puissants (Joseph et coll. 1980), exprime moins de SmGSTs que les autres stades.

Dans le modèle du rat, l'immunisation par la Sm26GSTr en présence d'alun réduit la charge parasitaire de façon significative (17 à 25 %) et il est possible qu'une neutralisation directe des fonctions enzymatiques de la Sm26GST au niveau du schistosomule participe, au côté des mécanismes de l'ADCC, à la réduction de la charge parasitaire. L'expérience de protection décrite dans notre mémoire nécessite quelques commentaires :

Dans le cadre du développement d'un vaccin monoantigénique contre la schistosomiase, l'obtention de 17 à 25% de protection reste insuffisante. La mise en place de nouveaux protocoles, visant à optimiser la présentation de l'antigène ou à y associer des immunostimulants appropriés, constitue un axe de travail à ne pas négliger. De même, l'utilisation de cette molécule en association avec d'autres antigènes à potentiels protecteurs (par création "d'un cocktail antigénique") pourrait être envisagée, et en particulier avec les enzymes anti-oxydantes dont nous

avons détaillé l'importance métabolique dans l'Introduction : Sm28GST, GSHpx, SOD.

Si l'immunisation par les GSTs natives du schistosome réduit la charge parasitaire et diminue la fécondité des vers femelles (Grezel et coll. 1992 et Bushara. H, en préparation), l'emploi des protéines recombinantes (Sm28GSTr plus Sm26GSTr, rapport 1/1), dans un protocole de double immunisation chez le rat, ne nous a pas permis de reproduire ces résultats et de démontrer le rôle synergique de ces deux composants dans la protection (non montré). Ces résultats semblent liés à la mauvaise qualité du statut immunitaire des animaux lors de ces expériences (contamination par le virus Sendai). D'autre part, il est possible que des problèmes inhérents à la qualité des molécules recombinantes existent (repliement différent par rapport à la molécule native). Ce problème, lié à l'expression des protéines recombinantes, n'est pas nouveau et de nombreux laboratoires y sont actuellement confrontés (perte de l'activité biologique, temps d'élimination extrêmement court, perte des épitopes). Un article récent de Krzych et coll. (1992) fait état de ce genre de problématique : des souris syngéniques sont, soit immunisées par des sporozoïtes irradiés de *P. berghei* exprimant majoritairement la protéine CSP à leur surface (Circumsporozoite Protein) ou soit par la CSP recombinante purifiée. La lymphoprolifération est ensuite analysée, dans les deux groupes d'animaux, vis-à-vis de peptides synthétiques dérivés de la séquence en aa de la CSP. Krzych et coll notent alors des variabilités importantes dans la reconnaissance peptidique des lymphocytes T prélevés chez ces souris suivant les groupes. Il semble donc que l'origine de la protéine injecté (forme native ou recombinante) influe sur la présentation de certains déterminants peptidiques par les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) et génèrent ainsi une spécificité cellulaire variable ou un répertoire épitopique T différent. Cette expérience est toutefois critiquable car si la CSP native constitue la fraction antigénique majeure, elle n'est toutefois pas sous une forme purifiée et il est possible que l'environnement antigénique participe aux effets observés par Krzych et coll. (1992). L'élucidation de ce problème primordial semble passer par une meilleure connaissance des caractéristiques biochimiques de la molécule native et de les appliquer à la molécule recombinante. La cristallisation puis l'obtention des données de diffraction aux rayons X de la molécule native (isolée et purifiée à partir du parasite) permettrait de comparer sa structure 3D à celle de la molécule recombinante. Après une première purification par chromatographie d'affinité, les deux formes 28 et 26 kDa seraient séparées par HPLC. L'obtention de la molécule native purifiée permettrait alors d'initier les étapes de cristallogénèse. Une telle manipulation nous semble réalisable à court terme et constituerait une source supplémentaire d'informations dont les

immunologistes, les cristallographes et les chimistes parviendront probablement à gérer et à exploiter les paramètres.

3-2 L'oeuf/miracidium

Au niveau de l'oeuf, Kazura et coll. (1985) ont noté une production importante de dérivés oxydants au sein du granulome par les éosinophiles, dont on connaît le rôle dans l'élimination du miracidium (Olds et coll. 1980). Il est probable que là encore, les GSTs soient sollicitées pour leurs actions détoxifiantes. La surexpression de la forme 26 kDa chez l'oeuf/miracidium peut être le reflet d'un réel besoin en enzymes détoxifiantes à ce stade particulier.

La réduction des granulomes observée après immunisation avec la Sm28GST (Boulangier et coll. 1991b), laisse penser que cette fonction s'exprime *in vivo* pour la Sm28GST.

3-3 Le ver adulte

La fonction protectrice des SmGSTs doit également s'exprimer chez le ver adulte, classiquement décrit comme un stade invulnérable face aux attaques immunes. Ce concept n'est toutefois pas infaillible (Damian et coll. 1984a) et on ne peut pas exclure totalement une action létale ou sublétale à leur niveau (migration perturbée, fécondité amoindrie).

En conclusion, les trois stades (1) schistosomule (diminution de la charge parasitaire), (2) ver adulte (diminution de la ponte) et (3) oeuf (effet anti-embryonnaire : diminution des granulomes et de la capacité d'éclosion des oeufs) peuvent donc être les cibles de la réponse anti-SmGSTs.

4- Mécanismes effecteurs de la réponse immune dirigée contre les SmGSTs

De façon schématique et hypothétique, la séquence probable des événements moléculaires résultant de l'immunisation par les GSTs de schistosome est illustrée Figure 25.

Les anticorps spécifiques anti-SmGSTs auraient une double fonction :

- Participation aux mécanismes de l'ADCC.

- Neutralisation des fonctions enzymatiques des SmGSTs.

L'amplification de ces deux phénomènes résulterait en une accumulation des dérivés cytotoxiques pour la larve.

De même, les anticorps anti-Sm28GST pourraient directement altérer le métabolisme du ver adulte (mâle ou femelle ?) et bloquer en partie l'émission des oeufs ultérieurement séquestrés dans les tissus ou excrétés dans le milieu extérieur.

Enfin, il a été démontré, dans le modèle de *S. japonicum*, que les anticorps pouvaient franchir la coquille de l'oeuf (Hirata et coll. 1986). Nous pouvons donc concevoir un effet direct des anticorps spécifiques (d'isotype IgA) dans la réduction du taux d'éclosion des oeufs et dans la modulation des granulomes.

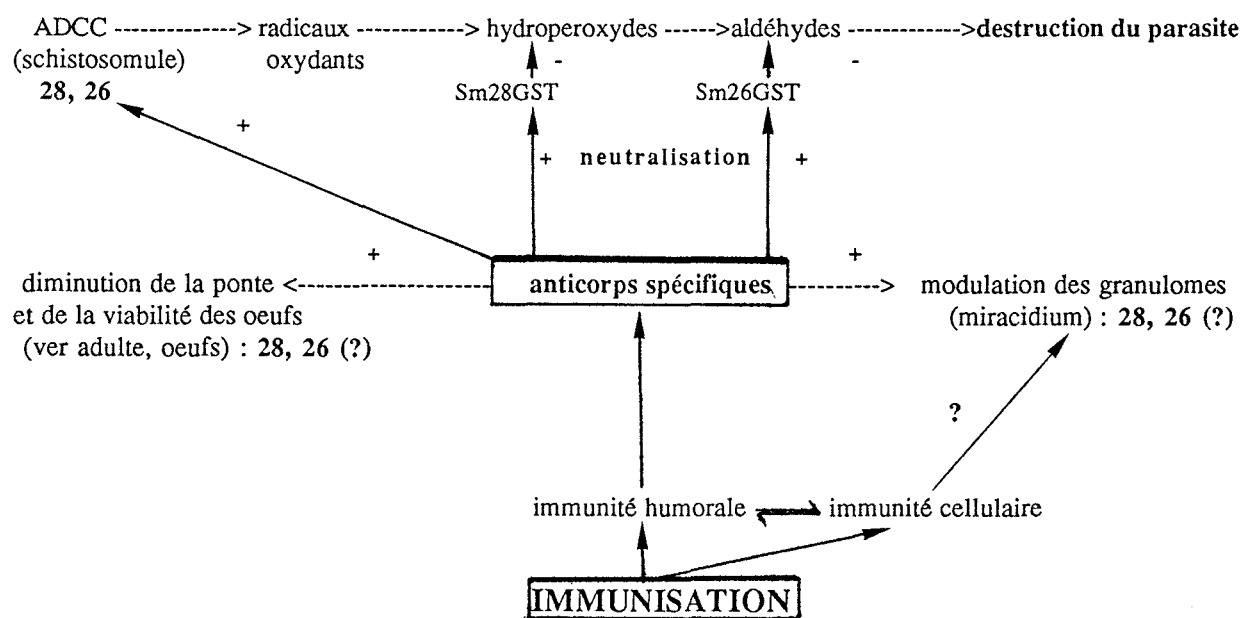


Figure 25 . Représentation schématique des mécanismes effecteurs de la réponse immune dirigée contre les SmGSTs.

5- Epitopes impliqués dans les phénomènes "d'anti-fécondité" et incidence des variations interspécifiques sur le développement d'un vaccin dirigé contre le schistosome

Les expériences de vaccination des bovins, présentées dans notre mémoire, laissent entrevoir avec optimisme, l'emploi des SbgSTs dans la confection d'un vaccin efficace contre la

schistosomiase bovine. L'expression de l'ADNc codant pour la Sb28GST, que nous avons cloné, va permettre d'immuniser des animaux avec la molécule recombinante. Outre l'importance économique que représente la schistosomiase bovine, l'intérêt du système bovin-*S. bovis* réside dans le fait que celui-ci représente un couple hôte/parasite naturel. De plus, ce système pose moins de problèmes d'ordre éthique que le modèle humain et accélérera donc la mise en place d'une campagne de vaccination sur le terrain. L'évaluation rapide de l'impact de ce programme sur la pathologie et la transmission de la maladie sera alors possible. De la même manière, des expériences de vaccination avec la Sh28GSTr sont d'ores et déjà planifiées chez le singe *patas* expérimentalement infecté par *S. haematobium*.

Sur le plan de la pathologie et de la réduction de la transmission du cycle de la bilharziose, **l'altération de la fertilité des vers adultes représente l'effet vaccinal le plus reproductible et probablement le plus prometteur.**

Au niveau moléculaire, il est intéressant de connaître les régions de la molécule impliquées dans les effets post-vaccinaux. L'utilisation de peptides synthétiques a permis de prédire le rôle fonctionnel des épitopes 115-131 (cible des mécanismes de protection, Wolowczuk et coll. 1991b) et 190-211 (impliqué dans la modulation de la pathologie, Wolowczuk et coll. 1992).

Nous avons vu que le transfert passif d'un anticorps monoclonal (le S13), inhibant l'activité enzymatique de la Sm28GST, pouvait réduire tant *in vivo* qu'*in vitro*, la capacité de ponte des schistosomes, cette inhibition étant complètement levée *in vitro* en présence du peptide 190-211 et partiellement en présence du peptide 10-43 (Xu et coll. 1990 et 1992). D'autre part, des sérums de bilharziens enrichis en IgA reproduisent ce double effet (Grezel et coll. 1992) soulignant ainsi l'importance de la composante humorale (et de l'isotype) et de l'épitope reconnu dans ce mécanisme. Dans ce contexte, il était important d'évaluer chez les espèces majeures de schistosome, le degré de conservation des épitopes impliqués dans les phénomènes "d'anti-fécondité".

D'un point de vue séquentiel, l'épitope 190-211 montre une hétérogénéité marquée chez *S. japonicum*, 6 mutations étant présentes dans cette zone. De plus, aucune réaction croisée avec la sonde 190-211 n'a pu être mise en évidence avec la Sj28GST native du parasite. Ce résultat amène une information essentielle : dans le cas de *S. japonicum*, l'emploi d'un peptide (ou de la

molécule recombinante) homologue semble nécessaire pour induire une immunité dirigée contre la fertilité du schistosome.

Par contre, les épitopes N- et C-terminaux de Sm28GST, Sh28GST et de Sb28GST étant conservés, il semble donc que le développement d'un vaccin polyspécifique soit possible chez les espèces majeures de schistosome Africains analysées, vaccin élaboré à partir d'une molécule recombinante ou d'une construction peptidique permettant le maintien de l'intégrité des déterminants B et T.

Si, par modélisation, il sera possible de comparer les topographies et conformations spatiales des 4 GSTs de 28 kDa de schistosome, l'évaluation précise de l'incidence des mutations inter-spécifiques requiert une étude immunologique adaptée : nous pouvons concevoir l'immunisation d'animaux avec le peptide 190-211 correspondant à la séquence de la Sj28GST et évaluer, de façon comparative, son effet sur la ponte chez des animaux infestés par des cercaires de *S. mansoni* ou par des cercaires de *S. japonicum*.

Le lien existant entre (1) les régions N- et C-terminales, (2) l'activité enzymatique de la Sm28GST et (3) les effets sur l'altération de la fertilité des vers femelles, observés *in vitro* et *in vivo*, nécessite des bases moléculaires plus fondées.

Si la juxtaposition des régions N- et C-terminales peut créer un site important dans la catalyse des GSTs (Tamai et coll. 1990), la démonstration du rôle joué par les deux extrémités caténares de la Sm28GST sur l'activité enzymatique n'est pas encore totalement établie. Etant donné la haute conservation de la région 171-189 au sein des 4 séquences des 28GSTs de schistosome et considérant son caractère hydrophobe, il est possible que cette zone intervienne dans le site actif de l'enzyme (site de fixation de l'agent électrophile hydrophobe) ou dans le maintien de la structure 3D de la molécule. **La résolution de la structure 3D de la Sm28GST revêt alors un caractère essentiel** dans la compréhension des mécanismes enzymatiques et particulièrement du rôle exact des régions N-et C-terminales. De même, la résolution de la structure 3D de la Sm28GST devrait :

- permettre une optimisation des protocoles d'immunisation destinés à une **expression maximale et ciblée du potentiel vaccinal de la molécule.**
- permettre **l'évaluation des incidences des mutations interspécifiques** sur le

développement d'un vaccin dirigé contre les différents agents étiologiques des schistosomiasis humaines et animales.

En conclusion, nos travaux et leurs retombées ainsi que les résultats récemment obtenus dans notre laboratoire, laissent présager avec optimisme le développement d'un programme de vaccination contre la bilharziose humaine et animale à base de glutathion-S-transférases.

MATERIELS ET METHODES

1- Purification des glutathion-S-transférases de schistosome sous forme native et recombinante

1-1 Préparation du SWAP (Soluble Worm Antigen Preparation)

Après perfusion portale des hamsters (*Mesocricetus auratus*), 40 jours après l'infection d'épreuve, les vers adultes (environ 5000 vers/récolte, souche Porto-Ricaine) sont lavés dans du sérum physiologique (9 p 1000 NaCl/H₂O, p/v) et les tissus exogènes sont soigneusement éliminés. La préparation parasitaire est broyée sur glace 4 x 10 secondes dans 50 ml de tampon équilibration n° 1 froid (EQ-1) à l'aide d'un disperseur (Ultra-Turrax, Janke et Kunkel) puis soniquée sur glace 4 x 10 secondes (Vasse, Labsonic U, régime de 100). L'homogénat est ensuite centrifugé à 5,000 g pendant 20 minutes à 4⁰ C et le surnageant, dilué dans 200 ml de tampon EQ-1, est mis en contact avec le glutathion-agarose (GSH-agarose, Sigma Chemical Co, St Louis, MO).

1-2 Préparation du lysat d' *E. coli* exprimant la Sm26GSTr ou la Sm28GSTr

Dans les deux cas, la copie complète du gène codant pour la Sm26GST ou la Sm28GST est sous-clonée dans le plasmide pTG959 (Courtney et coll. 1984). Les plasmides ainsi construits ont été dénommés respectivement : pTg4170 et pTG54. Après transformation de la souche bactérienne TGE901, la culture se déroule en milieu liquide dans du LB-ampicilline à 30⁰ C jusqu'à ce que la D.O à 550 nm atteigne une valeur de 0.3. On induit alors la synthèse protéique par choc thermique à 42⁰ C pendant 6 heures. Après centrifugation de la culture à 5,000 g pendant 20 minutes, le culot bactérien est lysé sous agitation pendant une heure à 4⁰C dans 50 ml de tampon EQ-2 pour la culture pTG54 et de tampon EQ-2 plus 0.2% (v/v) de triton-X100 pour la culture pTG4170. Après centrifugation à 5,000g à 4⁰ C, le surnageant est repris dans 200 ml de tampon EQ-1 (pour une culture initiale de 2 litres).

1-3 Purification des GSTs par chromatographie d'affinité

La méthode de Simons et coll. (1981) a été légèrement modifiée. Le contact enzyme-ligand se

fait en batch ou en flux continu sur colonne toute la nuit à 4⁰ C. Généralement, pour les quantités précédemment indiquées, on ajoute 10 ml de gel de GSH-agarose préalablement gonflé dans EQ-1. Le lendemain, on lave les colonnes avec le tampon EQ-1 pendant 8 heures (débit : 50 à 100ml/heure) et la fraction fixée sur la matrice est ensuite éluée avec du glutathion réduit à PH basique (10 ml/colonne). Après neutralisation avec du tampon phosphate concentré (1/10^{ème} du volume), l'éluat est dialysé toute la nuit à 4⁰ C. On concentre ensuite 10 fois avec de l'Aquacide (MW 500,000) ou par ultrafiltration (Amicon). La concentration protéique est déterminée par le dosage des liaisons peptidiques à 205 nm avec la BSA comme standart. La pureté et l'activité enzymatique de l'échantillon sont systématiquement analysées.

Tampon équilibration 1 (EQ-1)

10mM phosphate de potassium, pH 7
1,15% (p/v) KCl
0.5 mM Phényl Méthyl Sulphonyl Fluoride (PMSF)
1 mM EDTA

EQ-2

10mM phosphate de potassium, pH 7
1,15% (p/v) KCl
0.5 mM PMSF
1 mM EDTA
2µg/ml DNase-RNase
100 µg/ml de lysozyme
10 mM MgCl₂

Tampon élution

50 mM Tris-HCl, pH 9.1
7 mM glutathion (GSH)
0.1 mM Dithiothréitol (DTT)

Tampon de dialyse

10 mM Phosphate de potassium, pH 7
1 mM EDTA

Tampon neutralisation

0.5M Phosphate de potassium, pH 7

2- Dosage de l'activité enzymatique des GSTs vis-à-vis du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB)

2-1 Méthode expérimentale

Milieu réactionnel / cuve

0.8 ml de tampon de réaction
15 µl de GSH à 0.26 M
5 µl de CDNB à 59 mM

On initie le test enzymatique par addition de 10 µl d'enzyme à une concentration de 20 µg/ml (0.2 µg/essai) à to. On enregistre les variations de D.O à 340 nm toutes les 15 secondes par spectrophotométrie (DU-64, Beckman).

Tampon de réaction
50 mM de phosphate de potassium, pH 6.5

Solution de GSH (0.26 M)
400 mg de GSH / 3.9 ml de tampon de réaction
/ 1.1 ml NaOH N

Solution de CDNB (59 mM)
60 mg de CDND / 5 ml d'éthanol absolu

Remarque : les concentrations finales du GSH et du CDNB sont respectivement de 4.7 mM et 0.36 mM (approximativement $K_m / 2$)

1-2-2 Calcul de l'activité spécifique

A la vitesse initiale : activité spécifique =
$$\frac{\Delta \text{D.O./minute}}{\Sigma} \times \frac{1}{\text{qté d'enzyme (en } \mu\text{g)}}$$

$$\Sigma = 9.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ pour le CDNB}$$

L'activité spécifique s'exprime en μmol de produit transformé / minute / mg de protéine

2-3 Inhibition de l'activité enzymatique

L'enzyme et l'inhibiteur chimique sont préincubés 30 minutes à température ambiante dans un volume final de 10 μl de PBS. Le rapport entre l'activité spécifique résiduelle et l'activité spécifique initiale donne le pourcentage d'inhibition (pour une concentration connue en agent chimique inhibiteur).

3- Préparation de la Sm28GSTSWAP et de la Sm26GSTR électroéluées

Après fractionnement des antigènes totaux du ver adulte sur gel de polyacrylamide à 13%, la bande à 28 kDa est découpée et électroéluée comme décrit par le constructeur (Biorad, U.K). Après dialyse contre du PBS toute la nuit à température ambiante, la solution protéique est concentrée à 1mg/ml par la technique de l'Aquacide.

La même technique est employée pour la préparation de la Sm26GSTR électroéluée. La Sm26GSTR purifiée à partir du lysat bactérien sur colonne de GSH-agarose est ensuite fractionnée sur SDS-PAGE puis électroéluée comme décrit plus haut.

4- ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

150 µl de solution antigénique à 2 µg/ml diluée dans du tampon carbonate de sodium, pH 9.6 sont déposés toute la nuit à 4°C sur les plaques de microtitration (Dynatech, Denkendorf, RFA). Après trois lavages avec du PBS-tween 0.05%, les sérums sont dilués puis incubés pendant 4 heures à température ambiante. Après de nouveaux lavages, la révélation se fait avec un anticorps anti-IgG de rat marqué à la peroxydase (Pasteur Diagnostiques, France) ou un anticorps monoclonal de souris dirigé contre un isotype particulier de rat (BioSys, U.K). Dans ce cas, la révélation avec un anticorps anti-souris marqué à la peroxydase est nécessaire. Tous les réactifs immunologiques sont dilués au 5000^{ème}. L'orthophénylènediamine (Sigma) est utilisé comme substrat et les D.O sont enregistrées à 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek Multiskan MCC 1340).

Tampon carbonate de sodium

15 mM Na₂CO₃

35 mM NaHCO₃, pH 9.6

PBS (Phosphate Buffered Saline)

10 mM phosphate de potassium, pH 7.4

0.15 M NaCl

5- Cytotoxicité dépendante d'anticorps en présence de macrophages

5-1 Purification des macrophages

Les macrophages péritonéaux provenant de rats sains sont purifiés par élimination des cellules non-adhérentes après 2 heures de culture dans du Minimum Eagle's Medium (MEM, Flow Laboratories) contenant 10% de sérum de rat sain (SRS) à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂. La fraction cellulaire qui contient plus de 95 % de macrophages est ensuite cultivée toute la nuit dans du MEM en présence de 10 % (v/v) de sérum de rat sain décomplémenté par chauffage.

5-2 Purification des schistosomules

Les schistosomules sont purifiés par passage transcutané suivant la méthode de Clegg et coll.

(1972).

5-3 Test de cytotoxicité

Les cellules effectrices sont incubées dans du MEM contenant 5% (vol/vol) du sérum à étudier plus 10% de SRS ou de l'anticorps monoclonal (préparé suivant la méthode de Verwaerde et coll. (1987) dilué et additionné de 15% de SRS. Le volume final par puits est de 150µl. Après préincubation pendant 6 heures, 50 à 100 larves (dans 50µl) sont ajoutées dans les puits de culture pendant 18 heures à 37⁰ C. Les schistosomules morts (granuleux, opaques, immobiles et entourés de cellules) sont comptés sous microscope inversé et le pourcentage de cytotoxicité est donné par le rapport schistosomules morts/schistosomules totaux. Une analyse statistique révèle qu'une cytotoxicité supérieure à 25% est significative (Capron et coll. 1975). La valeur corrigée du taux de cytotoxicité du sérum à étudier est obtenue par soustraction de la valeur du taux de cytotoxicité de ce sérum par celle du sérum témoin (SRS).

5-4 Test d'inhibition

Le contact entre l'enzyme et le sérum (ou l'anticorps monoclonal) est réalisé pendant 2 heures à température ambiante dans du PBS. Le pourcentage d'inhibition est calculé en valeur corrigée suivant la formule : $1 - (\text{taux de cytotoxicité du sérum en présence d'antigène} / \text{taux de cytotoxicité du sérum en absence d'antigène}) \times 100$.

6- Cristallogenèse : technique de la goutte suspendue

Les méthodes biochimiques de purification et d'analyse de la Sm28GStr sont mentionnées dans l'article 3. Brièvement, la goutte est suspendue sur une lamelle siliconée et contient 5 µl de la solution protéique (à 60 mg / ml) et 5 µl de la solution du réservoir. La lamelle est retournée puis disposée au dessus du réservoir dont les bords ont été préalablement graissés afin d'assurer l'étanchéité du système. La concentration en agent précipitant dans le réservoir est plus forte et il va se produire "un pompage d'eau", le volume de la goutte va diminuer et les concentrations en protéine et en agent précipitant vont augmenter progressivement par diffusion en phase gazeuse.

Suivant les conditions, les cristaux de Sm28GStr apparaissent entre deux semaines et plusieurs mois.

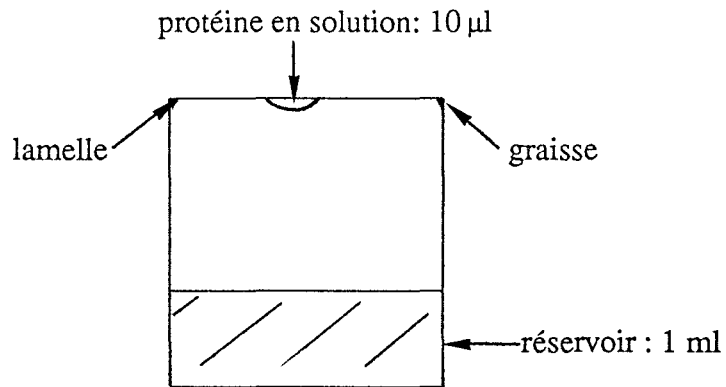


Figure 26 . Représentation schématique du dispositif de la goutte pendante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, T., Forbes, J. T and Colley, D. G. (1983) Natural killer cell activity during murine schistosomiasis *mansoni*. J. Parasitol. 69, 1001-1005.
- Abel, L., Demenais, F., Prata, A., Souza, A. E and Dessein. A. (1991) Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. Am. J. Hum. Genet. 48, 959-970.
- Adang, A. E. P., Brussee, J., Van Der Gen, A and Mulder, G. J. (1990) The glutathione-binding site in glutathione S-transferases : investigation of the cysteinyl, glycyl and glutamyl domains. Biochem. J. 269, 47-54.
- Agnew, M. A., Murare, H. M. and Doenhoff, M. J. (1989) Specific cross-protection between *Schistosoma bovis* and *Schistosoma haematobium* induced by highly irradiated infections in mice. Parasite Immunol. 11, 341-349.
- Ahmad, H., Wilson, D. E., Fritz, R. R., Singh, S. V., Medh, R. D., Nagle, G. T., Awathi, Y. C. and Kurosky, A. (1990) Primary and secondary structural analyses of glutathione S-transferase π from human placenta. Arch. Biochem. Biophys. 278, 398-408.
- Alin, P., Danielson, U. H and Mannervick, B. (1985) 4-hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. FEBS Lett. 179, 267-269.
- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D and McKerrow, J. H. (1992) Tumour necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. Nature 356, 604-605.
- Andresen, K., Tom, T. D and Strand, M. (1991) Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem. 266, 15085-15090.
- Arca, P., Garcia, P., Hardisson, C and Suarez, J. E. (1990) Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. FEBS Lett. 263, 77-79.
- Auriault, C., Joseph, M., Dessaint, J. P and Capron, A. (1980) Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by schistosomula larvae protease. Immun. Lett. 2, 135-139.
- Auriault, C., Capron, M., Cesari, I. M and Capron, A. (1983) Enhancement of eosinophil effector function by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* : role of proteases. J. Immunol. 131, 464-470.
- Auriault, C., Damonville, M., Verwaerde, C., Pierce, R.J., Joseph, M., Capron, M. and Capron, A. (1984) Rat IgE directed against schistosoma released products is cytotoxic for *Schistosoma mansoni*. Eur. J. Immunol. 14, 132-137.
- Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A., Bout, D., Tonnel, A. B and Capron, A. (1985) Regulatory role of a tripeptide (TKP) from the second constant domain of immunoglobulin G. Int. J. Immunopharmacol. 7, 73-79.
- Auriault, I., Balloul, J. M., Pierce, R. J., Damonville, M., Sondermeyer, P. and Capron, A. (1987) Helper T cells induced by a purified 28 kDa antigen of *Schistosoma mansoni* protect rats against infection. Infect. Immun. 55, 1163-1169.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R.J., Balloul, J. M., Neyrinck, J. L., Drobecq, H., Tartar, A. and Capron, A. (1988) Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. J. Immunol. 141, 1687-1694.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Pierce, R. J., Butterworth, A. E., Wolowczuk, I., Capron, M., Ouma, J. M., Balloul, J. M., Khalife, J., Neyrinck, J. M., Tartar, A., Koech, D and Capron A. (1990a) Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected

human subjects to the recombinant P28 glutathione S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1918-1924.

Auriault, C., Wolowczuk, I., Dammonneville, M., Velge-Roussel, F., Pancré, V., Gras-Masse, H., Tartar A and Capron A. (1990b) T-cell antigens and epitopes in schistosomiasis. In : *Current Topics in Microbiology and Immunology*. (Springer-Verlag Berlin, ed). Vol 155. pp 3-20.

Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A and Tartar, A. (1991) Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni*. *Peptide. Res.* 4, 1-11.

Awasthi, Y. C., Bhatnagar, A and Singh, S. V. (1987) Evidence for the involvement of Histidine at the active site of glutathione S-transferase ψ from human liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 965-970.

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. Parasitol.* 17, 105-114.

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

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

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

Barrett, J. (1989) Purification of cytosolic glutathione transferases from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid) : interaction with anthelmintics and the products of lipid peroxidation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 187-196.

Barrett, J. (1991) Toxicity of aldehyde products of lipid peroxidation to adult schistosomes. BSP Spring Meeting 1991, University of Liverpool. Abstract n° P17, p25.

Barsoum, I. S., Freeman, G. L., Habib, M., El Alamy, M. A., Rocha, R. S., Katz, N., Gazzinelli, G and Colley, D. G. (1984) Evaluation of natural killer activity in human schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 451-457.

Basch, P. F and Basch, N. (1984) Intergeneric reproductive stimulation and parthenogenesis in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 89, 369-376.

Basch, P. F. (1990) Why do schistosomes have separate sexes ? *Parasitology today* 6, 160-163.

Below, S., Kampee, L and Mueller, A. (1987) Reaction of *Rhabditis oxycerca* after long-term exposure to aldicarb and oxamyl. II. Enzyme changes in nematicide resistance. *Nematologica* 33, 298-309.

Bergquist, R. (1990) Prospects of vaccination against schistosomiasis. *Scan. J. Infect. Dis.* 76, 60-71.

Bhargava, M. M., Listowsky, I and Arias, I. M. (1978) Ligandin : bilirubin binding and glutathione S-transferase activity are independent processes. *J. Biol. Chem.* 253, 4112-4115.

Bhargava, K. K., Le Trang, N., Cerami, A and Eaton, J. W. (1983) Effect of arsenical drugs on glutathione metabolism of *Litomosoides carinii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6,

Bickle, Q. D., Taylor, M. G., Doenhoff, M. J and Nelson, G. S. (1979) Immunization of mice with gamma-irradiated intra-muscularly-injected schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 79, 209-222.

Bobek, L. A., Rekosh, D. M and LoVerde, P. T. (1988) Analysis of a small gene family encoding an eggshell (chorion) protein of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3008-3016.

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

Bobek, L. A., Rekosh, D. M and LoVerde, P. T. (1991) *Schistosoma japonicum* : analysis of eggshell protein genes, their expression and comparison with similar genes from other schistosomes. *Exp. Parasitol.* 72, 381-390.

Boros, D. L and Warren, K. (1970) Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.* 132, 488-507.

Boros, D. L., Amsden, A. F and Hood, A. T. (1982) Modulation of granulomatous hypersensitivity. IV. Immunoglobulin and antibody production by vigorous and immunomodulated liver granulomas of *Schistosoma mansoni* infected mice. *J. Immunol.* 128, 1050-1053.

Boros, D. L. (1989) Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 250-269.

Boulanger, D., Reid, G. D., Sturrock, I., Wolowczuk, I., Balloul, J. M., Grezel, D., Pierce, R. J., Otieno, M. F., Guerret, S., Grimaud, J. A., Butterworth, A. E. and Capron, A. (1991a) Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 13, 473-490.

Boulanger, D. (1991b) Schistosomiasis humaines Africaines : évaluation chez l'animal du pouvoir vaccinal d'une glutathion-S-transférase exprimée par le schistosome. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lille, mai 1991.

Bout, D., Dupas, H., Carlier, Y., Afchain, D and Capron, A. (1977) High resistance induced by young live bacillus Calmette Guerin (BCG) to *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Annals. Immunol.* 128, 811-816.

Bout, D., Joseph, M., David, J. R and Capron, A. (1981) *In vitro* killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages. *J. Immunol.* 127, 1-10.

Bout, D., Joseph, M., Pontet, M., Vorng, H., Deslee, D and Capron, A. (1986) Rat resistance to schistosomiasis : platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science* 231, 153-157.

Boyland, E. and Chasseaud, L. F. (1969) The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.* 32, 173-219.

Brindley, P. J and Sher, A. (1987) The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* 139, 215-220.

Brogdon, W. G and Barber, A. M. (1990) Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates. *Comp. Biochem. Physiol.* 96, 339-342.

Brophy, P. M. (1988) The role of glutathione S-transferases in Cestodes. Ph. D. Thesis, University College of Wales, Aberystwyth.

- Brophy, P. M., Papadopoulos, A., Touraki, M., Coles, B., Korting, W and Barrett, J.** (1989) Purification of cytosolic glutathione transferases from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid) : interaction with anthelmintics and the products of lipid peroxidation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 187-196.
- Brophy, P.M and Barrett, J** (1990a) Glutathione S-transferase in helminths. *Parasitology* 100, 345-349.
- Brophy, P. M and Barrett, J.** (1990b) Blocking factors and the purification of glutathione transferase from *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 100, 137-142.
- Brophy, P. M and Barrett, J.** (1990c) Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in Helminths. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 205-212.
- Bryant, S. H and Sternberg, M. J. E.** (1987) Comparison of protein structural profiles by interactive computer graphics. *J. Mol. Graphics.* 5, 4-7.
- Burk, R. F., Nishiki, K., Lawrence, R. A and Chance, B.** (1978) Peroxide removal by selenium-dependant and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 253, 43-46.
- Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Houba, V and Rees, P. M.** (1975) Eosinophils as mediators of antibody dependent damage to schistosomula. *Nature* 256, 727.
- Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Houba, V and Taylor, R.** (1976) *Schistosoma mansoni* in baboons : antibody-dependent cell-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula. *Clin. Exp. Immunol.* 25, 95-104.
- Butterworth, A. E., Remold, H. G., Houba, V., David, J. R and Franks, D.** (1977) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni* : mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 18, 2230-2236.
- Butterworth, A. E., Vadas, M. A., Martz, E and Sher, A.** (1979a) Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni*, but fail to induce damage. *J. Immunol.* 122, 1314-1323.
- Butterworth, A. E., Vadas, M. A., Martz, E and Sher, A.** (1979b) Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni*, but fail to induce damage. *J. Immunol.* 122, 1314-1321.
- Butterworth, A. E., Taylor, D. W and Veith, M. C.** (1982) Studies on mechanisms of immunity in human schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 61, 5-39.
- Butterworth, A. E., Capron, M., Cordingley, J. S., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Kariuki, H. C., Kimani, G., Koech, D., Mugambi, Ouma, J. H., Prentice, M.A., Richardson, B. A., Arap Siogok, T. K., Sturrock, R. F and Taylor, D. W.** (1985) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals and analysis of their immune responses. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 393-408.
- Butterworth, A. E., Remold, H. G., Houba, V., David, J. R and Franks, D.** (1988a) Immunity in human schistosomiasis mansoni : cross reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. *Biochemistry* 70, 1053-1063.
- Butterworth, A.E.** (1988b) Control of schistosomiasis in man. In : *The Biology of Parasitism.* (Englund, P.T., Sher, A., eds.), Vol.9, pp. 43-59, Alan R. Liss, Inc., New York.
- Butterworth, A. E.** (1992) Vaccines against schistosomiasis : where do we stand ? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 1-2.
- Callahan, H. L., Crough, R. K and James, E. R.** (1988) Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. *Parasitology today.* 4, 218-225.

- Capron, A., Biguet, J., Rose, F and Vernes, A. (1965) Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. II. Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de *S. mansoni*. Ann. Inst. Past. 109, 798-810.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Bazin, H. (1975) Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. Nature 253, 274-275.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Joseph, M and Pestel, J. (1980) Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29, 849-857.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Ouma, J. H and Butterworth, A. E. (1987a) Immunity to schistosomes : Progress toward vaccine. Science 238, 1065-1072.
- Capron, A., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Grzych, J. M., Dissous, C., Sondermeyer, P and Lecocq, J. P. (1987b) Protective antigens in experimental schistosomiasis. Acta Tropica. 44, 63-69.
- Capron, A., Balloul, J.M., Grezel, D., Grzych, J. M., Wolowczuk, I., Auriault, C., Boulanger, D., Capron, M and Pierce, R.J. (1990) Progress toward vaccine against schistosomiasis. Molecular aspects of immune response and infection diseases. (ed. Kiyono, H., Jirillo, E and DeSimone, C. Raven Press, Ltd, New York, pp 183-191.
- Capron, M., Camus, D., Carlier, Y., Figueiredo, J. F. M., Prata, A and Capron, A. (1977) Immunological studies in human schistosomiasis. II. Cytotoxic antibodies for *Schistosoma mansoni* schistosomules. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26, 248-253.
- Capron, M., Bazin, H., Joseph, M and Capron, A. (1981a) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rats eosinophils. J. Immunol. 126, 1764-1768.
- Capron, M., Capron, A., Dessaint, J. P., Torpier, G., Johansson, S. G. O and Prin, L. (1981b) Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. J. Immunol. 126, 2087-2098.
- Capron, M., Capron, A., Goetzl, E. J and Austen, K. F. (1981c) Tetrapeptides of the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) enhance eosinophil Fc receptor. Nature 289, 71-74.
- Capron, M., Capron, A., Abdel-Hafez, S. K., Bazin, H., Joseph, M and Phillips, S. M. (1983) Immunological response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. J. Immunol. 131, 1475-1483.
- Capron, M., Spiegelberg, H. L., Prin, L., Bennich, H; Butterworth, A. E., Pierce, R. J., Ouaisi, M. A and Capron, A. (1984a) Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. J. immunol. 232, 462-468.
- Capron, M., Nogueira-Queiroz, J. A., Papin, J. P and Capron, A. (1984b) Interaction between eosinophils and antibodies : *in vivo* protective role against rat schistosomiasis. Cell. Immunol. 3, 60-72.
- Capron, M., Capron, A., Khalife, J., Butterworth, A. E and Grzych, J. M. (1987) Blocking antibodies and vaccine strategy in schistosomiasis. Acta. Trop. 44, 55-62.
- Capron, M., Benveniste, J., Braquet, P and Capron, A. (1988) Role of PAF-Acether in IgE-dependent activation of eosinophils. New. Tr. Lip. Med. Res. 2, 10-20.
- Carlier, Y., Nzeyimana, H., Bout, D and Capron, A. (1980) Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni*-infected african parturients and their new-born children. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29,74-81.

- Cao, M., Akridge, R., Weston, D., Kemp, W. M and Doughty, B. L. (1992) *Schistosoma mansoni* : cloning and sequencing of a gene for adenylate kinase. *Exp. Parasitol.* 74, 357-359.
- Chappell, C. L and Dresden, M. H. (1986) *Schistosoma mansoni* : proteinase activity of hemoglobinase from the digestive tract of adult worms. *Exp. Parasitol.* 61, 160-167.
- Cheever, A. W., Dewitt, W. B and Warren, K. S. (1965) Repeated infection and treatment of mice with *Schistosoma mansoni* : functional, anatomic and immunologic observations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17, 38-49.
- Chen, M. G and Mott, K. E. (1988) Progress in assessment of morbidity due to *Schistosoma mansoni* infection. *Trop. Dis. Bull.* 85, 1-56.
- Chen, L., Rekosh, D. M and LoVerde, P. T. (1992) *Schistosoma mansoni* p48 eggshell protein gene : characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52, 39-52.
- Cherfas, J. (1991) New hope for vaccine against schistosomiasis. *Science* 251, 630-631.
- Christensen, N. O. (1977) A method for the *in vivo* labelling of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma intercalatum* cercariae with radioselenium. *Zeit. Parazit.* 54, 275-288.
- Cioli, D and Dennert, G. (1976) The course of *Schistosoma mansoni* infection in thymectomized rats. *J. Immunol.* 117, 59-65.
- Cioli, D., Blum, K and Ruppel, A. (1978) *Schistosoma mansoni* : relationship between parasite age and time of spontaneous elimination from the rat. *Exp. Parasitol.* 45, 74-80.
- Clark, I. A., Cowden, W. D and Hunt, N .H. (1985) Free radical-induced pathology. *Med. Res. Rev.* 5 , 297-332.
- Clark, A. G. (1989) The comparative enzymology of the glutathione -S trnsferases from non-vertebrate organisms. In : *Comprehensive Biochemistry and Physiology* (Ed by Kerkut, G.S) Vol. 92, pp 419-446. Pergamon, Oxford.
- 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, 79-88.
- Cohen, E., Gamliel, A and Katan, J. (1986) Glutathione and glutathione transferase in Fungi : effect of pentachloronitrobenzene and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; purification and characterization of the transferase from *Fusarium*. *Pest. Biochem. Physiol.* 26, 1-9.
- Colley, D. G., Cook, J. A., Freeman, G. L., Bartholomeuw, R. K and Jordan, P. (1977) Immune responses during human schistosomiasis. I. *In vitro* lymphocyte blastogenic responses to heterologous antigenic preparations from schistosome eggs, worms and cercariae. *Int. Arch. Allerg. Ap. Immunol.* 53, 420-433.
- Colley, D. G and James , S. L. (1979a) Participation of eosinophils in immunological systems. In : *Cellular and Clinical Aspects of Allergic Disorders.* (Gupta, S and Good, R. A, eds). pp 55-86. Plenum Press, New York.
- Colley, D. G., Todd, C. W., Lewis, F. A and Goodgame, R. W. (1979b) Immune responses during human schistosomiasis. VI. *In vitro* nonspecific suppression of phytohemagglutinin responsiveness induced by exposure to certain schistosomal preparations. *J. Immunol.* 122, 1447-1452.
- Cookson, E., Blaxter, M. L. and Selkirk, M. E. (1992) Identification of the soluble cuticular protein of lymphatic filarial nematode parasites (gp29) as a secretory homolog of glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sc* (sous presse).
- Coon, M. J and Vaz, A. D. N. (1988) Role of cytochrome P-450 in hydrocarbon formation from xenobiotic and lipid hydroperoxide. *Prog. Clin. Biol. Res.* 274, 497-507.

- Cordeiro da Silva, A., LePresle, T., Capron, A and Pierce, R. J** (1992) Molecular cloning of a 16 kDa Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 52, 275-278.
- Cordingley, J. S.** (1989) The 86 kDa from *Schistosoma mansoni* is a heat-shock protein homologous to the yeast HSP-90. Mol. Biochem. Parasitol. 36, 19-28.
- Courtney, M., Buchwalder, A., Tessier, L. H., Jaye, M., Benavente, A., Balland, A., Kohli, V., Lathe, R., Tolstoshev, P and Lecocq, J. P.** (1984) High level production of biologically active human gamma-antitrypsin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 669-673.
- Cowan, K. H., Batist, G., Tulpule, A., Sinha, B. K and Myers, C. E.** (1986) Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 9328-9832.
- Cowan, S.W., Bergfors, T., Tibbelin, G., Olin, B., Board, P.G and Jones, T.A.** (1989) J. Mol. Biol. 208, 369-370. **Crabtree, J. E and Wilson, R. A.** (1986) The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*. Parasit. Immunol. 8, 265-285.
- Craig, S. P., McKerrow, J. H., Newport, G. R and Wang.** (1988) Analysis of cDNA encoding the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRase) of *Schistosoma mansoni* : a putative target for chemotherapy. Nucl. Ac. Res. 16, 7087-7101.
- Crowley, P., Moreman, A. D and Barrett, J.** (1991) Biochemical properties of a cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*. BSP Spring Meeting 1991, University of Liverpool. Abstract n° P21, p26.
- Dalton, J. P., Tom, T. D and Strand, M.** (1987) Cloning of a cDNA encoding a surface antigen of *Schistosoma mansoni*; a putative schistosomula recognized by sera of vaccinated mice. Proc. Natl. Ac. Sci. U.S.A. 84, 4268-4272.
- Damian, R. T.** (1984) Immunity to schistosomiasis. A holistic view. In : Contemporary Topics in Immunobiology. (Marchalonis., J. J., eds), pp 359-420. Plenum Press, New York.
- Damian, R. T.** (1987) The exploitation of host immune responses by parasites. J. Parasitol. 73, 3-13.
- Damonneville, M., Auriault, C., Verwaerde, C., Delanoye, A., Pierce, R. J. and Capron, A.** (1986a) 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., Auriault, C., Thorel, T., Verwaerde, C., Pierce, R. J., Strecker, G and Capron, A.** (1986b) Induction of protective immune IgE response in rats by injection of defined antigens of schistosomulum-released products : immunochemical properties of the target antigens. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 79, 320-328.
- Damonneville, M., Velge, F., Verwaerde, C., Pestel, J., Auriault, C. and Capron, A.** (1987) Generation and functional analysis of T cell lines and clones specific for schistosomula-released products (SRP-A). Clin. Exp. Immunol. 69, 299-306.
- Damonneville, M., Pancré., Capron, A and Auriault, C.** (1991) Protection of rats against *Schistosoma mansoni* infection induced by platelets stimulated with the murine recombinant tumor necrosis factor alpha. Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol. 92, 361-363.
- Danielson, U. H and Mannervik. B.** (1985) Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione S-transferase from the rat. Biochem. J. 231, 263-267.
- Danielson, U. H., Esterbauer, H and Mannervik, B.** (1987) Structure-activity relationship of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione

transferases. *Biochem. J.* 247, 707-713

Davern, K. M., Tiu, W. U., Morahan, G., Wright, M. D., Garcia, E. G and Mitchell, G. F. (1987) Responses in mice to Sj26, a glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum* worms. *Immunol. Cell. Biol.* 65, 473-482.

Davern, K. M., Tiu, W. U., Samaras, N., Gearing, D. P., Hall, B. E., Garcia, A. G and Mitchell, G. M. (1990) *Schistosoma japonicum* : Monoclonal antibodies to Mr 26,000 schistosome glutathione S-transferase (Sj26) in an assay for circulating antigen in infected individuals. *Exp. Parasitol.* 70, 293-304.

Davern, K. M., Wright, M. D., Herrmann, V. R and Mitchell, G. F. (1991) Further characterization of the *Schistosoma japonicum* protein Sj23, a target antigen of an immunodiagnostic monoclonal antibody. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48, 67-76.

Davis, A. H., Nanduri, J., Watson, D. C. (1987) Cloning and gene expression of *Schistosoma mansoni* protease. *J. Biol. Chem.* 262, 12851-12855.

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., Torpier, G., Capron, M., Bazin, H and Capron, A. (1979) Cytophilic binding of IgE to the macrophage. I. Binding characteristics of IgE on the surface of macrophages in the rat. *Cell. Immunol.* 46, 12-19.

Dessein, A., Rihet, P., Demeure, C., Cuissinier, P., Bacellar, O., Carvalho, E. M., Kohlstaedt, S., Dessein, H., Souza, A., Prata, A., Goudot, V., Bourgois, A and Abel, L. (1992) Facteurs génétiques et immunologiques déterminant la résistance à la bilharziose en région d'endémie. *Méd. Sci.* 8, 108-118.

Ding, G. J. F., LU, A. Y. H. and Pickett, C. B. (1985) Rat liver glutathione S-transferases. Nucleotide sequence analysis of Yb1 cDNA clone and prediction of the complete amino acid sequence of the Yb1 subunit. *J. Biol. Chem.* 260, 13268-13271.

Dirr, H.W., Mann, K., Huber, R. & Ladenstein, R. (1991) Class π Glutathione S-Transferase from pig lung. Purification, biochemical characterization, primary structure and crystallization. *Eur. J. Biochem.* 196, 693-698.

Dissous, C., Gryzch, J. M and Capron, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature* 323, 443-445.

Docampo, R and Moreno, S. N. J. (1984) Free radical intermediates in the antiparasitic action of drugs and phagocytic cells. In : Free radicals in biology. (Pryor, W. A., edd). Vol 4, pp 243-288. Academic Press, Toronto.

Docampo, R and Moreno, S. N. J. (1986) Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed. Proc.* 45, 2471-2476.

Dockrell, H. M and Playfair, J. H. (1983) Killing of blood-stage murine malaria by hydrogen peroxide. *Infect. Immun.* 39, 456-459.

Doenhoff, M. J., Musallam Bain, J and McGregor, A. (1978) Studies of the host parasite relationship in *Schistosoma mansoni* infected mice : the immunological dependance of parasite egg excretion. *Immunology* 35, 771-778.

Douch, P. G and Buchanan, L. L. (1978) Glutathione conjugation of some xenobiotics by *Ascaris suum* and *Moniezia expansa*. *Xenobiotica* 8, 171-176.

Dunne, D. W., Lucas, S., Bickle, Q., Pearson, S., Madgwick, L., Bain, J and Doenhoff, M. J. (1981). Identification and partial purification of an antigen omega-1 from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 54-71.

- Dunne, D. W., Bain, J., Lillywhite, J and Doenhoff, M. J. (1984) The stage-strain and species-specificity of a *Schistosoma mansoni* egg antigen fraction (CEF6) with serodiagnostic potential. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 460-470.
- Dunne, D. W., Butterworth, A. E., Fulford, A. J., Kariuki, H. C., Langley, J. G., Ouma, J. H., Capron, A., Pierce, R. J and Sturrock, R. F. (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis : association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* 22, 1483-1494.
- Duvaux-Miret, O., Baratte, B., Dissous, C and Capron, A. (1991) Molecular cloning and sequencing of α -tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 337-340.
- Esterbauer, H. (1982) Free radicals, lipid peroxidation and cancer. (Mc Brien, C. H and Slater, T. F., eds) pp 101-128, New York, Academic.
- Fenwick, A. (1987). Experience in mollusciciding to control schistosomiasis. *Parasitology today.* 3, 70-73.
- Fernandez-Botran, R., Sanders, V. M., Mosmann, T. R and Vitetta, E. S. (1988) Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 168, 543-551.
- Flanigan, T. P., King, C. H., Lett, R. R., Nanduri, J and Mahmoud, A. A. F. (1989) Induction to resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J. Clin. Inv.* 83, 1010-1014.
- Ford, M. J., Bickle, Q. D and Taylor, M. G. (1984) Immunization of rats against *Schistosoma mansoni* using irradiated cercariae, lung schistosomula and liver-stage worms. *Parasitology* 89, 327-344.
- Fournier, D., Bride, J. M., Poirie, M., Berge, J. B and Plapp, F. W. (1992) Insect glutathione S-transferases : biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptibles and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.* 267, 1840-1845.
- Fujisawa-Sehara, A., Yamane, M and Fujii-Kuriyama, Y. (1988) A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsible elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm : its possible translocation to nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 5859-5863.
- Fulford, A. J. C., Mbugua, G. G., Ouma, J. H., Kariuki, H., Sturrock, R. F and Butterworth, A. E. (1991). Differences in the rate of hepatomegaly due to *Schistosoma mansoni* infection between two areas in Machakos district, Kenya. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 481-488.
- Gajewski, T. F., Pinnas, M., Wong, T and Fitch, F. W. (1991) Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J. Immunol.* 146, 1750-1758.
- Garcia, E. G., Mitchell, G. F., Rivera, P. T., Levardome, R. R., Almonte, R. E and Tiu, W. U. (1987) Evidence for anti-embryonation immunity and egg destruction in mice sensitized with immature eggs of *Schistosoma japonicum*. *As. Pacif. J. Allerg. Immunol.* 5, 137-141.
- Garrels, J.I. (1979) Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. *J. Biol. Chem.* 254, 7961-7977.
- Gazzinelli, G., Katz, N., Rocha, R. S and Colley, D. G. (1983) Immune responses during human schistosomiasis. VII. Differential *in vitro* cellular responsiveness to adult worm and schistosomular tegumental preparations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 326-333.
- Gentilini, M and Duflo, B. (1982) Médecine tropicale. (Flammarion Médecine Sciences., ed) Paris.

- Goudot-Crezel, V., Caillol, D., Djabali, M and Dessein, A. J.** (1989) The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *J. Exp. Med.* 170, 2065-2080.
- Grezel, D., Vermersche, S., Capron, M., Regnier, O and Capron, A.** (1990) Association of immunization and chemotherapy in mouse schistosomiasis. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie.* 8, 1043.
- Grezel, D.** (1992) Participation des IgA spécifiques de l'antigène protecteur Sm28GST aux mécanismes effecteurs de défense contre le schistosome au cours d'infection expérimentales. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lille II, Septembre 1992.
- Gryseels, B.** (1989) The relevance of schistosomiasis for public health. *Trop. Med. Parasitol.* 40, 134-142.
- 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.* 129, 2739-2743.
- Grych, J. M., Capron, M., Lambert, P. H., Dissous, C., Torres, S and Capron, A.** (1985) An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* 316, 74-76.
- Grzych, J. M., Capron, A., Dissous, C., Capron, M and Lambert, P. H.** (1987) A protective carbohydrate epitope of major immunogen is expressed in Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). *J. Exp. Med.* 165, 865-878.
- Grych, J. M., Pearce, E. J., Cheever, A., Claulada, Z. A., Caspar, P., Hieny, S., Lewis, F. A and Sher, A.** (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* 146, 1322-1327.
- Grzych, J. M., Grezel, D., Xu, C. B., Neyrinck, J. L., Capron, M., Ouma, J. M., Butterworth, A. E and Capron, A.** (1992) IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* (sous presse).
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.** (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Harn, D., Quinn, J., Oligino, N. L., Percy, A., Ko, A., Pham, K., Gross, A., Gebremichael, A and Stein, L.** (1987) In : *Molecular Paradigms for Eradicating Helminth Parasites.* (McInnis, A. J., ed). pp. 55-70. Liss, New York.
- Harrison, R. A., Bickle, Q. D and Doenhoff, M. D.** (1982) Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanisms which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. *Parasitology* 84, 93-110.
- Hagan, P., Wilkins, H. A., Blumenthal, U. J., Hayes, R. J and Greenwood, B. M.** (1985) Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasit. Immunol.* 7, 625-632.
- Hagan, P., Blumenthal, U. J., Dunne, D., Simpson, A. J. G and Wilkins, H. A.** (1991) Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 349, 243-245.
- Harnett, W.** (1988) The antihelminthic action of praziquantel. *Parasitology today.* 4, 144-146.
- 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 Kilodalton potential surface antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 83-88.

- Havercroft, J. C., Huggins, M. C., Dunne, D. W., and Taylor, D. W. (1990) Characterization of Sm20, a 20 kDa calcium binding protein of *Schistosoma mansoni*.
- Hayes, J. D and Wolf, R. (1988) Role of glutathione transferase in drug resistance. In : Glutathione conjugation: its Mechanisms and Biological Significance (Sies, H., Ketterer, B., eds), pp. 315-355 Academic Press, London.
- Hazdai, R. T., Levi-Schaffer, F., Brenner, A., Horowitz, S., Eshar, Z and Arnon, R. (1985) Protective monoclonal antibody against *Schistosoma mansoni* : antigen isolation, characterization, and suitability for active immunization. *J. Immunol.* 135, 2772-2779.
- Hedstrom, R., Culpepper, J., Schinski, V., Agabian, N and Newport, G. (1988) Schistosome heat shock proteins are immunologically distinct host-like antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29, 275-282.
- Henkle, K. J., Davern, K. M., Wright, M. D., Ramos, A. J. and Mitchell, G. F. (1990) Comparison of the cloned genes of the 26- and 28-Kilodalton glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 23-34.
- Himmi, E. H., Auriault, C., Pierce, R. J., Joseph, M., Tartar, A and Capron, A. (1985) Regulatory role of a peptide from the second constant domain of immunoglobulin G. II. *In vitro* effect on granuloma formation around *S. mansoni* eggs. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 231-239.
- Hirata, M., Hieda, T and Tsutsumi, H. (1986) Immunoglobulins inside *Schistosoma japonicum* eggs from the livers of mice. *J. Parasitol.* 72, 578-582.
- Holy, J. M., O'Leary, K., Oaks, J. A and Tracy, J. W. (1989) Immunochemical localization of the major glutathione S-transferase in adult *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 75, 181-190.
- Horton, A. A and Fairhurst, B. (1987) Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* 18, 528-539.
- Howell, M. J., Board, P. G and Boray, J. C. (1988) Glutathione S-transferases in *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74, 715-718.
- Hughes, H. A. (1988) Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitology today.* 4, 340-347.
- Iarotski, L and Davis, A. (1981) The schistosomiasis problem in the World : results of a WHO questionnaire survey. *Bull. OMS.* 59, 115-127.
- Imbert-Esteblet, D and Combes, C. (1992) Relocation of *Schistosoma mansoni* in the lungs and resistance to reinfection in *Rattus rattus*. *Parasitology* 104, 51-57.
- Inceni, R. N and McLaren, D. J. (1981) Neutrophil-mediated cytotoxicity to schistosomula of *Schistosoma mansoni in vitro* : studies on the kinetics of complement and/or antibody-dependent adherence and killing. *Parasite. Immunol.* 3, 107-126.
- Jaffe, J. J and Lambert, R. A. (1986) Glutathione S-transferase in adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 199-206.
- Jakoby, W. B and Habig, W. H. (1980) Enzymatic basis of detoxification (Jakoby, W. B., ed), vol. II, pp 63-94. Academic Press, New York.
- James, S. L., Correa-Oliveira, R and Leonard, E. J. (1984a) Defective vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in P strain mice. II. Analysis of cellular responses. *J. Immunol.* 133, 1587-1593.
- James, S. L., Natovitz, P. C., Farrar, W. L and Leonard, E. J. (1984b) Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis : macrophage activation in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae. *Infect. Immun.* 44, 569-576.

- James, S. L., Pearce, E. J and Sher, A.** (1985) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non-living vaccine. I. Partial characterization of antigens recognized by antibodies from mice immunized with soluble schistosome extracts. *J. Immunol.* 136, 3878-3883.
- James, S. L.** (1986a) Activated macrophages as effector cells of protective immunity to schistosomiasis. *Immunol. Res.* 5, 139-148.
- James, S. L.** (1986b) 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.** (1986c) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non living vaccine. II. Response of mouse strains with selective immune defects. *J. Immunol.* 136, 3864-3871.
- James, S. L and Sher, A.** (1990) Cell-mediated immune response to schistosomiasis. In : *Current Topics in Microbiology and Immunology.* (Springer-Verlag., ed). 15. pp21-31 Berlin.
- Jamieson, D.** (1989) Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free. Rad. Biol. Med.* 7, 87-108.
- Janevay, C. A., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Kaizawa, K., West, J and Bottomly, K.** (1988) CD4⁺ T cells : specificity and function. *Immunol. Rev.* 101, 39-45.
- Jeffs, S. A., Hagan, P., Allen, R., Correa-Oliveira, R., Smithers, R and Simpson, A. J. G.** (1991) Molecular cloning and characterization of the 22-Kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes, *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 159-168.
- Johnston, R. B and Kitagawa, S.** (1985) Molecular basis for the enhanced respiratory burst of activated macrophages. *Fe. Proc.* 44, 2927-2932.
- Johnson, K. S., Wells, K., Bock, J. V., Nene, V., Taylor, D. W and Cordingley, J. S.** (1989) The 86-Kilodalton from *Schistosoma mansoni* is a heat-shock protein homologous to the yeast HSP-90. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 19-28.
- Joseph, M., Tonnel, A. B., Capron, A and Voisin, C.** (1980) Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with Immunoglobulin E. *Clin. Exp. Parasitol.* 40, 416-422.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H and Viens, P.** (1983) A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303, 810-811.
- Joseph, M., Capron, A., Ameisen, J. C., Capron, M., Vorng, H., Pancre, V., Kusnierz, J and Auriault, C.** (1986) The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16, 306-313.
- Kagan, I. G.** (1958) Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice. Inst. Pamph.* 45, 151-155.
- Kanazawa, T., Harris, T. S., Chikunguwo, S. M and Stadecker, M. J.** (1992) Larvicidal properties of macrophages induced by cloned murine schistosomal egg antigen-specific CD4 positive T-helper lymphocytes. *Parasite. Immunol.* 14, 279-293.
- Karcz, S. R., Podesta, R. B., Siddiqui, A. A., Dekaban, G. A., Strejan, G. H and Clarke, M. W.** (1991) Molecular cloning and sequence analysis of a calcium-activated neutral protease (calpain) from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 333-336.
- Kassis, A. I., Aikawa, M and Mahmoud, A. A. F.** (1979) Mouse antibody-dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 122, 398-404.

- Kawalek, J. C., Rew, R. S., Heavner, J.** (1984) Glutathione S-transferase, a possible drug metabolizing, in *Haemonchus contortus* : comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. *Int. J. Parasitol.* 14, 173-175.
- Kazura, J. W., DeBrito, P and Pelligrino, K.** (1985) Role of granulocyte oxygen products in damage of *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. *J. Clin. Inv.* 75, 1297-1307.
- Ketterer, B., Tan, K. H., Meyer, D. J and Coles, B.** (1987) In : Glutathione S-transferases and Carcinogenesis (Mantle, T. J., Pickett, C. B and Hayes, J. d., eds) pp. 149-163. Taylor and Francis, London.
- Ketterer, B.** (1988a) Detoxification reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 16, 957-973.
- Ketterer, B., Meyer, D.J and Clark, A.G.** (1988b) Soluble glutathione transferase isoenzymes. In : Glutathione conjugation: its Mechanisms and Biological Significance (Sies, H and Ketterer, B., eds.), pp. 73-135. Academic Press, London.
- Keim, P and Heindrickson, R. L.** (1981) An examination of the expected degree of sequence similarity that might arise in proteins that have converged to similar conformational states. *J. Mol. Biol.* 151, 179-197.
- 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, 1626-1632.
- Khalife, J., Dunne, D., Richardson, B. A., Mazza, G., Thorne, K. J. I., Capron, A and Butterworth, A. E.** (1989) Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 142, 4422-4427.
- Khalife, J., Trottein, F., Schacht, A. M., Godin, C., Pierce, R and Capron, A.** (1992) Cloning of the gene encoding a *Schistosoma mansoni* antigen homologous to human Ro/SS-A autoantigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* (soumis).
- King, C. H., Lett, R. R., Nanduri, J., El Ibiary, S., Peters, P. A., Olds, R, G and Mahmoud, A. A. F.** (1988) Isolation and characterization of a protective antigen from adjuvant-free immunization against *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 139, 4218-4224.
- Klinkert, M. Q., Felleisen, R., Link, G., Ruppel, A and Beck, E.** (1989) Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 113-122.
- Kloetzel, K.** (1964) Natural history and prognosis of splenomegaly in schistosomiasis *mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13, 541-549.
- Knight, M., Kelly, C., Rodrigues, V., Yi, X., Wamachi, A., Smithers, S. R and Simpson, A. J. G.** (1989) A cDNA clone encoding part of the major Mr 25,000 surface membrane antigen of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 75, 281-286.
- Knopf, P. M., Cioli, D., Mangold, B. L and Dean, D. A.** (1986) Migration of *Schistosoma mansoni* in normal and passively immunized laboratory rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 1173-1184.
- Komuniecki, R., Bruchhaus, I., Iig, T., Wilson, K., Zhang, Y and Fairlamb, A. H.** (1992) Purification of glutathione reductase from muscle of adult parasitic nematode *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 331-334.
- Koster, B., Dargatz, H., Schroder, J., Hinzmann, J., Haarmann, C., Symmons, P and Kunz, W.** (1988) Identification of the products of a egg-shell precursor gene in the vitellarium of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31, 183-198.

- Kuriyan, J., Krishna, T. S. R., Wong, L., Guenther, B., Pahler, A., Williams, C. H and Model, P. (1991) Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature* 352, 172-174.
- Lai, H. C. J., Qian, B., Grove and Tu, C. P. D. (1988) Gene expression of rat glutathione S-transferases. Evidence for gene conversion in the evolution of the Y-b multigene family. *J. Biol. Chem.* 263, 11389-11395.
- Landsperger, W. J., Stirewalt, M. A. and Dresden, M. H. (1982) Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* 201, 137-146.
- Lawson, J. R and Wilson, R. A. (1980) The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilisation. *Parasitology* 81, 337-348.
- Leid, R. W and Suquet, C. M (1986) A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaformis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 301-311.
- Leyland-Jones, B. R., Townsend, A. J., Tu, C. P. D., Cowan, K. H and Goldsmith, M. E. (1991) Antineoplastic drug sensitivity of human MCF-7 breast cancer cells stably transfected with a human α class glutathione S-transferase gene. *Canc. Res.* 51, 587-594.
- Lightowers, M. W and Mitchell, G. F. (1989) Assessment of the prevalence and titer of antibodies to a candidate schistosomiasis vaccine molecule, Sj26, in several human serum banks. *Acta Tropica* 46, 229-238.
- Loison, G., Vidal, A., Findeli, A., Roitsch, C., Balloul, J. M., Lemoine and Lecocq, J. P. (1989) High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5, 497-507.
- Loker, R. S. (1983) A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology* 87, 343-369.
- Lunde, M. N., Ottesen, E. A and Cheever, A. W. (1979) Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 87-91.
- Mangold, B. L and Dean, A. (1986). Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercariae-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *J. Immunol.* 136, 2644-2651.
- Mannervik, B. (1985a) Isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enz. Rel. Mol. Biol.* 57, 357-417.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jansson, H., Tahir, M. K., Warholm, M and Jornvall, H. (1985b) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7202-7206.
- Marty-Plumas, B., Verwaerde, C., Loyens, M., Velge, P., Taibi, A., Cesbron, M. F., Capron, A and Ouaiissi, M.A. (1992) *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins : immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology* 104, 87-98.
- Mathews W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- McKenzie, C. D., Ramalho-Pinto, F. J., McLaren, D. J and Smithers, S. R. (1977) Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 51, 307-312.
- McLaren, D. J., Ramalho-Pinto, F. J and Smithers, S. R. (1978) Ultrastructural evidence for complement and antibody-dependent damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* 30, 97-105.

- McLaren, D. J., McKean, J. R., Olsson, I., Venge, P and Kay, A. B. (1981)** Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*. Parasit. Immunol. 3, 359-371.
- McLaren, D. J and James, S. L. (1985)** Ultrastructural studies of the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by activated macrophages *in vitro*. Parasite. Immunol. 7, 315-331.
- McLaren, D. J., Strath, M and Smithers, S. R. (1987)** *Schistosoma mansoni* : evidence that immunity in vaccinated and chronically infected CBA/Ca mice is sensitive to treatment with a monoclonal antibody that depletes cutaneous effector cells. Parasit. Immunol. 9, 667-682.
- McPherson, A. (1976)** The growth and preliminary investigation of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis. In : Methods of Biochemical Analysis. (Glick, D., ed.), vol 23, pp 249-345, J. Wiley, New York.
- Meyer, D. J and Ketterer, B. (1987)** Glutathione S-transferases and Carcinogenesis (Mantle, T. J., Pickett, C. B and Hayes, J. d., eds) pp. 57-59. Taylor and Francis, London.
- Meyer, D. J., Lalor, E., Coles, B., Kispert, A., Alin, P., Mannervik, B and Ketterer. (1989)** Single-step purification and HPLC analysis of glutathione transferase 8-8 in rat tissues. Biochem. J. 260, 785-788.
- Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M and Ketterer. (1991)** Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and human. Biochem. J. 274, 409-414.
- Miller, K. J., Kennedy, E. P and Reinhold, V. N. (1986)** Osmotic adaptation by gram negative bacteria : possible role for periplasmic oligosaccharids. Science 231, 48-51.
- Miller, K. L., Smithers, S. R and Sher, A. (1981)** The response of mice immune to *Schistosoma mansoni* to a challenge infection which bypasses the skin : evidence for two mechanisms of immunity. Parasite. Immunol. 3, 25-31.
- Minard, P., Dean, D. P., Jacobson, R. H., Vannier, W. E and Murrell. (1978)** Immunization of mice with cobalt-60-irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27, 76-86.
- Mitchell, G. F., Beale, J. A., Cruise, K. M., Tiu, W. U and Garcia, E. G. (1985)** Antibody responses to antigen Sj26 of *Schistosoma japonicum* worms that is recognized by genetically resistant 129/J mice. Parasite. Immunol. 7, 165-178.
- Mitchell, G. F., Garcia, E. G., Davern, K. M., Tiu, W. U. and Smith, D. B (1988)** Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of resistance to *Schistosoma japonicum* in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 885-889.
- Mitchell, G.F. (1989)** Glutathione S-transferase-Potential components of anti-schistosome vaccines ? Parasitology today. 5, 34-37.
- Mitchell, G. F., Davern, K. M., Wood, S. M., Wright, M. D., Argyropoulos, V. P., McLeod, K. S., Tiu, W. U. and Garcia, E. G. (1990)** Attempts to induce resistance in mice to *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* by exposure to crude schistosome antigens plus cloned glutathione S-transferases. Immunol. Cell. Biol. 68, 377-385.
- Mkoji, G. M., Smith, J. M., Prichard, R. K. (1988a)** Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni* : correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals. Int. J. Parasitol. 18, 661-666.
- Mkoji, G. M., Smith, J. M., Prichard, R. K. (1988b)** Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni* : Evidence for their role in protection of the adult worms against oxidant killing. Int. J. Parasitol. 18, 667-673.

- Mkoji, G. M., Smith, J. M., Prichard, R. K** (1989) Glutathione redox state, lipid peroxyde level and activities of glutathione enzymes in Oltipraz-treated adult *Schistosoma mansoni*. *Biochem. Pharmacol.* 38, 4307-4313.
- Moloney, N. A., Hinchcliffe, P and Webbe, G.** (1987) Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice after treatment with praziquantel. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 247-254.
- Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A and Mosmann, T. R.** (1990) Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248, 1230-1233.
- Morgenstern, R and DePierre, J. W.** (1983) Microsomal glutathione S-transferase : Purification in unactivated form and further characterization : activation process, substrat specificity and amino acid composition. *J. Biochem.* 134, 597-602
- Morgenstern, R and DePierre, J. W.** (1988) Membrane-bound glutathione transferases. In : *Glutathione Conjugation : its Mechanisms and Biological Significance* (Sies, H and Ketterer, B., eds.), pp. 73-135, Academic Press , London .
- Morello, A., Repetto, Y and Atias, A.** (1982) Characterization of glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72, 449-452.
- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G and Klinkert.** (1991) A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 8447-8454.
- Moser, D., Doenhoff, M. J and and Klinkert.** (1992) A stage-specific calcium-binding protein expressed in eggs of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 229-238.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A and Coffman, R. L.** (1986) Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2356.
- Murrell, K. D., Dean, D. A and Stafford, E. E.** (1975) Resistance to infection with *Schistosoma mansoni* after immunization with worms extracts or living cercariae. Role of cytotoxic antibody in mice and guinea-pigs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 955-962.
- Nadler, S. A.** (1987) Genetic variability in endoparasitic helminths. *Parasitology today.* 3, 154-155.
- Nare, B., Smith, J. M and Prichard, R. K.** (1990) *Schistosoma mansoni* : levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development. *Exp. Parasitol.* 70, 389-397.
- Nare, B., Smith, J. M and Prichard, R. K.** (1991) Differential effects of oltipraz and its oxy-analogue on the viability of *Schistosoma mansoni* and the activity of glutathione S-transferase. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1287-1292.
- Nathan, C. F.** (1982) Secretion of oxygen intermediates : role in effector functions of activated macrophages. *Fed. Proc.* 41, 2206-221.
- Nene, V., Dunne, D. W., Johnson, K. S., Taylor, D. W., Cordingley, J. S.** (1986) Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 179-188.
- Newport, G. R., Harrison, S. A., McKerrow, J. H., Tarr, P., Kallestad, J and Agabian, N.** (1987) Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* myosin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 26, 29-38.
- Newport, G. R., McKerrow, J. H., Hedstrom, R., Pettitt, M., McGarrigle, L., Barr, P. J and Agabian, N.** (1988) Cloning of proteinase that facilitates infection by schistosomes parasites. *J. Biochem. Chem.* 263, 13179-13184.

- Nirdé, P., DeReggi, M. L., Tsoupras, G., Torpier, G and Capron, A. (1984)** Excretion of ecdysteroides by schistosomes as a marker of parasite infection. *FEBS. Lett.* 168, 235-240.
- Nojima, H and Sato, A. (1982)** *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* : emergence of schistosome cercariae from snails with darkness and illumination. *Exp. Parasitol.* 53, 189-198.
- Olds, G. R and Mahmoud, A. A. F. (1980)** Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis mansoni. Eosinophil-mediated destruction of eggs. *J. Clin. Inv.* 66, 1191-1200.
- O'Leary, K. A and Tracy, J. W. (1988)** Purification of three cytosolic glutathione S-transferase from adult *Schistosoma mansoni* . *Arch. Biochem. Biophys.* 264, 1-12.
- O'Leary, K. A and Tracy, J. W. (1991)** *Schistosoma mansoni* : glutathione S-transferase-catalyzed detoxification of dichlorvos. *Exp. Parasitol.* 72, 355-361.
- Openoorth, F. J. (1985)** Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In : *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Kerkut, G. S and Gilbert, L. J., eds) Vol. 12, pp. 731-773. Pergamon, Oxford.
- Openoorth, F. J., Van der Pas L. J. T and Houx, N. W. H. (1979)** Glutathione S-transferases and hydrolytic activity in a tetrachlorovinphos resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pest. Biochem. Physiol.* 11, 176-182.
- Ottesen, E. A., Stanley, A. M., Gelfand, J. A., Gadek, J. E., Frank, M. M., Nash, T. E and Cheever, A. W. (1977)** Immunoglobulin and complement receptors on human eosinophils and their role in cellular adherence to schistosomules. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26, 134-147.
- Panaccio, M., Wilson, L. R., Cramer, S. L., Wijffels, G. L and Spithill, T. W. (1992)** Molecular characterization of cDNA sequences encoding glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (sous presse).
- Pancré, V., Joseph, M., Mazingue, C., Wietzerbin, J., Capron, A and Auriault, C. (1987)** Induction of platelet cytotoxicity functions by lymphokines : role of interferon gamma. *J. Immunol.* 138, 4490-4497.
- Pancré, V., Joseph, M., Capron, A., Wietzerbin, J., Kusnierz, J. P., Vorng, H and Auriault, C. (1988)** Recombinant human interferon gamma induces increased IgE receptor expression on human platelets. *Eur. J. Immunol.* 18, 829-832.
- Pancré, V., Schellekens, H., Van Der Meide, F., Vorng, H., Delanoye, A., Capron, A and Auriault, C. (1989)** Biological effect of gamma interferon during the course of experimental infection of rat by *Schistosoma mansoni*. *Cell. Immunol.* 125, 58-69.
- Pancré, V., Monte, D., Delanoye, A., Capron, A and Auriault, C. (1990)** Interleukine-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur. Cytokine. Net.* 1, 15-23.
- Papadopoulos, A., Brophy, P. M., Crowley, P., Ferguson, M and Barrett, J. (1989)** Glutathione transferase in the free-living nematode *Panagrellus redivivus*. *FEBS. Lett.* 253, 76-78.
- Parker, M. W., Bello, M. L. and Federici, G. (1990)** Crystallization of glutathione S-transferase from human placenta. *J. Mol. Biol.* 213, 221-222.
- Paul, J. M and Barrett, J. (1980)** Peroxide metabolism in the Cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Moniezia expansa*. *Int. J. Parasitol.* 10, 121-124.
- 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. Sher, A. (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a non-surface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5678-5682.

Pearce, E. J., Caspar, P., Gryzch, J. M., Lewis, F. A and Sher, A. (1991) Down regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173, 159-166.

Pearson, W. R., Reinhart, J., Sisk, S. C., Anderson, K. S and Adler, P. N. (1988) Tissue-specific induction of murine glutathione S-transferase mRNAs by butylated hydroxyanisole. *J. Biol. Chem.* 263, 13324-13332.

Pemberton, K. D and Barrett, J. (1989) The detoxification of xenobiotics compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda : Filarioidea). *Int. J. Parasitol.* 72, 401-409.

Petsko, G. A. (1991) Déjà vu all over again. *Nature* 352, 104-105.

Pickett, C. B and Lu, A, Y, H. (1988) The structure, genetics and regulation of soluble glutathione S-transferases. In : *Glutathione conjugation : its Mechanisms and Biological Significance* (Sies, H and Ketterer, B., eds.), pp. 137-156, Academic Press , London .

Pickett, C. B and Lu, A. Y. H (1989) Glutathione S-transferases : gene structure, regulation and biological function. *An. Rev. Biochem.* 58, 743-764.

Pierce, R. j., Auriault, C., Boulanger, D., Capron, M., Grezel, D., Grzych, J. M., Velge-Roussel, F., Verwaerde, c., Wolowczuk, I and Capron, A. (1990) Advances toward a vaccine against schistosomiasis. In : *Immune Recognition and Evasion : molecular aspects of host-parasite interaction.* (Van Des Ploeg, ed). Academic Press, Inc, San Diego.

Phillips, S. M., Reid, W. A., Doughty, B and Khoury, P. B. (1978) The cellular and humoral immune response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. III. Development of optimal protective immunity following natural infections and artificial immunizations. *Cell. Immunol.* 38, 225-238.

Prata, A. (1987) Schistosomiasis mansoni in Brazil in Bailliere's clinical. *Trop. Med. Comm. Dis.* 2, 349-369.

Precious, W. Y and Barrett, J. (1989) The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochem. Biophys. Acta.* 992, 215-222.

Prichard, R., Mkoji, G., Nare, B and Smith, J. (1989) The role of H₂O₂ and lipid peroxides in immunity to, and control of *Schistosoma mansoni*. *Aust. Soc. Parasitol. Abs.* 89, 44-55.

Pyerin, W., Taniguchi, H., Horn, F., Oesch, F., Amerlizad, Z., Friedberg, T and Wolf, C. R. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 885-892.

Rabellino, E. M and Metcalf, D. (1975) Receptors for C3b and IgG on macrophages, neutrophil and eosinophil colony cells grown *in vitro*. *J. Immunol.* 115, 688-695.

Rajkovic, A., Simonsen, J. N., Davis, R. E and Rottman, F. M. (1989) Molecular cloning and sequence analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8217-8221.

Ram, D., Grossman, Z., Markovics, A., Avivi, A., Ziv, E ., Lantner, F and 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, G., Gazinelli, G., Howells-Santos, T. A., Figueiredo, E. A and Pellegrino, J. (1974) *Schistosoma mansoni* defined system for stepwise transformation of

cercariae to schistosomula *in vitro*. Exp. Parasitol. 36, 360-372.

Ramalho-Pinto, F. J., Mc Laren, D. J and Smithers, S. R. (1978) Complement-mediated killing of *Schistosoma mansoni* by rats eosinophils *in vitro*. J. Exp. Med. 147, 147-155.

Reddy, C. C., Tu, C. D., Burgess, J. R., Ho, C. H., Scholz, R. W and Massaro, E. J. (1981) Evidence for the occurrence of selenium-independent glutathione peroxidase activity in rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 101, 970-978.

Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gallay, O. and Huber, R. (1991) The three dimensional structure of a class π glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. EMBO J. 10, 1997-2005.

Rhoads, M. L. (1983) *Trichinella spiralis* : identification and purification of superoxide dismutase. Exp. Parasitol. 56, 41-54.

Rihet, P., Demeure, C. E., Bourgois, A., Prata, A and Dessen, A. (1991) Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. Eur. J. Immunol. 21, 2679-2686.

Robinson, E. J. (1958). A possible effect of testosterone on the development of *Schistosoma mansoni*. Parasitology 61, 59-66.

Rogers, M. V. (1986) *Schistosoma mansoni* : Studies of antigen recognition and immune expression in chronically infected and vaccinated guinea pigs. Ph. D. Thesis. Brunel University, Uxbridge Middlesex, U. K.

Rogers, M. V., Henkle, K. J., Herrmann, V., McLaren, D. J and Mitchell, G. F. (1991) Evidence that a 16-Kilodalton integral membrane protein antigen from *Schistosoma japonicum* adult worm is a type A2 phospholipase. Infect. Immun. 59, 1442-1447.

Rushmore, T. H., Harris, L., Nagai, M., Sharma, R. N., Hays, M. A., Cameron, R. G., Murray, R. K. and Farber, E. (1988) Purification and characterization of glutathione S-transferase-P or 7-7 from normal liver and putative preneoplastic liver nodules. Canc. Res. 48, 2805-2812.

Sabah, A. A., Fletcher, C., Webbe, G and Doenhoff, M. (1985) *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell deprived mice. Exp. Parasitol. 60, 348-354.

Sadun, E. H., Von Lichtenberg, F and Bruce, J. I. (1966) Susceptibility and comparative pathology of ten species of primates exposed to infection with *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 705-712.

Santoro, F., Lachmann, P. J., Capron, A and Capron, M. (1979a) Activation of complement by *Schistosoma mansoni* schistosomula : killing of parasites by the alternate pathway and requirement of IgG for classical pathway activation. Am. J. Trop. Med Hyg. 19, 427-458.

Santoro, F., Vandemeulebroucke, B and Capron, A. (1979b) *Schistosoma mansoni* : circulating antigens and immune complexes in infected mice. Exp. Parasitol. 47, 392-402.

Santoro, F., Prata, A., Castro, C. N and Capron, A. (1980) Circulating antigens, immune complexes and C3d levels in human schistosomiasis : relationship with *Schistosoma mansoni* egg output. Clin. Exp. Immunol. 42, 219-225.

Scallon, B. J., Bogitsh, B. J and Carter, C. E. (1989) Characterization of a large gene family in *Schistosoma japonicum* that encodes an immunogenic miracidial antigen. Mol. Biochem. Parasitol. 33, 105-112.

Schäffer, J., Gallay, O. & Ladenstein, R. (1988) Glutathione transferase from bovine placenta : Preparation, biochemical characterization, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a neutral class π enzyme. J. Biol. Chem. 263, 17405-17411.

- Schweitzer, A. N.** (1992) Alternative patterns of MHC-restricted antibody responsiveness following intraperitoneal immunization of inbred mice with different preparations of an 86 Kda antigen of *Schistosoma mansoni*. Parasite. Immunol. 14, 267-277.
- Seidergard, J., Guthenberg, C., Pero, R. W and Mannervik, B.** (1987) The trans-stilbene oxide-active glutathione transferase in human mononuclear leucocytes is identical with the hepatic glutathione transferase μ . Biochem. J. 246, 783-785.
- Sesay, M. A., Ammon, H. L. & Armstrong, R. N.** (1987) Crystallization and a preliminary X-ray diffraction study of isoenzyme 3-3 of glutathione S-transferase from rat liver. J. Mol. Biol. 197, 377-378.
- Sexton, J. L., Milner, A. R., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T. W., Mitchell, G. F and Campbell, N. J.** (1990) Glutathione S-transferase : novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. J. Immunol. 145, 3905-3910.
- Shaker, Z. A., Hassanein, H. I., Kamel, M. M., El-Bahairy, N. M., El-Kalouby, A. H and El-Raziky, E. H.** (1987) Effect of praziquantel on certain immune responses of schistosomal egyptian patients. Parasitol. Res. 73, 328-333.
- Shasteen, C. S., Krivak, B. M and Reed, D. J.** (1983) Similarities in inactivation of glutathione S-transferases by arginine specific chemical modifying agents. Fed. Proc. 42, 1631, pp 2036.
- Sher, A.** (1976) Complement-dependent adherence of schistosomula to mast cells. Nature 263, 334-335.
- Sher, A and Pearce, E. J.** (1988) Schistosomiasis vaccine. Nature 334, 478-480.
- Sher, A., James, S.L., Correa-Oliveira, R., Hieny, S. and Pearce, E.** (1989) Schistosome vaccines: current progress and future prospects. Parasitology 98, 61-68.
- Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E. J and Ossman, T. R.** (1991) Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th-1 cytokine synthesis. J. Immunol. 147, 2713-2719.
- Sher, A.** (1992) Parasitizing the cytokine system. Nature. 356, 565-566.
- Shoemaker, C., Gross, A., Gebremichael, A and Harn, D.** (1992) cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1842-1846.
- Short, R. B.** (1983) Sex and the single schistosome. J. Parasitol. 69, 4-22.
- Simpson, A. J. G., Sher, A and McCuthan, T. F.** (1982) The genome of *Schistosoma mansoni* : isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. Mol. Biochem. Parasitol. 6, 125-137.
- Simons, P. C and Vander Jagt, D.L.** (1981) Purification of glutathione S-transferases by glutathione-affinity chromatography. In: Methods in Enzymology (Jakoby, W.B., ed.). Vol.77, pp.235-237, Academic Press, New York.
- Simurda, M. C., Van Keulen, H., Rekosh, D. M., and Lo Verde, P. T.** (1988) *Schistosoma mansoni* : Identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxyde dismutase (Cu/Zn). Exp. Parasitol. 67, 73-84.
- Silberstein, D. S. and David, J. R.** (1986) Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 1055-1063.
- Slater, T. F.** (1984) Free radical mechanisms in tissue injury. Biochem. J. 222, 1-15.

- Sleigh, A. C., Hoff, R., Mott, K. E., Maguire, J. H and Da Franca Silva, A. (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, D.B., Rubira, M.R., Simpson, R.J., Davern, K.M., Tiu, W.U., Board, P.G. and Mitchell, G.F. (1988) Expression of an enzymatically active parasite molecule in *Escherichia coli* : *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem Parasitol.* 27, 249-256.
- Smith, N. C and Bryant, C. (1986) The role of host generated free radicals in helminth infections : *Nippostrongylus brasiliensis* and *Nematospiroides dubius* compared. *Int. J. Parasitol.* 16, 617-622
- Smith, N. C and Bryant, C. (1989) Free radical generation during primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis* . *Parasite. Immunol.* 11, 147-160.
- Smith, M. A and Clegg, J. A. (1985) Vaccination against *Schistosoma mansoni* with purified surface antigens. *Science* 227, 535-537.
- Smith, N. C and Bryant, C. (1989) Free radical generation during primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis* . *Parasite Immunol.* 11, 147-160.
- Smithers, S. R and Terry, R. J. (1965a) Acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the albinos rat. *Parasitology* 55, 711-720.
- Smithers, S. R and Terry, R. J. (1965b) Naturally acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Parasitology* 55, 701-710.
- Smithers, S. R and Terry, R. J. (1965c) The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55, 695-700.
- Smithers, S. R and Terry, R. J. (1967) Resistance to experimental infection by *Schistosoma mansoni* in Rhesus monkeys induced by transfert of adult worms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61, 517-533.
- Smithers, S. R and Terry, R. J. (1969) The immunity of schistosomiasis. *Adv. Parasitol.* 7, 41-93.
- Smithers, S. R., Hackett, F., Omer, A. P and Simpson, A. J. (1989) Protective immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with purified adult worm surface membranes. *Parasite. Immunol.* 11, 301-318.
- Spithill, T. W., Sexton, J. L., Milner, A. R., Panacio, M., Wijffels, G., Thompson, C., Wilson, L., Salvatore, L., Cramer, S and Campbell. (1992) Protection of sheep against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* (in Press)
- Soderstrom, M., Mannervik, B., Ornig, L and Hammarstrom, S. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 2656-270.
- Stein, L. D and David, J. R. (1986) Cloning of a developmentally regulated tegument antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 253-264.
- Stein, L. D., Harn, D. A and David, J. R. (1990) A cloned ATP-guanidino kinase in the trematode *Schistosoma mansoni* has a novel duplicated structure. *Nucl. Ac. Res.* 18, 1549-1557.
- Stirewalt, M. A., Kuntz, R. E and Evans, A. S. (1974) *Schistosoma mansoni* : cercariae

to schistosomula. *Adv. Parasitol.* 12, 115-125.

Sturrock, R. F., Kimani, R., Cottrell, B. J., Butterworth, A. E., Seitz, H. M., Siogok, T. K and Houba, V. (1983) Observations of possible immunity to reinfection among Kenyan schoolchildren after treatment for *Schistosoma mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 363-371.

Suguoka, Y., Kano, T., Okuda, A., Sakai, M., Kitagawa, T and Muramatsu, M. (1985) Cloning and the nucleotide sequence of rat glutathione S-transferase π cDNA. *Nucl. Ac. Res.* 13, 6049-6057.

Talla, I., Kongs, A., Bellot, J., Verlé P., Sarr, S and Coll, A. M. (1990) Outbreak of intestinal schistosomiasis in the Senegal River basin. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 70, 173-180.

Tamai, K. K., Satoh, S., Tsuchida, I., Hatayama, T., Maki, T and Sato, K. (1990). Specific inactivation of glutathione S-transferase in class p by SH-modifiers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167- 331-339.

Tamaki, H., Kumagai, H and Tochikura, T. (1990) Glutathion S-transferase in yeast : induction of mRNA, cDNA cloning and expression in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 172, 669-675.

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 S-transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28 K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 7, 465-472.

Taylor, M. G., Nelson, G. S., Smith, M and Andrews, B. J. (1973) Comparison of the infectivity and pathogenicity of six species of african schistosomes and their hybrids. *J. Helminthol.* 47, 455-485.

Taylor, M. G. (1975) Towards the development of a live vaccine for schistosomiasis. In : *Nuclear techniques in helminthology research.* pp 165-173. Vienna, International Atomic Energy Agency.

Taylor, M. G and Bickle, Q. D. (1986) Towards a schistosomiasis vaccine : irradiated schistosomes vaccines. *Parasitology today.* 2, 132-134.

Taylor, M.G. (1987) Schistosomes of domestic animals: *Schistosoma bovis* and other animal forms. In: *Immunology, Immunoprophylaxis and Immunotherapy of Parasitic Infections.* (Soulsby, E.J.L., ed.), Vol 2, pp 50-90, C.R.C Press, Boca Raton, Florida.

Telakowski-Hopkins, C. A., Rodkey, J. A., Bennett, C. D and Lu, A. Y. H. (1985) Rat liver glutathione S-transferases. Construction of a cDNA clone complementary to a Yc mRNA and prediction of the complete amino acid sequence of a Yc subunit. *J. Biol. Chem.* 260, 5820-5825.

Telakowski-Hopkins, C. A., King, R. G and Pickett, C. B. (1988) Glutathione S-transferase Ya subunit gene : identification of regulatory elements required for basal level and inducible expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 1000-1004.

Tomarev, S. I and Zinovieva, R. D. (1988) Squid major lens polypeptides are homologous to glutathione S-transferases subunits. *Nature* 336, 86-89.

Torpier, G., Capron, M and Capron, A. (1977) Structural changes of the tegument membrane complex in relation to developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *J. Ultrastruct. Res.* 61, 309-324.

Torpier, G., Capron, A and Ouaisi, M. A. (1979) Receptor of IgG (Fc) and human β 2-microglobulin on *Schistosoma mansoni* schistosomula. *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.*

Trottein, F., Kieny, M. P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schmitt, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1990) Molecular cloning and tissue distribution of a 26 kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41, 35-44.

Trottein, F., Vaney, M. C., Bachet, B., Pierce, R. J., Colloc'h, N., Lecocq, J. P., Capron, A. and Mornon, J. P. (1992) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a protective cloned 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. *J. Mol. Biol.* 224, 515-518.

Trottein, F., Godin, C., Pierce, R. J., Sellin, B., Taylor, M. G., Gorillot, I., Sampaio Silva, M., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1992b) Inter-species variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 63-72.

Tu, C. P. D., Weiss, M. J., Li, N and Reddy, C. C. (1983) Tissue-specific expression of the rat glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 258, 4659-4662.

Van Der Knaap, W. P. W and Loker, E. S. (1990) Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitology today.* 6, 175-182.

VanDeWaa, E. A and Bennett, J. L. (1987) HMGCoA reductase : role in schistosome egg production. In : *Molecular Strategies of Parasitic Invasion.* (Alan. R. Liss., ed) pp 627-640. New York.

Velge-Roussel, F., Verwaerde, C., Grzych, J. M., Auriault, A. and Capron, A. (1989) Protective effects of anti-antiidiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* antigen. *J. Immunol.* 142, 2527-2532.

Velge-Roussel, F., Auriault, A., Damonville, M and Capron, A. (1991) Functional analysis of a T cell line specific for antiidiotypic antibodies to a *Schistosoma mansoni* protective epitope. II. Induction of protective immunity in experimental rat schistosomiasis. *J. Immunol.* 147, 3967-3972.

Vermund, S. H., Bradley, D. J and Ruitz-Tiben, E. (1983) Survival of *Schistosoma mansoni* in the human host : estimates from a community-based prospective study in Puerto-Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1040-1046.

Verwaerde, C., Auriault, C., Damonville, M., Grzych, J. M and Capron, A. (1985) Experimental and human response against schistosomula released products (SRP-A): *in vitro* cytotoxic activities of anti-SRP-A IgG antibodies. *Parasitol.* 90, 509-518.

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.

Xu, C.B., Verwaerde, C., Grzych, J.M., Fontaine, J. and Capron, A. (1991) A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* 21, 1801-1807.

Xu, C.B., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Tartar, A. and Capron, A. (1992) Amino and carboxyl termini of *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase are involved in the enzymatic function concerning parasite fecundity and egg viability. *J. Immunol.* (soumis).

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.

Webbe, G., James, C., Nelson, G. S., Ismail, M. M and Shaw, J. R. (1979) Cross resistance between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* in the baboon. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 42-54.

- Webbe, G., Sturrock, R. F., James, E. R and James, C. (1982) *Schistosoma haematobium* in the baboon (*Papio anubis*): effect of vaccination with irradiated larvae on the subsequent infection with percutaneously applied cercariae. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 354-361.
- Webster, P. J., Seta, K. A., Chung, S. C and Mansour, T. A. (1992) A cDNA encoding an α -tubulin from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 169-170.
- Weller, P. F., Longworth, D. L and Jaffe, J. J. (1989) Leukotriene C4 synthesis catalyzed by *Dirofilaria immitis* glutathione S-transferase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 171-175.
- Weston, K., Yochem, J and Greewald, I. (1989) A *Caenorhabditis elegans* cDNA that encodes a product resembling the rat glutathione S-transferase P subunit. *Nucl. Ac. Res.* 17, 2138.
- Wijffels, G. L., Sexton, J. L., Salvatore, L., Pettitt, J. M., Humphris, D. C., Panaccio, M and Spithill, T. W. (1992) Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 74, 87-99.
- Wilkins, H. A., Blumenthal, U. J., Hagan, P., Hayes, R. J and Tulloch, S. (1987) Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 29-35.
- Wilkins, H.A. (1989) Reinfection after treatment of schistosome infections. *Parasitology today* 5, 83-88.
- Williams, D. L., Pierce, R. J., Cookson, E and Capron, A. (1992) Molecular cloning of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52, 127-130.
- Wilson, R. A., Coulson, P. S and McHugh, S. M. (1983) A significant part of the concomitant immunity of mice to *Schistosoma mansoni* is the consequence of a leaky hepatic portal system, not immunore killing. *Parasite. Immunol.* 5, 595-601.
- Wilson, R. A and Coulson, P. S. (1986). Migration of schistosomes of *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae, and normal mice: an attempt to identify the timing and site of parasite death. *Parasitology* 92, 101-116.
- Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Vendeville, C., Balloul, J. M., G.D., Tartar, A. and Capron, A. (1989) Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P28-1 antigen. *J. Immunol.* 142, 1342-1350.
- Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Vendeville, C., Tartar, A. and Capron, A. (1990) T-cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 93, 350-358.
- Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R. J., Grezel, D., Reid, G. D., Tartar, A. and Capron, A. (1991a) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm28 GST antigen in rat, mouse and monkey. Partial protection of Fischer rat after active immunization. *J. Immunol.* 146, 1987-1995.
- Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R.J., Grezel, D., Tartar, A. and Capron, A. (1991b) A multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm28GST antigen protects Fischer rats against infection. *J. Immunol.* 146, 1996-2004.
- Wolowczuk, I., Kimani, G., Boulanger, D., Butterworth, E., Gras-Masse, H., Tartar, A., Ouma, J.H., Tarara, R., Reid, G.D., Koech, D., Auriault, C. and Capron, A. (1992) A study of human and primate lymphocytes responses to synthetic peptides of the Sm28GST protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *J. Clin. Microbiol* (submitted).
- Wright, M.D., Rogers, M. V., Davern, K. M and Mitchell, G.F. (1988) *Schistosoma*

mansoni antigens differentially recognized by resistant WEHI 129/J mice. Infect. Immunit. 56, 2948-2952.

Wright, M. D., Henkle, K. J and Mitchell, G. F. (1990) An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen. J. Immunol. 144, 3195-3200.

Wright, M. D., Harrison, R. A., Melcher, A. M., Newport, G. R. and Mitchell, G. F. (1991) Another 26 kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 49, 177-180.

Xu, C.B., Verwaerde, C., Grzych, J.M., Fontaine, J. and Capron, A. (1991) A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. Eur. J. Immunol. 21, 1801-1807.

Xu, C. B., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Tartar, A. and Capron, A. (1992) Amino and carboxyl termini of *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase are involved in the enzymatic function concerning parasite fecundity and egg viability. J. Immunol (soumis).

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.

Yawetz, A and Agosin, M. (1981) Purification of the glutathione S-transferase of *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 68B, 237-243.

Yamaguchi, Y. T., Suda, J., Suda, M., Eguchi, Y., Miura, N., Harada, A.; Tominaga, A and Takatsu, K. (1988) Purified interleukine 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. J. Exp. Med. 167, 43-51.

Zhang, P., Graminski, G. F and Armstrong, R. N. (1991) Are the Histidine residues of glutathione S-transferase important in catalysis ? An assessment by ¹³C NMR spectroscopy and site-specific mutagenesis. J. Biol. Chem. 266, 19475-19478.

Zwingenberger, K., Richter, J., Siqueira Vergetti, J. G and Feldmeier, H. (1990) Praziquantel in the treatment of hepatosplenic schistosomiasis : biochemical disease markers indicate deceleration of fibrogenesis and diminution of portal flow obstruction. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 252-256.

TABLE DES MATIERES

RESUME	p 9
ABREVIATIONS	p 10
INTRODUCTION	p 11
GENERALITES	p 13
1. Répartition géographique des schistosomiases.....	p 14
2. Place des schistosomes dans le règne animal	p 16
3. Cycle évolutif	p 17
3-1 Description générale du cycle	
3-2 Le miracidium	
3-3 Le sporocyste	
3-4 La cercaire	
3-5 Le schistosomule et le ver adulte	
4. Biologie des schistosomes	p 20
4-1 Nutrition et métabolisme	
4-2 Excrétion	
4-3 Reproduction	
5. Pathologie associée aux bilharzioses.....	p 22
5-1 Forme aiguë	
5-2 Les granulomes et l'immunopathologie	
5-3 Forme chronique	
6. Diagnostic.....	p 24
6-1 Recherche des anticorps	
6-2 Recherche des antigènes circulants	
6-3 Recherche des complexes immuns	
6-4 Conclusion	
7. Prophylaxie sanitaire des schistosomiases.....	p 25
8. Traitement.....	p 25

PROPHYLAXIE MEDICALE DES SCHISTOSOMIASES

1. La réponse immune contre <i>Schistosoma mansoni</i> dans les modèles animaux.....	p 28
1-1 Les modèles animaux	

- 1-1-1 La spécificité d'espèce
 - 1-1-2 Le choix du modèle
 - 1-2 Les caractères généraux de la réponse immune vis-à-vis des schistosomes
 - 1-2-1 L'immunité concomitante
 - 1-2-2 Stades inducteurs et stades cibles de la réponse immune
 - 1-2-3 Les composantes de la réponse immune
 - 1-2-3-1 Mécanismes effecteurs non spécifiques
 - 1-2-3-1-1 Le complément
 - 1-2-3-1-2 Les cellules tueuses
 - 1-2-3-1-3 Les macrophages
 - 1-2-3-1-4 Les réactions inflammatoires
 - 1-2-3-2 Mécanismes effecteurs spécifiques
 - 1-2-3-2-1 Dépendant d'anticorps en présence de complément
 - 1-2-3-2-2 Dépendant d'anticorps avec coopération cellulaire
 - 1-2-3-2-2-1 Les macrophages
 - 1-2-3-2-2-2 Les éosinophiles
 - 1-2-3-2-2-3 Les plaquettes
 - 1-2-3-2-2-4 Pertinence *in vivo*
 - 1-2-3-2-3 Dépendant de lymphokines
 - 1-2-3-2-3-1 Activation des macrophages
 - 1-2-3-2-3-2 Activation des plaquettes
 - 1-2-3-2-3-3 Activation des éosinophiles
 - 1-2-3-3 Régulation de la réponse immune vis-à-vis de *S. mansoni*
 - 1-2-3-3-1 Rôle des Th1 et des Th2
 - 1-2-3-3-2 Immunorégulation du granulome
 - 1-2-4 Mécanismes d'évasion du schistosome
 - 1-2-4-1 Acquisition d'antigènes d'hôte
 - 1-2-4-2 Utilisation des lymphokines de l'hôte
 - 1-2-4-3 Immunosuppression induite
2. Immunologie des bilharzioses humaines p 41
 - 2-1 Réponse humorale
 - 2-2 Réponse cellulaire
 - 2-3 Immunité à la réinfection
 - 2-4 Nature des composants humoraux de l'immunité
 - 2-4-1 Isotypes effecteurs
 - 2-4-2 Isotypes bloquants
 - 2-4-3 Conclusion
3. Stratégies vaccinales contre les bilharzioses p 44
 - 3-1 Infestation interspécifique
 - 3-2 Larves atténuées
 - 3-3 Vaccins non-vivants
 - 3-3-1 Extraits antigéniques brutes

3-3-2 Antigènes purifiés

3-3-3 Molécules clonées

LA Sm28GST

1. Identification	p 52
2. Mise en évidence du pouvoir protecteur	p 52
3. Effet de l'immunisation sur la ponte	p 53
4. Effet synergique de la chimiothérapie et de l'immunisation	p 54
5. Identification des épitopes majeurs	p 55
5-1 Chez le rat	
5-2 Chez la souris	
5-3 Chez l'homme	
5-4 Construction peptidique	
6. Utilisation d'Anticorps monoclonaux	p 56
7. Conclusion	p 56
8. Optimisation des protocoles d'immunisation	p 57
9. Les GSTs de <i>Fasciola hepatica</i>	p 58

LES GLUTATHION-S-TRANSFERASES

1. Chez les vertébrés.....	p 60
1-1 Les GSTs microsomaux	
1-2 Les GSTs cytosoliques	
1-2-1 Fonctions	
1-2-1-1 Détoxification des xénobiotiques	
1-2-1-2 Détoxification des produits endogènes	
1-2-1-2-1 Par l'activité glutathion peroxydase	
1-2-1-2-2 Par l'activité glutathion-S-transférase	
1-2-1-2-3 Par le transport	
1-2-1-3 Synthèse	
1-2-2 Mécanisme enzymatique	
1-2-3 Localisation et expression tissulaire	
1-2-4 Régulation et expression génique des GSTs	
2. Chez les invertébrés.....	p 66
2-1 Généralités	
2-2 Chez les helminthes	
2-2-1 Les enzymes anti-oxydantes chez les helminthes	
2-2-1-1 Origine des radicaux oxydants	
2-2-1-2 Mécanismes d'action des radicaux oxydants	
2-2-1-3 Les enzymes anti-oxydantes	

- 2-2-1-3-1 La superoxyde dismutase
- 2-2-1-3-2 La catalase
- 2-2-1-3-3 La cytochrome c peroxydase
- 2-2-1-3-4 Les enzymes dépendantes du glutathion
 - 2-2-1-3-4-1 Les glutathion peroxydases
 - 2-2-1-3-4-2 Les glutathion réductases
 - 2-2-1-3-4-3 Les glutathion-S-transférases
- 2-2-2 Variations d'activité des enzymes anti-oxydantes suivant le stade de développement du schistosome
- 2-2-3 Fonctions des GSTs chez les helminthes
 - 2-2-3-1 Détoxification des drogues
 - 2-2-3-2 Détoxification des produits des peroxydations lipidiques
 - 2-2-3-3 Détoxification passive et transport
 - 2-2-3-4 Synthèse
 - 2-2-3-5 Conclusion

RESULTATS-DISCUSSION p76

A. Etude de la forme minoritaire des GSTs de *S. mansoni* : la Sm26GST p78

Introduction

- 1- Etude de la forme minoritaire des GSTs de *S. mansoni* p79
 - 1-1 Caractérisation, clonage moléculaire et localisation tissulaire d'une glutathion-S-transférase de 26 kDa de *S. mansoni*. (Article 1)
 - 1-1-1 Caractérisation biochimique des GSTs de *S. mansoni*
 - 1-1-2 Obtention de la séquence complète du gène codant pour la Sm26GST
 - 1-1-3 Localisation ultrastructurale de la Sm26GST au stade adulte de *S. mansoni*
 - 1-2 Expression de la Sm26GST en *Escherichia coli*
 - 1-3. Exploration du pouvoir protecteur de la Sm26GST
 - 1-3-1 Dans le modèle expérimental du rat
 - 1-3-1-1 Protocoles expérimentaux
 - 1-3-1-2 Réduction de la charge parastaire
 - 1-3-1-3 Analyse de la réponse anticorps
 - 1-3-1-4 Conclusion
 - 1-3-2 Dans le modèle expérimental de la souris
 - 1-3-3 Conclusion
 - 1-4 Evaluation de la relation entre la Sm26GST et la SRP26
 - 1-4-1 Introduction
 - 1-4-2 Utilisation de l'anticorps monoclonal B48-14

1-4-2-1 Définition des principes et conditions expérimentales

1-4-2-2 Test d'inhibition

1-4-2-2-1 Etablissement de l'innocuité des antigènes

4-2-2-2 Contrôle du système et exemple de calcul

4-2-2-3 Effet inhibiteur de la Sm26GSTr sur l'activité cytotoxique du
de l'anticorps monoclonal B48-144-2-2-4 Effet inhibiteur de la Sm26GSTr sur l'activité cytotoxique du
sérum d'infection J42

4-2-2-5 Contrôles expérimentaux

4-2-2-5-1 Utilisation d'antigènes contrôles

4-2-2-5-2 Inactivation de l'activité enzymatique de la Sm26GSTr

1-4-3 Conclusion

2- Etude des GSTs de *S. mansoni* p 108.

2-1 Expression des SmGSTs au cours du cycle migratoire du schistosome

2-2 Etude comparative des localisations ultrastructurales des SmGSTs

2-3 Immunogénicité des SmGSTs au cours de l'infection expérimentale

2-3-1 De la Sm28GST

2-3-2 De la Sm26GST

2-4 Relation phylogénétique entre les SmGSTs et les GSTs de vertébrés et d'invertébrés

2-4-1 Comparaison entre la Sm28GST et la Sm26GST

2-4-2 Comparaison entre la Sm26GST et les GSTs de vertébrés et d'invertébrés

2-4-3 Comparaison entre la Sm28GST et les GSTs de vertébrés et d'invertébrés

3 Conclusion p119

**B. Etude comparative des glutathion-S-transférases chez les espèces majeures
de schistosome p 120****Introduction**1- Démonstration du pouvoir protecteur des GSTs de *S. bovis* chez des bovins infestés
par des cercaires de *S. bovis*.....p121

1-1 Protocole expérimental

1-2 Résultats

2- Variations interspécifiques des GSTs de 28 kDa de schistosome (Article 2) p 124

2-1 Caractérisation biochimique et analyse comparative des GSTs chez les quatre
espèces majeures de schistosome

2-2 Clonage moléculaire de la Sh28GST et de la Sb28GST

2-3 Définitions d'épitopes spécifiques d'espèces

3- Conclusion p 139

C. Contribution à l'élucidation de la structure tridimensionnelle d'une glutathion-S-transférase de 28 kDa de <i>S. mansoni</i>	141
--	------------

Introduction

1- Principes généraux de la cristallographie des biomolécules	p 142
1-1 Introduction	
1-2 Cristallogenèse et diffraction des rayons X	
1-3 Aspects physico-chimiques de la cristallogenèse	
2- Cristallisation et étude préliminaire de la diffraction aux rayons X de la Sm28GST ...	p144
(Article 3)	
2-1 Conditions expérimentales	
2-2 Résultats	
3- Elucidation de la structure 3D de la Sm28GST	p 152
3-1 Remplacement moléculaire	
3-2 Obtention d'un autre système cristallin	
3-2-1 Conditions de cristallisation employées	
3-2-2 Résultats	
3-3 Modélisation moléculaire	
3-4 Conclusion	

DISCUSSION-CONCLUSION	p 158
MATERIELS ET METHODES	p 172
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	p 179
TABLE DES MATIERES	p 205
FIGURES ET TABLEAUX	p 211

FIGURES ET TABLEAUX (PAGES)

- Figure 1.** Répartition géographique des schistosomiasis humaines (15)
- Figure 2.** Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni* (18)
- Figure 3.** Mécanismes effecteurs spécifiques dépendant d'anticorps avec coopération cellulaire contre les schistosomes (35)
- Figure 4.** Cycle d'oxydo-réduction des acides gras polyinsaturés et moyens de protection (68)
- Figure 5.** Expression, purification et analyse de la Sm26GSTR (92)
- Figure 6.** Comparaison entre le nombre de vers récoltés par perfusion dans les groupes de rats témoins et dans les groupes de rats immunisés par la Sm28SWAP ou la Sm26GSTR en présence d'alun (94)
- Figure 7.** Comparaison entre le nombre de vers récoltés par perfusion dans les groupes de rats témoins et dans les groupes de rats immunisés par la Sm28SWAP ou la Sm26GSTR en présence d'ACF (95)
- Figure 8.** Inhibition de la cytotoxicité induite par des macrophages en présence d'un sérum et de l'antigène contre lequel il est dirigé (100)
- Figure 9.** Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de la cytotoxicité induite par des macrophages en présence de l'anticorps monoclonal B48-14 en fonction de dose croissante de Sm26GST ajoutée dans le puits de culture (101)
- Figure 10.** Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de la cytotoxicité induite par des macrophages en présence de sérum d'infection J42 en fonction de dose croissante de Sm26GST ajoutée dans le puits de culture (102)
- Figure 11.** Pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité induite par des macrophages en présence de l'anticorps monoclonal B48-14 suivant la nature de l'antigène ajouté dans le puits (103)
- Figure 12.** Pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité induite par des macrophages en présence du sérum J42 suivant la nature de l'antigène ajouté dans le puits de culture (104)
- Figure 13.** Pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité induite par des macrophages en présence de l'anticorps monoclonal B48-14 suivant l'activité enzymatique de l'antigène ajouté dans le puits de culture (105)
- Figure 14.** Pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité induite par des macrophages en présence du sérum J42 suivant l'activité enzymatique de l'antigène ajouté dans le puits de culture (106)
- Figure 15.** Analyse comparative de l'expression des SmGSTs au cours du cycle migratoire du schistosome (109)
- Figure 16.** Cinétique de la réponse humorale vis-à-vis de la Sm28GST au cours de l'infection expérimentale par *S. mansoni* chez le rat Brown Norway (112)
- Figure 17.** Cinétique de la réponse humorale vis-à-vis de la Sm26GST au cours de l'infection expérimentale par *S. mansoni* chez le rat Brown Norway (114)
- Figure 18.** Comparaison des séquences polypeptidiques entre la Sm28GST et de la Sm26GST (115)

- Figure 19.** Comparaison des séquences polypeptidiques entre la Sm26GST, les GSTs d'helminthes et de vertébrés (117)
- Figure 20.** Mise en évidence d'acides aminés conservés entre les GSTs de schistosome et les GSTs de mammifère dans les régions 7-33, 63-91 et 152-163 (119)
- Figure 21.** Mise en évidence de communautés antigéniques entre les GSTs de schistosome (125)
- Figure 22.** Cliché de diffraction d'un cristal de Sm28GSTr obtenue sur le détecteur bidimensionnel du système FAST (146)
- Figure 23.** Morphologie des cristaux de Sm28GSTr en présence de S-hexylGSH suivant les conditions de cristallisation utilisées (147)
- Figure 24.** Morphologie des cristaux de Sm28GSTr en présence d'analogues du GSH suivant les conditions de cristallisation utilisées (157)
- Figure 25.** Représentation schématique des mécanismes effecteurs de la réponse immune dirigée contre les SmGSTs (168)
- Figure 26 .** Représentation schématique du dispositif de la goutte pendante (178)

- Tableau 1.** Molécules de schistosome dont les ADNc correspondants sont clonés (49)
- Tableau 2 .** Représentation des glutathion-S-transférases caractérisées chez les helminthes (71)
- Tableau 3 .** Mise en évidence de la diminution de l'excrétion fécale des oeufs chez des veaux immunisés par les GSTs de *S. bovis* (122)
- Tableau 4 .** Mise en évidence de la diminution de l'excrétion fécale des oeufs chez des veaux immunisés par les GSTs de *S. bovis* (123)
- Tableau 5 .** Mise en évidence des acides aminés variables dans la région 115-131 des GSTs de 28 kDa de schistosome et conséquences des mutations sur l'immunoréactivité des GSTs natives vis-à-vis de la sonde anticorps anti-115-131. (138)
- Tableau 6.** Comparaison des conditions physico-chimiques ayant conduit à la cristallisation des GSTs de mammifère (145)
- Tableau 7.** Comparaison des acides aminés impliqués dans le site de fixation du GSH d'une GST de classe π de mammifère avec les aa correspondants de GSTs de schistosome et de mammifère (155)

