

S
N° d'ordre :

50376

1995

241

**Université 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
Catherine Roche

**Caractérisation génétique et moléculaire d'une glutathion
peroxydase séléno-dépendante de *Schistosoma mansoni***

Présentée le 13 Octobre 1995

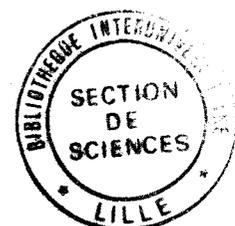
Membres du jury:



Président: Professeur A. Verbert

Rapporteurs: Docteur C. Slomiany
Docteur M. Maiorino

Examineurs: Professeur A. Capron
Docteur R.J. Pierce
Docteur M.F. Cesbron-Delauw



Je dédie ce travail à :

Jean,
pour son soutien et pour sa participation active
à la dactylographie,

Marine et Alice,
pour leurs propositions artistiques,

A toute ma famille,
pour ses encouragements
sincères

A Monsieur le Professeur Capron,

Vous m'avez accueillie avec bienveillance dans votre laboratoire. Vous m'avez permis de participer à un programme de recherche de grande qualité dont l'objectif humanitaire verra, je l'espère, son aboutissement très prochainement.

Que ce travail soit le témoignage de ma respectueuse admiration et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Verbert,

Vous avez accepté tout de suite de présider le jury de cette soutenance de thèse. Je vous en remercie vivement

A Madame le Docteur Maiorino,

Vos compétences scientifiques et votre enthousiasme ont largement permis d'enrichir ce travail de thèse. Je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité et c'est avec plaisir que je vous accueille parmi les membres de ce jury.

A Monsieur le Docteur Slomiany,

Vous avez accepté de juger ce travail. Je vous remercie sincèrement de l'intérêt porté à cette thèse ainsi que de votre présence dans ce jury.

A Madame le Docteur Cesbron-Delauw,

Tu as accepté Marie-France avec gentillesse de porter un jugement sur ce travail et c'est avec un grand plaisir que je te compte parmi les membres de ce jury. Je tiens à te remercier sincèrement.

A Monsieur le Docteur Pierce,

Je te remercie Raymond de m'avoir accueillie au sein du groupe que tu diriges. Tu m'as permis de découvrir le fascinant animal qu'est le schistosome et tu as suivi tout ce travail avec beaucoup d'attention. Je te remercie pour ces trois bonnes années.

Que cette thèse soit le témoignage de mon amitié et de ma reconnaissance.

Je voudrais également associer Madame Le Presle à ces remerciements

C'est avec grand plaisir que j'ai pu travailler avec toi Thérèse durant ces trois années. Ta compétence et ta gentillesse m'ont permis d'acquérir beaucoup de savoir-faire. Ta précieuse collaboration a été encourageante et gratifiante. Je te remercie pour tout. Sois assurée de ma sincère amitié.

J'adresse également mes plus vifs remerciements:

A Jamal Khalife ainsi qu'à Jocelyne Cornette, Claude Godin, Christine Pierrot, Nathalie Mielkareck, Hector Escriva-Garcia et Cécile Cocude pour leurs judicieux conseils et leur sympathie;

A Jinli Liu, Vincent Laudet, Hélène Gras-Masse, Eric Diesis, Jean-Pierre Kuznier, Jean-Loup Neyrinck, Didier Deslee, Catherine Vendeville, Anita Caron et Eliane Porchet pour leur précieuse collaboration;

A Christian Drolez et Daniel Lazarecki pour le support iconographique;

A Jacqueline Derick et Chantal Nzengani pour les recherches bibliographiques et leur disponibilité;

A Suzane Vanwingene, Monique Leroux et Jean-Pierre Gazet pour le matériel biologique.

Je tiens également à remercier tout le personnel des secrétariats ainsi que tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Ce travail a été accompli:

Au centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

INSERM U167

Institut Pasteur de Lille

Directeur: Pr. A. Capron

Et plus particulièrement dans le groupe de recherche
dirigé par le Dr. R.J. Pierce

Il a fait l'objet d'une collaboration avec:

Le service de Chimie des Biomolécules

CNRS-URA 1309

Institut Pasteur de Lille.

Dirigé par le Dr. A. TARTAR

Le laboratoire de Biochimie

Université de Padoue, Italie.

Dirigé par le Dr. M. Maiorino

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

Roche, C., Williams, D.L., Khalife, J., LePresle, T., Capron, A. and Pierce, R.J.
(1994) Cloning and caractérisation of the gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathion peroxidase. *Gene* 138, 149-152.

Maiorino, M., Roche, C., Flohé, L., Laudet, V., Capron, A. and Pierce, R.J.
(1995) Phospholipid hydroperoxide glutathion peroxidase of *Schistosoma mansoni*:: purification, characterization and molecular phylogeny. Manuscrit en préparation.

Roche, C., Liu, J.L., LePresle, T., Capron, A. and Pierce, R.J.
(1995) Phospholipid hydroperoxide glutathion peroxidase of *Schistosoma mansoni*: production using baculovirus, localization and stage-specific expression.
Mol. Biochem. Parasitol. Sous presse.

Poster

Pierce, R.J., Roche, C., Escriva, H., Wyls, V. and LePresle, T.
Schistosoma mansoni: des gènes au génome.
Colloque de Lille-ULB. Présenté le 30 mai 1995.

Sommaire

Abréviations.....	p 9
Résumé.....	p 10
Introduction.....	p 12
Le schistosome et la schistosomiase.....	p 19
Mécanismes de détoxification chez les helminthes.....	p 40
Les glutathions peroxydases.....	p 51
Résultats-Discussion.....	p 79
Discussion-Conclusion.....	p 156
Annexe technique.....	p 173
Références bibliographiques.....	p 181
Table des matières.....	p 198

Abréviations

ADNc :	Acide desoxyribonucléique complémentaire
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
CAT :	Catalase
CHP :	Cumène hydroperoxyde
D.O :	Densité optique
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPG :	Eggs per Gram (nombre d'oeufs fécaux par gramme de selle)
fDh :	formate déshydrogénase
GSH :	Glutathion
GSHpx :	Glutathion peroxydase
GSHred :	Glutathion réductase
GST :	Glutathion <i>S</i> -transférase
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
kDa :	Kilodalton
pb :	paire de bases
PCOOH :	Phospholipide hydroperoxyde
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PHGSHpx :	Phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase
PZQ :	Praziquantel
ROOH :	Hydroperoxyde
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
Se :	Sélénium
SeCys :	Sélénocystéine
Sm :	<i>Schistosoma mansoni</i>
Sm28 GST :	Glutathion <i>S</i> -transférase de 28 kDa de <i>Schistosoma mansoni</i>
SOD :	Superoxyde dismutase
s.u. :	sous unité
5' DI :	type I tétraiodothyronine 5' déiodinase
5' nc :	région 5' non codante d'un gène
3' nc :	région 3' non codante d'un gène

RESUME

S'inscrivant dans un vaste programme de développement vaccinal contre la bilharziose, notre travail de thèse s'est orienté vers l'étude génétique et moléculaire d'une glutathion peroxydase dépendante de sélénium chez *S.mansoni* (SmGSHpx).

Le clonage et la caractérisation du gène déterminant la synthèse de cette protéine révèle une organisation génomique similaire à celle décrite pour d'autres gènes de *S. mansoni*. La séquence nucléotidique montre la présence d'un codon TGA en phase de lecture déterminant l'incorporation d'une sélénocystéine (SeCys). La modélisation de la structure secondaire de la région 3' non codante du gène met en évidence une conformation en "tige et boucle" ainsi que des éléments de séquences nécessaires à la reconnaissance du codon "TGA-SeCys". La comparaison de la séquence du gène de la SmGSHpx avec celle déterminant la synthèse d'une phospholipide hydroperoxyde GSHpx (PHGSHpx) de porc révèle une alternance d'introns-exons très similaire et 55% d'identité entre les deux protéines. Cette constatation a ensuite orienté nos travaux suivant plusieurs axes:

Nous avons réalisé la caractérisation biochimique de deux activités GSHpxs dépendantes de sélénium chez *S. mansoni*. L'une présente un profil chromatographique et une spécificité de substrat semblables à la forme classique GSHpx-1 de mammifères. L'autre, plus abondante, présente un profil chromatographique et une spécificité de substrat similaire à la forme PHGSHpx de porc. La protéine présentant un profil PHGSHpx a été purifiée. Elle est reconnue en Western blot par des anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de la SmGSHpx clonée.

Le clonage et la caractérisation enzymatique de la SmGSHpx permettent la description d'une séléno-GSHpx pour la première fois chez les invertébrés. Une phylogénie moléculaire de la famille que représentent les GSHpxs a été réalisée. Cette étude permet de mettre en évidence une dichotomie initiale avant la séparation des eucaryotes et des procaryotes. La présence de GSHpxs ne présentant pas de SeCys est retrouvée au sein des deux principaux groupes. De plus, cette analyse révèle que le gène de la SmGSHpx est fortement apparenté à celui de la PHGSHpx de porc.

L'étude de l'expression de la SmGSHpx a été réalisée. *In vitro*, nous obtenons l'expression d'une protéine recombinante au sein de cellules d'insectes

(*Spodoptera frugiperda*), mais cette protéine est enzymatiquement inactive. *In vivo*, la localisation unique de la SmGSHpx au sein de l'appareil reproducteur de la femelle (cellules vitellines) a été mise en évidence par immuno-histochimie. Bien que l'ARNm spécifique soit présent à tous les stades de développement parasitaire étudiés, la protéine SmGSHpx n'est pas retrouvée par Western blot chez la cercaire. Les modalités de régulation post-transcriptionnelle sont discutées. Le séquençage de la région promotrice du gène de la SmGSHpx a montré des séquences monomériques connues pour la fixation du récepteur nucléaire de l'oestrogène. Cependant ces séquences sont connues fonctionnelles sous forme dimérique. Une approche dans l'analyse fonctionnelle de la région promotrice (par la technique de "gene reporter") conduit à peu de résultats positifs.

Par ailleurs, une étude préliminaire montre la possibilité d'un pouvoir immunogène de la SmGSHpx chez des parasités sénégalais. Elle semble donc représenter un antigène naturel dans la schistosomiase et encourage la poursuite de son étude physiologique et immunologique.

Introduction

Décrites pour la première fois en Egypte en 1951 par Théodore Bilharz, les bilharzioses humaines sont des parasitoses à transmission aquatique. On compte environ 200 millions de "bilharziens", ce qui indique l'importance mondiale de cette endémie parasitaire. Le nombre d'individus infectés est par ailleurs en expansion, du fait de modifications favorables du milieu et d'un accroissement des populations exposées. Souvent débilitante, la schistosomiase peut entraîner la mort à l'âge adulte (plus de 800.000 morts par an). Elle donne des lésions viscérales lentement progressives liées au dépôt d'œufs dans les tissus.

Chez l'homme, la bilharziose est due à 5 espèces de *Schistosoma* : *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* et *S. mekongi*. Elle sévit dans les régions où coexistent un climat tropical ou subtropical, des eaux de surface, un niveau socio-économique modeste et une certaine densité de population. Le début de l'extension des bilharzioses humaines date de la révolution agricole, dans la région du Proche-Orient appelée le Croissant Fertile. En effet, le remplacement des hommes "chasseurs-cueilleurs" par des "agriculteurs-éleveurs" a eu quatre conséquences favorables : l'augmentation des contacts avec l'eau, l'accroissement rapide de la population, la sédentarisation et les premières modifications des espaces naturels (Charmot et coll., 1993). On pense volontiers que le lieu d'apparition des schistosomiasés humaines dues à *S. mansoni* et *S. haematobium* est l'Afrique équatoriale et que le couloir du Nil aurait facilité leur dissémination (Farooq M., 1973). On a ainsi identifié des symptômes d'hématurie dans un papyrus de Kahun (1900 ans avant J. C.) et retrouvé des oeufs calcifiés dans les reins de momies égyptiennes vieilles de 5000 ans (Deelder et coll., 1990). La migration des Bantous durant les derniers siècles peut expliquer l'apparition de la maladie en Afrique du Sud.

L'implantation de la bilharziose dans l'hémisphère Ouest serait liée avec la migration d'esclaves au 16ème et 18ème siècle. Le rapport le plus ancien concernant la schistosomiase due à *S. japonicum* date de 1847. Celui-ci décrit la maladie chez les villageois de Katayama, dans la préfecture d'Hiroshima (Farooq M., 1973). Actuellement, les chiffres annoncés par l'Organisation Mondiale de la Santé démontrent que la bilharziose est endémique dans 76 pays. Les continents Africain, Sud-Américain et Asiatique sont les plus touchés (Fig 1).

Un élément capital dans la transmission de la maladie est la nature des contacts de l'homme avec l'eau puisqu'elle définit l'exposition au risque. Dans l'eau l'homme entretient le cycle, soit parce qu'après éclosion les œufs présents dans ses déjections infestent les mollusques (hôte intermédiaire), soit parce que lui-même s'infecte par les cercaires qui nagent à sa recherche. Mais les modifications anthropiques des milieux naturels jouent également un rôle épidémiologique essentiel. Ainsi, dans des régions favorables, la réalisation de grands projets d'aménagement hydrauliques agricoles a pu faciliter l'extension des bilharzioses ou favoriser leur apparition. C'est généralement le cas lorsqu'un entretien insuffisant permet une colonisation par les mollusques. Par exemple, l'aménagement du delta de la basse vallée du fleuve Sénégal, pour la culture de la canne à sucre, a bloqué la remontée d'eau salée et permis la multiplication du mollusque *Biomphalaria*. L'insuffisance des installations d'hygiène a facilité le développement explosif de la bilharziose intestinale à *S. mansoni*, jusque là inconnue. Ainsi à Richard-Toll, les premiers cas ont été dépistés en 1988, et 30 mois plus tard une prévalence de 60 % de la population de ce centre est atteinte (Talla et coll. 1992).

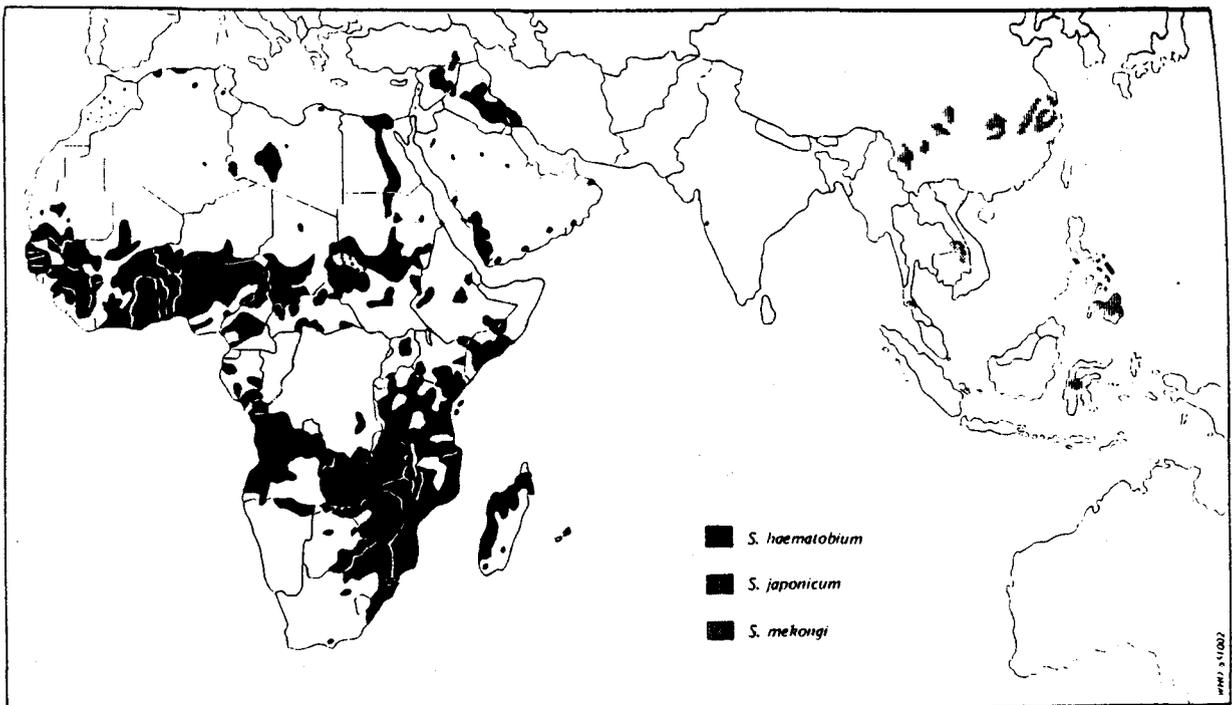
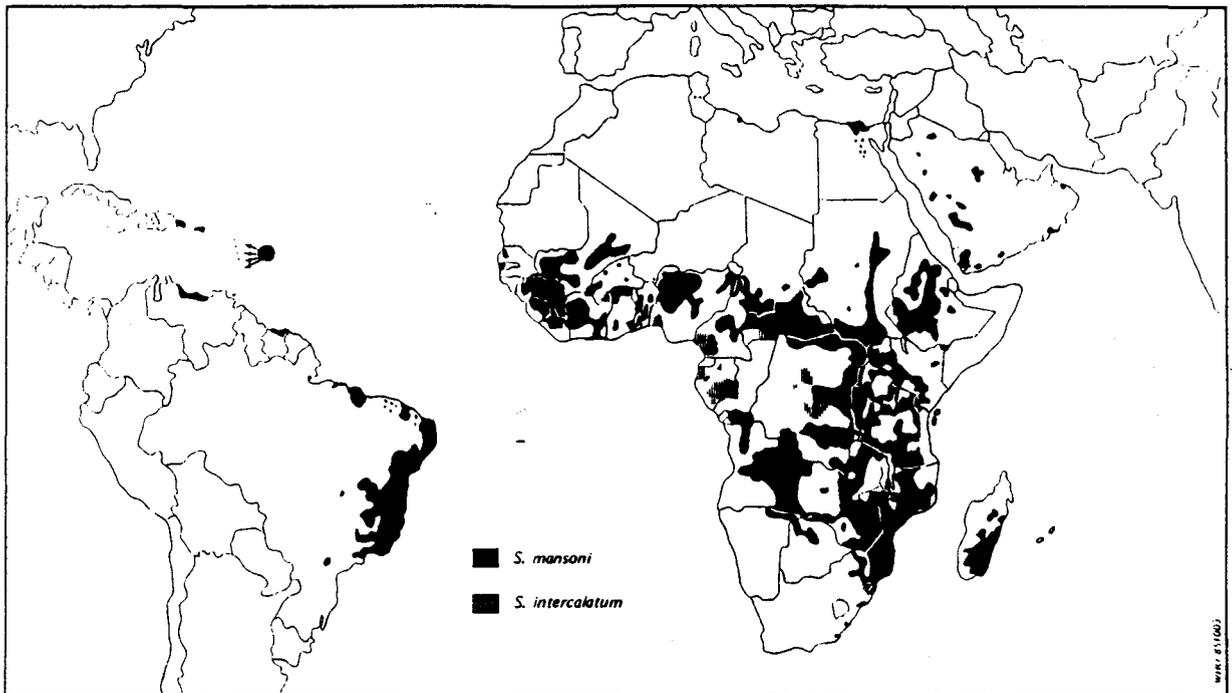


Fig. 1: Répartition géographique des schistosomiasis humaines

(d'après "Atlas de la répartition mondiale des schistosomiasis" O.M.S 1987)

Des programmes de lutte, institués depuis quelques années dans certains pays, ont cependant fait diminuer la prévalence, l'intensité moyenne d'infestation et donc la morbidité de la schistosomiase (Brésil, Martinique, Guadeloupe, Égypte, Chine). Mais ces programmes sont fort coûteux, difficiles à établir et en réévaluation permanente. En effet, la réussite du contrôle de l'endémie, soit par lutte contre les mollusques, soit par traitement sélectif ou collectif des parasités, dépend en grande partie d'une élévation du niveau de vie et du développement socioculturel des populations touchées. De plus, les médicaments de masse les plus actifs ne préviennent pas la réinfection chez les jeunes enfants et n'affectent guère la transmission. C'est pourquoi, les efforts de lutte actuels s'orientent vers une prophylaxie médicale visant l'élaboration d'un vaccin.

Deux constatations principales appuient cette démarche. Premièrement, des études épidémiologiques récentes ont maintenant clairement établi que l'immunité protectrice dans les populations humaines chroniquement exposées connaît un développement très lent. De plus, elle n'est guère exprimée avant la période pubertaire. Deuxièmement, les schistosomes ne se multiplient pas chez leurs hôtes vertébrés. Or il est admis sur la base d'études épidémiologiques et expérimentales qu'une réduction de l'ordre de 60 % de la population parasitaire résultant de l'infection réduirait sensiblement les manifestations pathologiques liées au dépôt des œufs dans les tissus (Capron A., 1993). Ainsi l'élaboration d'un vaccin qui conduirait à l'induction anticipée des mécanismes effecteurs permettrait de réduire le niveau de réinfection et la fécondité parasitaire. Les manifestations pathologiques et la transmission de la bilharziose en serait alors profondément affectées. De plus, cette démarche vaccinale contre la bilharziose semble représenter la méthode de contrôle la mieux adaptée aux systèmes économiques et de santé des pays endémiques.

Les enzymes antioxydantes jouent un rôle crucial dans la survie du parasite durant sa migration à travers les tissus de son hôte définitif. Dans la recherche d'un vaccin contre les helminthes, beaucoup d'efforts se sont orientés vers la caractérisation d'enzymes supposées être impliquées dans la protection du parasite contre les radicaux libres dérivés du métabolisme oxydatif de l'hôte (Mitchell G. F., 1989). 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 de *S. mansoni* à activité glutathion *S*-transférase (Sm28 GST) (Balloul et coll., 1985; Pierce et coll., 1990).

Dans l'optique d'augmenter l'efficacité d'un vaccin basé sur cette molécule Sm28 GST, le laboratoire s'est attaché à la caractérisation d'autres enzymes antioxydantes glutathion dépendantes. Dans notre laboratoire, le clonage et le séquençage de l'ADNc codant pour une sélénoprotéine glutathion peroxydase (GSHpx), ont été réalisés (Williams et coll., 1992).

Sur la base de ces informations, nous nous sommes attachés à l'étude plus précise de la GSHpx clonée de *S. mansoni* dont les résultats sont exposés suivant trois chapitres principaux:

- Dans un premier temps, nous avons axé nos travaux sur le clonage et la caractérisation du gène de la glutathion peroxydase de *S. mansoni* afin d'établir la structure et les mécanismes régulateurs de l'expression de ce gène.

- Ensuite, nous nous sommes attachés à la caractérisation enzymatique et à la purification de la protéine native.

- Puis, nous nous sommes également attachés à la production de la protéine recombinante en système eucaryote, au contrôle de son expression au cours du

développement du parasite et à sa localisation. Dans le cadre de cette étude, nous avons réalisé une approche fonctionnelle de la région promotrice du gène de la GSHpx étudiée.

Nous avons également réalisé les travaux suivants:

- Nous avons établi une phylogénie de la "super-famille" des GSHpxs à partir de toutes les séquences actuellement disponibles;
- Nous avons exploré le pouvoir potentiellement immunogène d'un peptide de synthèse dirigé contre l'extrémité C-terminale de la GSHpx étudiée.

Auparavant, il nous a semblé important d'exposer quelques généralités concernant le schistosome, la pathologie et les stratégies de lutte contre la bilharziose. Ensuite, les mécanismes de défense de ce parasite impliquant les enzymes de détoxification seront explicités. Enfin, nous exposerons les connaissances actuelles et les particularités des GSHpxs.

Le schistosome et la schistosomiase

Les schistosomes, agents des bilharzioses, sont des parasites originaux dont la biologie est de mieux en mieux connue grâce aux recherches effectuées depuis le début des années 80. Adultes, les schistosomes mâles et femelles sont de petits organismes allongés (environ 1 cm), vivant dans l'appareil circulatoire de vertébrés.

A) Place dans le règne animal et taxonomie

Les schistosomes sont des métazoaires que les taxinomistes rangent dans l'embranchement des plathelminthes, la classe des trématodes, la famille des *Schistosomatidæ*, le genre *Schistosoma*. La classification est basée sur la morphologie des œufs (éperon latéral, terminal ou rudimentaire) ou sur le spectre d'infectivité. On distingue cinq espèces de *Schistosoma* capables d'effectuer un développement complet chez l'homme: *S. hæmatobium*, *S. intercalatum*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* (Rollinson et coll., 1987).

B) Cycle évolutif

Le schistosome utilise un hôte définitif vertébré et un hôte intermédiaire mollusque aquatique (Fig. 2). Pour les trois principales espèces de larves infectant l'homme (*S. mansoni*, *S. hæmatobium*, et *S. japonicum*) le mollusque est spécifique (*Biomphalaria*, *Bulinus* et *Oncomelania*). Les œufs sont évacués par les selles ou l'urine des parasités. Dans l'eau, les œufs éclos libèrent des larves ciliées : les miracidiums. Dans le mollusque se produit une multiplication asexuée du parasite : le miracidium se transforme en sporocyste primaire et va bourgeonner en sporocystes secondaires. La pérennité du cycle est assurée par la transformation des sporocystes en cercaires. On considère qu'un seul miracidium

ayant pénétré chez le mollusque peut donner naissance, sur une durée de quelques semaines, à 100 à 200.000 larves infestantes. Libérées aux heures chaudes de la journée (Nojima et coll., 1982), les cercaires, pourvues d'une queue bifide et vibrante, nagent alors activement à la rencontre d'une cible adaptée. Par passage à travers la peau, les cercaires perdent leur partie caudale et se transforment en schistosomules. Le schistosomule pénètre rapidement dans une veine ou un vaisseau lymphatique, mais se trouve en un point quelconque du corps, bien loin du site qu'il doit atteindre (plexus veineux périspécral s'il s'agit de *S. hæmatobium*, péri-intestinal pour les autres). L'étonnante migration des schistosomes par voie circulatoire dans l'organisme de l'hôte définitif va alors commencer : emporté par le flux sanguin, le schistosomule néoformé se retrouve rapidement dans le cœur droit, où il est projeté vers les poumons via les artères pulmonaires. Là, se produit un premier arrêt, car le diamètre du parasite ne lui permet pas de franchir les capillaires (Fig. 3 à gauche). Mais en quelques jours, le schistosomule se métamorphose en un organisme beaucoup plus filiforme, qui franchit les capillaires et est à nouveau emporté par le flot sanguin via les veines pulmonaires vers le cœur gauche. Commencent alors plusieurs "tours d'homme" (Fig. 3 au centre). Ce n'est que s'il arrive au niveau du foie, via les artères mésentériques et la veine porte, que le schistosomule s'arrête (on ignore encore pourquoi et comment). A ce stade, le jeune parasite va subir un profond remaniement structural et physiologique (Torpier et coll., 1977) : il va se nourrir, grossir et se différencier en mâle ou en femelle et s'accoupler. Il ne reste au mâle, portant sa femelle, qu'à remonter à contre courant la veine porte pour aller se nicher sur son lieu de ponte (Fig. 3 à droite). Les schistosomes adultes vivent alors accouplés dans les capillaires d'organes creux, particulièrement le long du tube digestif (*S. mansoni*, *S. japonicum*) ou autour du système urogénital (*S. hæmatobium*).

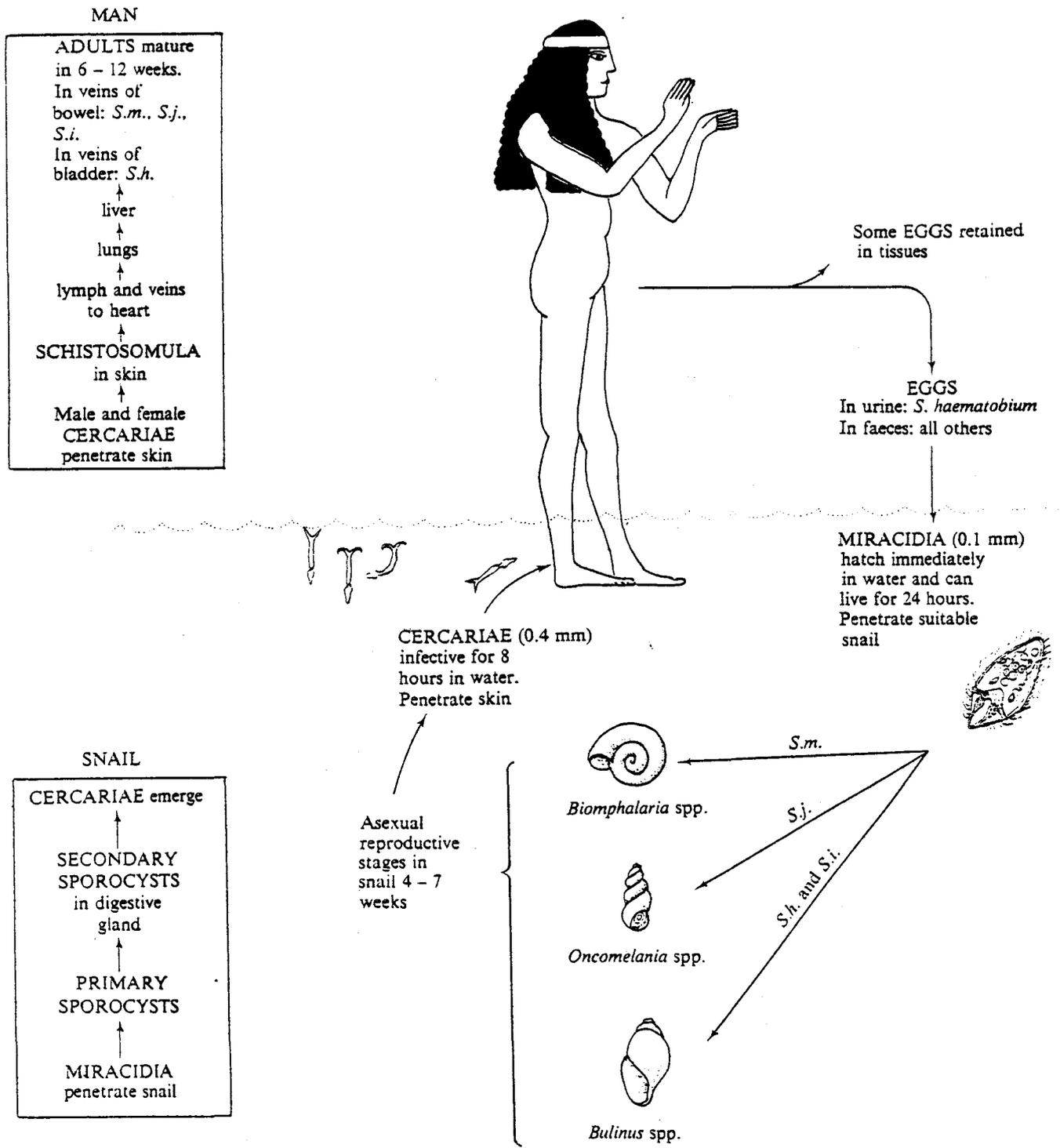


Fig. 2: Schistosomiasis humaines- cycle évolutif

(d'après "Worms and disease", R.Muller-Ed Heinemann/ Medical Books Ltd. 1975)

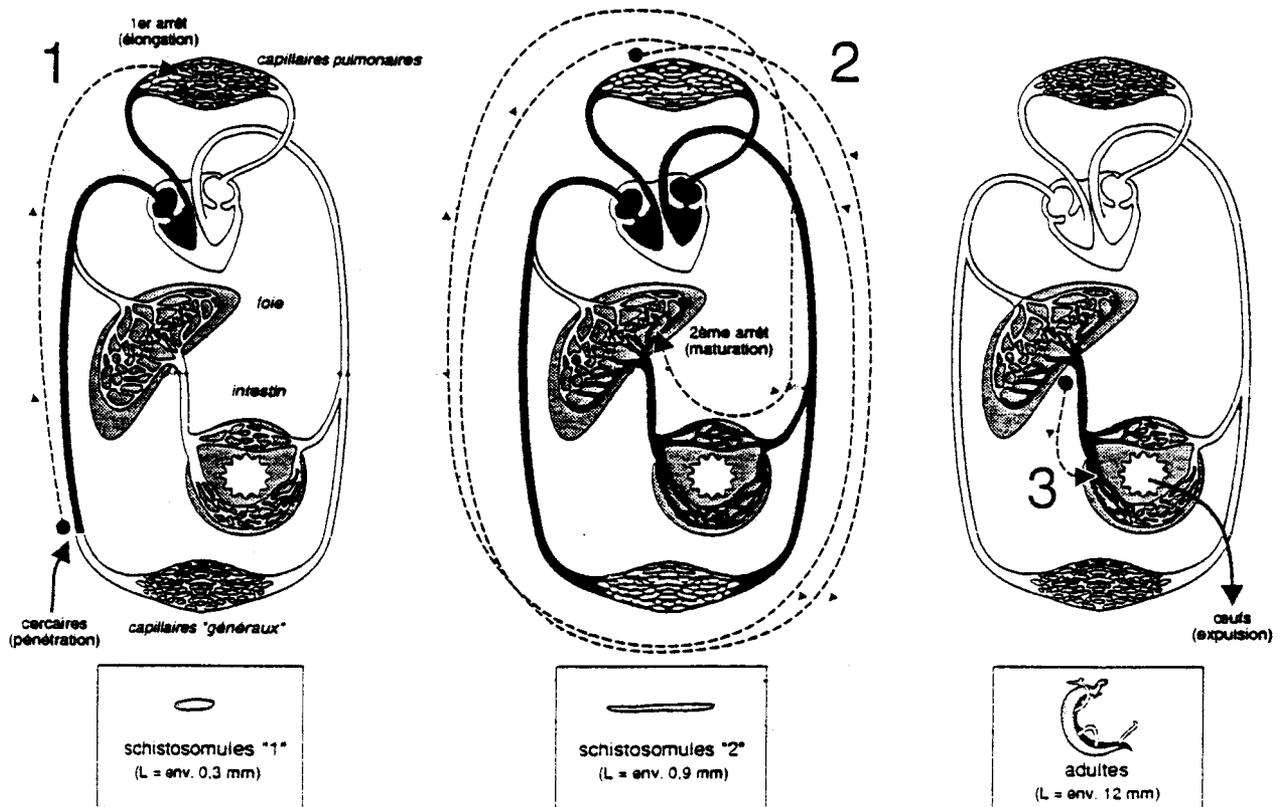


Fig. 3: L'étonnante migration des schistosomes par voie circulatoire dans l'organisme des vertébrés, consécutive à la pénétration transcutanée des cercaires :

1. du lieu de pénétration aux poumons ;
2. des poumons au foie ;
3. du foie à la région péri-intestinale (à contre-courant).

Dans cette figure, les schistosomules avant et après la métamorphose au niveau des poumons sont désignés respectivement sous le nom de schistosomules « 1 » et « 2 ». Le dessin ne représente pas l'anatomie réelle des vaisseaux, notamment au niveau du système veineux mésentérique-porte hépatique. La migration est décrite d'après les travaux réalisés sur le développement de *S. mansoni*, chez la souris.

(d'après C. Combes. La revue du praticien (Paris) 1993, 43, p 412)

C) Biologie du Schistosome

Bien que le schistosome soit capable dans certaines conditions d'hermaphroditisme (Bach et coll., 1990) ou de parthénogenèse (Bach et coll., 1984), la description qui suit concerne la biologie d'un couple de vers adultes accouplés (Fig. 4). Le mâle, long de 5 à 11 mm, présente une ventouse buccale débouchant sur un canal alimentaire. Une deuxième ventouse est impliquée dans l'attachement aux parois des vaisseaux. Une large rainure ventrale bardée d'épines, dite canal gynécophore, retient la femelle accouplée. La surface externe (tégument), largement développée chez le mâle, est caractérisée par d'abondantes papilles. Elle est assimilée à une membrane cytoplasmique contenant mitochondries, corps de sécrétion et organes sensitifs (Erasmus et coll., 1987). Le tégument participe à l'absorption de certains nutriments solubles et à l'excrétion de déchets toxiques. Le système de reproduction du mâle est constitué de 7 à 8 testicules situés au niveau dorsal.

La femelle, plus longue (jusqu'à 20 mm) et plus fine que le mâle, possède également une ventouse buccale. Hématophage, la femelle consomme environ 1,5 millions d'hématies par jour. Les produits du catabolisme de l'hémoglobine représentent le pool principal d'acides aminés disponibles pour la néosynthèse. Le système de reproduction de la femelle est constitué d'un ovaire en forme de poire débouchant dans un oviducte et de nombreuses glandes vitellines se déversant dans un canal vitellin. Ces deux canaux arrivent dans l'ootype, chambre dans laquelle l'œuf est élaboré à partir de l'ovocyte fécondé, de cellules vitellines et des produits issus des glandes de Mehlis. Sur sa face antérieure, l'ootype débouche dans l'utérus ventral (Fig. 5).

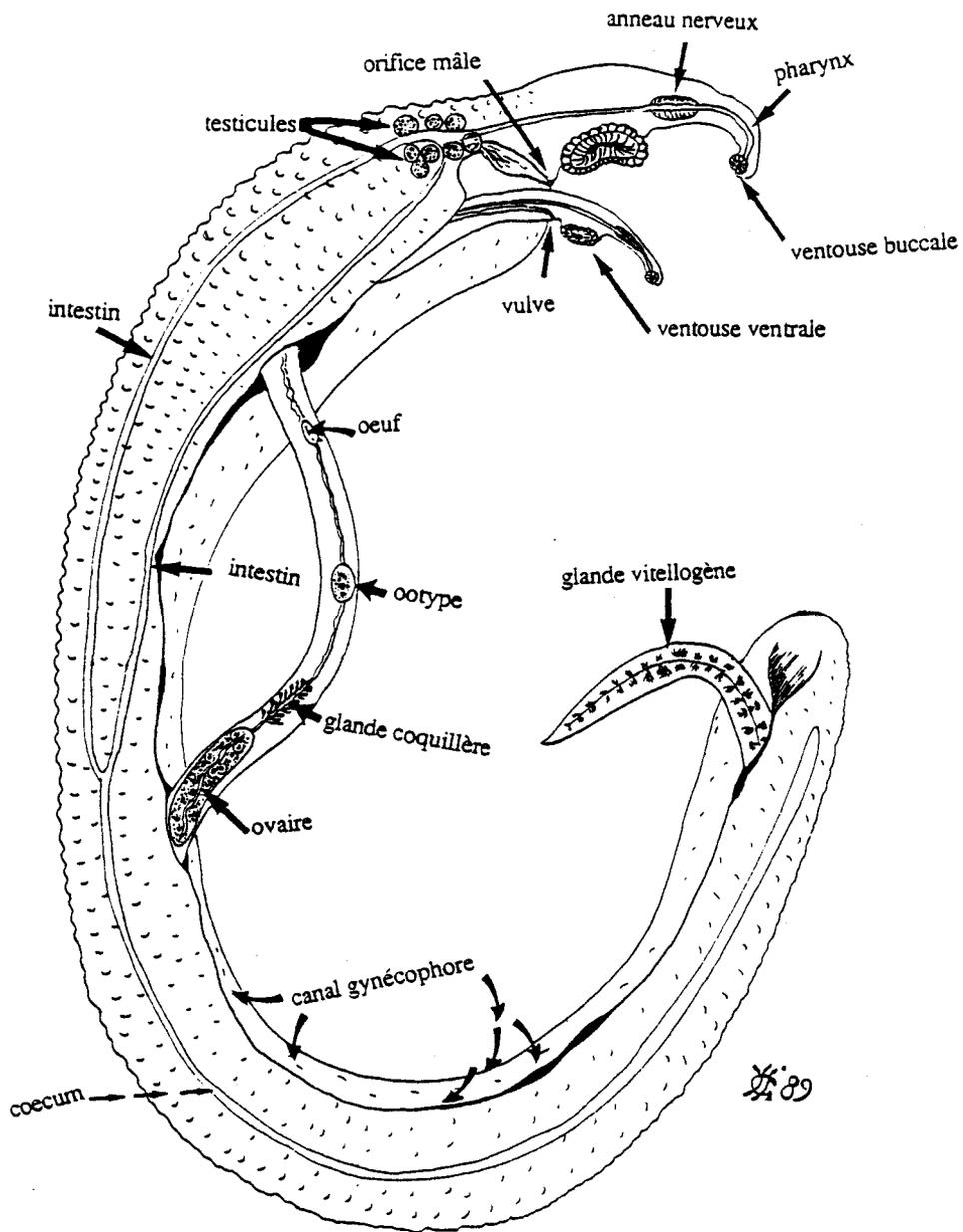


Fig. 4: ANATOMIE SCHEMATIQUE d'un COUPLE de SCHISTOSOMES

(d'après "Atlas de parasitologie", Y.Golvan- Ed. Le Léopard d'Or)

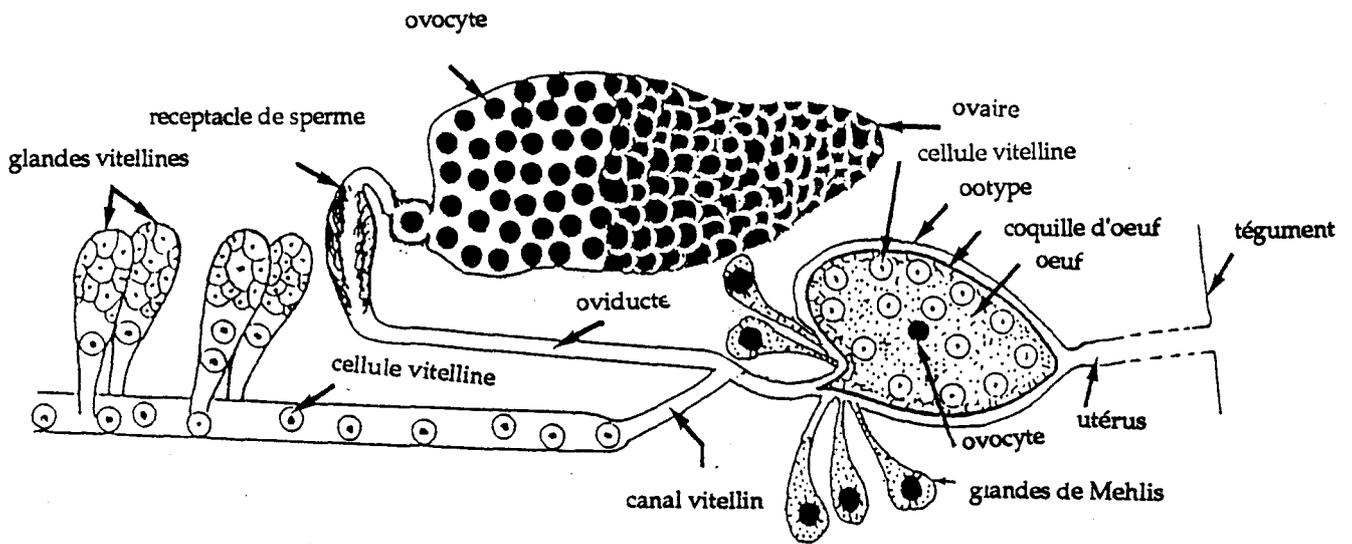


Fig .5: Schéma de l'appareil reproducteur de femelle de *S.mansoni*

(d'après E.Porchet et coll., Parasitology (1994), 109, p 570)

Il faut cependant noter qu'il existe de grandes différences dans la morphologie des femelles, selon qu'elles sont accouplées ou non. En effet, les femelles isolées demeurent, contrairement aux mâles, de petite taille et sont incapables de parvenir à maturité sexuelle (Bach et coll., 1984). De même, des femelles matures et fertiles dégénèrent rapidement mais de façon réversible si elles sont transplantées seules chez un nouvel hôte. Le mâle n'a besoin, ni d'être fertile, ni d'être de la même espèce, pour induire la maturation des femelles (Erasmus, D. A., 1987). On ne sait actuellement pas si cette maturation est due à une réponse à un messager chimique ou à un massage exercé par les muscles du canal gynécophore du mâle.

D) Génétique du Schistosome

Le génome nucléaire du schistosome comprend environ $2,7 \cdot 10^8$ paires de bases (Simpson et coll., 1982) et est particulièrement riche en bases A et T (66 %). On estime que le nombre de gènes, répartis sur 8 paires de chromosomes, est voisin de 15.000. Le sexe est déterminé par des chromosomes sexuels, le mâle étant homogamétique ZZ et la femelle hétérogamétique WZ.

Les connaissances sur le génome du schistosome sont encore assez restreintes et fragmentaires. En ce qui concerne la structure de certains gènes, la présence de très petits introns (entre 30 et 51 paires de bases) à l'extrémité 5' est décrite chez *S. mansoni*. On peut ainsi citer ceux codants pour: la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Charrier-Ferrara et coll., 1992), l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRF)(Craig et coll., 1989), l' α -tubuline (Duvaux-Miret et coll., 1991), un récepteur de facteur de croissance (Shoemaker et coll., 1992), une protéine membranaire de 23 kDa (Lee et coll., 1995), la triose phosphate isomérase (Reis et coll., 1993) et la glutathion

peroxydase (Roche et coll., 1994). On note également l'existence d'introns de grande taille (plus de 3 Kpb) dans les gènes codant pour la glutathion peroxydase (Roche et coll., 1994), l'HGPRT (Craig et coll., 1989) et pour la glutathion S-transférase Sm28 (Mc Nair et coll., 1993). A l'inverse, d'autres gènes, tels que les gènes codants pour des protéines de la coquille d'œufs (Henkle et coll., 1990; Bobek et coll., 1988 et 1989) ne possèdent aucun intron. Bien que les petits introns décrits ne présentent pas une séquence de 11 pyrimidines successives nécessaires au mécanisme d'épissage généralement décrit chez les eucaryotes, les séquences consensus de jonction (GT en 5' et AG en 3') existent cependant. L'édition des ARN après épissage de ces petits introns doit donc être réalisée normalement. Des mécanismes d'épissage alternatifs ont été rapportés (Davis et coll., 1988; Shoemaker et coll., 1992) ainsi que des mécanismes d'épissage en *trans*. On a en effet trouvé l'existence de petites séquences "leader" de 36 nucléotides en 5' présentes sur de nombreux transcrits polyadénylés (Rajkovic et coll., 1990). Deux auteurs (Davis et coll., 1988; Shoemaker, C.B., 1994) ont également rapporté l'existence de messagers d'un même gène de tailles différentes résultant d'une initiation de la transcription à deux sites différents. C'est notamment le cas pour le gène de la phosphatase-kinase (PK) dont la présence de deux sites d'initiation de la transcription suggèrent que la structure hétérodimérique de la PK est consécutive de la fusion de 2 gènes primaires (Shoemaker, C.B., 1994).

On connaît à l'heure actuelle de nombreuses informations concernant l'existence de gènes dont l'expression est spécifique du sexe et/ou de l'état de développement du ver (Knight et coll., 1984; Simpson et coll., 1986; Stein et coll., 1986; Bobek et coll., 1987; Davis et coll., 1988). Aucune base méthylée n'a pu être détectée dans l'ADN de *S. mansoni*, mais cependant un déficit de séquences CpG et un surplus de séquences TpG a été démontré (Musto et coll.,

1994). Ce résultat permet de faire l'hypothèse selon laquelle une méthylation ancestrale serait responsable de ces biais. Par ailleurs, on retrouve des séquences riches en C et G en amont du gène de la GSHpx de *S. mansoni*, laissant suggérer des îlots CpG non méthylés au sein du génome du schistosome.

Les régions promotrices de plusieurs gènes ont montré des séquences homologues à des motifs de reconnaissance de plusieurs facteurs agissant en *trans*. Il s'agit du gène de la Gp22 (El Sherbeini et coll., 1991), de la hsp 70 (Neumann et coll., 1992), de la protéine de la coquille d'oeuf (Bobek et coll., 1988; Henkle et coll., 1990), de la calréticuline (Khalife et coll., 1995), d'un gène spécifique du stade de développement F10 (Gianinni et coll., 1995) et du gène de la Sm28 GST (Zenzoumi et coll., 1995).

Plusieurs séquences répétées ont également été décrites. Il s'agit chez *S. mansoni* de séquences de type transposon appartenant à une famille d'éléments de séquences courtes, répétées 7000 à 10.000 fois par génome haploïde, appelée SM α (Spotila et coll., 1989). Récemment, un rétrotransposon apparenté à la famille Gypsy TY3 a été mis en évidence chez *S. mansoni* (Pierce, communication personnelle). Des séquences répétées en tandem de 81 pb ont été décrites au sein de transcrits dont l'expression est régulée au cours du développement du parasite (Davis et coll., 1988). Des séquences répétées hautement polymorphes mises en évidence au sein de l'ARN ribosomal permettent l'identification de sous-populations de vers d'une même espèce réparties à des endroits géographiques différents (Hamburger et coll., 1991; Ali et coll., 1991; Minchella et coll., 1994). Ces séquences polymorphes permettent aussi l'identification de souches différentes coexistantes dans une même région (Spotila et coll., 1991). L'analyse du génome mitochondrial de *S. mansoni* a conduit à l'identification d'un surprenant polymorphisme de longueur (de 16.600 à 21.300 paires de bases)(Després et coll., 1991) et représente un bon marqueur

moléculaire de l'évolution, spécialement au sein d'espèces très voisines. Ainsi, l'analyse de l'ADN mitochondrial a permis à Després et ses collaborateurs d'établir la preuve de l'introduction récente de *S. mansoni* en Amérique (Després et coll., 1993).

Au niveau chromosomique, de remaniements ont été décrits au cours du développement de *S. mansoni* entre les stades œuf et adulte (Nara et coll., 1990).

Dans le but de comprendre l'évolution et le contrôle génétique de l'infectivité, la pathogénicité et la résistance du schistosome, plusieurs équipes envisagent d'établir la carte physique et le décryptage du génome du parasite. Une première étape a été réalisée par Tanaka et ses collaborateurs en établissant une librairie de clones YAC (Yeast Artificial Chromosomes) à partir de l'ADN de cercaires. Tanaka a également localisé une centaine de ces clones YAC sur les chromosomes (Tanaka et coll., 1995). La Fig. 6 donne un aperçu général de l'état d'avancement de ces recherches. L'établissement d'une collaboration internationale devrait permettre de constituer une banque de séquences EST (Expressed Sequence Tags) à partir du séquençage massif de banques d'ADNc. La localisation, par criblage de la banque YAC, de ces marqueurs EST ainsi que des gènes déjà décrits est prévue. Cette collaboration devrait permettre également de développer d'autres banques de grands fragments (banque de cosmides). A l'échelle de notre laboratoire, l'étude des séquences promotrices de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes et/ou des protéines de stress; la caractérisation de l'environnement génomique de ces gènes ainsi que la localisation sur les chromosomes des gènes étudiés devraient fournir des renseignements intéressants sur l'organisation générale du génome du schistosome.

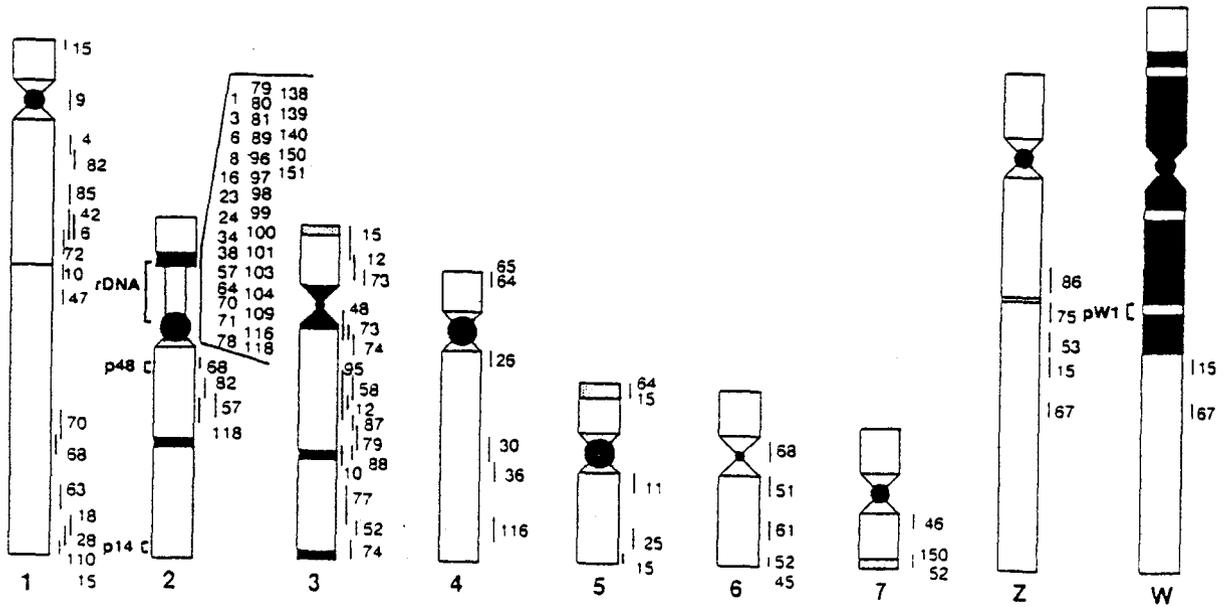


Fig. 6: Représentation schématique des chromosomes de *S.mansoni*

Les régions noircies correspondent aux bandes C. Les régions en pointillés correspondent aux bandes C légèrement marquées. L'idiogramme illustre la distribution des fragments YACs sur les chromosomes.

(d'après Tanaka et coll., Mol.Biochem.Parasitol.1995, 69,p 48)

E) Pathologie

Les manifestations pathologiques d'une infection à *S. mansoni* présentent des degrés d'intensité variables, suivant qu'il s'agit d'une primo-infection, suivant l'importance de la charge parasitaire et suivant les prédispositions génétiques de l'individu infecté (Dessein et coll., 1992). Le dépôt des œufs dans les tissus est en grande partie à l'origine des troubles. Les formes sévères sont relativement rares en zone d'endémie ancienne. La pré-sensibilisation des jeunes enfants aux antigènes bilharziens par le placenta ou le lait maternel est une raison avancée pour expliquer cette constatation.

Le premier symptôme qui apparaît chez le sujet vierge d'immunisation est la "dermatite du nageur", éruption illustrant localement la pénétration cutanée de la cercaire. La phase d'invasion s'étale ensuite pendant 2 à 3 mois jusqu'à la ponte des premiers œufs. Elle se traduit par un état fébrile, une hyperthermie, des diarrhées, de la toux, des éruptions cutanées et une hyperéosinophilie sanguine. La phase d'état est caractérisée par l'installation des vers adultes dans leur site définitif et la ponte des œufs dans les tissus, entraînant une réponse granulomateuse (Bourré et coll., 1993). L'évolution progressive de cette fibrose est à l'origine d'une hypertension portale et d'une cirrhose hépatique. Une circulation collatérale se développe, avec l'apparition de varices œsophagiennes dont la rupture peut conduire à un pronostic fatal (hémorragie digestive). Dans la forme chronique de la maladie, les réponses cellulaires du système immunitaire persistent sous forme atténuée et engendrent des perturbations métaboliques et physiologiques chez le patient, pouvant aboutir à des pathologies associées (par exemple cancer de la vessie pour *S. hæmatobium*) (Mostafa et coll., 1995).

F) Diagnostic

En ce qui concerne l'établissement d'un diagnostic sur le terrain, l'examen parasitologique des selles est simple à réaliser, mais l'absence d'œufs ne permet pas d'éliminer le diagnostic. C'est pourquoi, son affirmation reste basée sur des arguments clinico-biologiques (symptomatologie et modification des constantes sanguines), des examens immunologiques tels que la recherche d'anticorps (les antigènes les plus utilisés pour leur fiabilité sont dérivés de l'œuf), la recherche d'antigènes circulants ou la recherche de complexes immuns. L'imagerie médicale (échographie, cystoscopie) permet la détection des remaniements hépatiques ou vésicaux. Mais l'absence d'infrastructures locales et le coût élevé de ces techniques limitent leur usage.

G) Lutte contre les schistosomiasés

Comme toutes les maladies liées à l'environnement d'où l'homme tire ses ressources, les schistosomiasés sont difficiles à combattre et les objectifs de lutte doivent tenir compte du nombre de malades concernés, de la durée du programme et des moyens disponibles selon les actions et la politique de santé du pays concerné.

1- Traitement de masse et traitements ciblés

Les bilharzioses n'ont jamais été faciles à traiter car les premiers médicaments ont souvent été très toxiques et peu efficaces. Le niridazole a représenté en son temps un indéniable progrès. Il est maintenant largement supplanté et a disparu de la liste des médicaments essentiels. Le traitement actuel des bilharzioses fait essentiellement appel au praziquantel (PZQ) ou à

l'oxamniquine.

Actif sur toutes les espèces de schistosomes, le PZQ tue rapidement les vers adultes par action directe sur la cuticule puis sur la musculature. Toutefois, *in vivo* son action dépend d'une réponse immunitaire préexistante vis-à-vis du parasite (Doenhoff et coll., 1987; Brindley et coll., 1990). Cette réponse immune est dirigée contre des antigènes démasquées par l'action du PZQ (Fallon et coll., 1992). Il agit aussi, à un moindre degré, sur les schistosomes et sur les œufs en transit dans les tissus (Picot et coll., 1993). Excellent schistosomicide, actif en prise unique et bien toléré, le PZQ est cependant d'un prix élevé, ce qui en interdit l'emploi en médecine de masse en zone endémique. De plus, il ne prévient pas les réinfections et diminue l'immunité acquise (Moloney et coll., 1987).

L'oxamniquine est la deuxième molécule retenue actuellement pour le traitement de la bilharziose. Cette molécule paralyse la musculature du ver, provoque son reflux dans la circulation portale intra-hépatique où les mâles sont détruits. Les femelles semblent survivre mais cessent de pondre. Contrairement au PZQ, l'oxamniquine a un coût quatre fois moins élevé. Des traitements de masse ont été réalisés, notamment dans les îles des Caraïbes anglophones et au Brésil (Picot et coll., 1993). Dans ces régions, la distribution répétée d'oxamniquine a été l'élément principal responsable de la réduction de la prévalence et de la transmission de la maladie. Mais cette molécule n'est cependant active que sur *S. mansoni*.

Résistance aux schistosomicides

Le risque majeur d'un programme de lutte basé sur la thérapie médicamenteuse est l'apparition de populations de schistosomes présentant des phénomènes de résistance aux produits utilisés. Ainsi, le développement de

résistance chez *S. mansoni* a été rapporté de façon expérimentale. En effet, Brindley et collaborateurs (1989) ont décrit l'apparition d'un phénotype résistant d'une souche de *S. mansoni* Portoricaine vis à vis de l'hycanthane (un composé dont le mode d'action est similaire à celui de l'oxamniquine). Ce phénotype résistant est associé à un changement dans le polymorphisme de restriction de la souche utilisée, et non à la sélection d'un phénotype résistant à l'hycanthane pré-existant (Brindley et coll., 1989). Une autre souche de laboratoire, régulièrement exposée au PZQ, présente également une résistance (Fallon et coll., 1994). Des phénomènes de résistance ont également été rapportés vis à vis de l'oxamniquine au Brésil et au Kenya (Davis et coll., 1993). Tout récemment, l'existence d'une souche de *S. mansoni* à Richard Toll présentant un phénomène de résistance au PZQ (Doenhoff et Fallon, communications personnelles) a été décrite.

2-Education sanitaire et assainissement

La prophylaxie sanitaire a pour but de limiter les contaminations de l'eau par les excréta. Mais on ne peut éviter les comportements néfastes que s'il existe des puits, des pompes en état de marche, des ponts et passerelles, des lavoirs judicieusement situés. De plus, l'éducation sanitaire est malheureusement souvent difficile et n'induit pas toujours un changement de comportements.

3- La lutte contre les mollusques

Pendant des décennies, malgré sa toxicité, le sulfate de cuivre a été le produit le plus utilisé pour l'élimination des mollusques (Picot et coll., 1993). Un seul molluscicide de synthèse est actuellement disponible sur le marché, le niclosamide. A cause de son coût et des difficultés d'obtenir une dilution efficace

aux divers points d'un cours d'eau, son usage est réservé aux petites étendues d'eau. Les essais de lutte biologique par l'introduction d'un compétiteur a donné de bon résultats. C'est le cas par exemple en Martinique et en Guyane où l'introduction de *Biomphalaria straminea*, incompatible avec *S. mansoni*, a chassé *B. glabrata* (Picot et coll., 1993).

4- Prophylaxie médicale

Devant les difficultés d'établir et de maintenir un programme de lutte efficace contre les bilharzioses, la démarche actuelle est essentiellement dirigée vers l'élaboration d'un vaccin. Cette immunisation doit permettre de réduire le niveau de ré-infection et la fécondité parasitaire. Cela conduirait à une diminution de la morbidité, des formes aiguës de la maladie et permettrait aussi un contrôle de la transmission.

Plusieurs stratégies ont été établies. Elles ont permis un progrès dans la compréhension des manifestations pathologiques et dans l'identification des mécanismes protecteurs et régulateurs de l'immunité.

Ces stratégies sont au nombre de cinq :

- les infestations inter-spécifiques qui suggèrent l'existence d'antigènes communs entre les espèces de schistosomes (Taylor et coll., 1975);
- l'infestation par des larves atténuées, dans le cadre de l'établissement d'un vaccin vivant (Minard et coll., 1978; Bickle et coll., 1979; Taylor et coll.; 1986);
- l'injection avec ou sans adjuvants, de préparations d'antigènes brutes à partir d'œufs (SEA, Soluble Egg Antigen) ou à partir de vers adultes (SWAP, Soluble Worm Antigen Preparation);

- l'immunisation avec des antigènes purifiés. Ces antigènes ont été obtenus à partir de sondes anticorps poly et monospécifiques capables d'induire une cytotoxicité *in vitro* et de conférer une protection par transfert passif. Le tableau qui suit reprend les principaux antigènes utilisés dans cette stratégie:

Antigènes obtenus	Nature de l'anticorps utilisé	Références
Molécules de 53 kDa et 155 kDa	Ac monoclonal	Smith et coll., 1985
Complexe antigénique 200 kDa	Ac monoclonal	Hazdai et Coll., 1985
Molécule de 38 kDa, KLH-like		Dissous et coll., 1986
		Grzych et coll., 1987
	Ac monoclonal IgG2a	Grzych et coll., 1982
	Ac anti-idiotype	Grzych et coll., 1985
Produits du SRP		Auriault et coll., 1984
		Damonneville et coll., 1986a
SRP: 22 kDa et 26 kDa (SRP26)	Ac polyclonaux IgE	Damonneville et coll, 1986b
SRP26	Ac monoclonal	Verwærde et coll., 1987
	Ac anti-idiotype	Velge et coll., 1989
Molécule de 28 kDa (Sm 28GST)		Balloul et coll., 1987a
Paramyosine 97 kDa		Pearce et col., 1988
		Flanigan et coll., 1989
Molécule de 68 kDa	Ac monoclonal	King et coll., 1988
Molécule de 68-70 kDa		Flanigan et coll., 1989

- la préparation d'antigènes protéiques à partir de molécules clonés, dont la grande majorité correspondent à des enzymes impliquées dans la détoxification ou le métabolisme. Seul un faible nombre de ces protéines recombinantes a démontré des propriétés vaccinales (Berquist et coll., 1990 et 1995). Le tableau qui suit récapitule l'état des recherches dans cette approche vaccinale:

Antigène	Taille (kDa)	Stade évolutif	Fonction	Protection (%)		
				Souris	Rat	Autre
Glutathion-S-transférase (Sm 28GST)	28	Schistosomule Vers adultes	Enzyme	30-40	40-60	40 (babouin)
Paramyosine (Sm 97)	97	Schistosomule Vers adultes	Protéine du muscle	30		
IrV-5	62	Tous stades	Protéine du muscle	50-70	95	25 (babouin)
Triose-phosphate-isomérase (TPI)	28	Tous stades	Enzyme	30-60		
Sm23	23	Tous stades	Ag membranaire	40-50		
Protéine fixant des acides gras (Sm14)	14	Schistosomule	Ag membranaire	65 (non consanguines)		90-100 (lapin)

d'après N. R. Bergquist (1995), Parasitology Today 11,191.

Parmi toutes ces molécules clonées, la protéine de 28 kDa de *S. mansoni* qui correspond à une glutathion *S*-transférase (Sm28 GST), initialement caractérisée dans notre laboratoire (Pierce et coll., 1990; Balloul et coll., 1985), apparaît comme un candidat vaccinal très prometteur (Pierce et coll., 1994). L'ADNc a été cloné et séquencé en collaboration avec J. P. Lecoq et les laboratoires de Transgène, puis exprimé dans différents vecteurs tel que *E. coli* et *S. cerevisiae* et le virus de la vaccine (Capron A., 1993). L'immunisation avec cette protéine conduit à des taux de protection supérieurs à 50 % chez le rat, 38 % en moyenne chez le babouin. En parallèle, on constate une diminution significative de la taille des granulomes hépatiques et une réduction de 70 % du nombre d'œufs pondus quotidiennement par femelle, même chez les animaux partiellement protégés (Boulangier et coll., 1991). Le type de réponse immunitaire obtenue présente un profil d'IgGs sécrétoires. L'utilisation d'anticorps monoclonaux appropriés a permis de relier l'effet anti-fécondité observé à l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28 GST (Xu et coll., 1991). Les domaines essentiels pour l'activité glutathion *S*-transférase sont N et C terminaux, et un épitope majeur correspondant aux acides aminés 190-211 pour l'extrémité C

terminale a été identifié (Wolowczuk et coll., 1993). Des anticorps monoclonaux ont également permis de relier l'effet protecteur à un épitope immuno-dominant correspondant aux acides aminés 115-131 (Capron A., 1993). En terme de stratégie vaccinale, l'immunisation avec la Sm28 GST peut donc conduire à une diminution partielle mais significative de la charge parasitaire. Elle permet également une grande réduction de la pathologie et du potentiel de transmission de la maladie grâce aux effets anti-fécondité observés.

Suite à ces travaux, l'intérêt potentiel des enzymes impliquées dans les mécanismes de détoxification (en particulier des GSTs) dans une stratégie vaccinale a été souligné. Le chapitre qui suit aborde les mécanismes de détoxification chez le schistosome afin d'exposer clairement le rôle crucial des enzymes anti-oxydantes pour l'adaptation du parasite à son environnement extérieur.

Mécanismes de détoxification chez les helminthes

Le parasite, parce qu'il change brusquement de milieu de vie en passant d'une forme libre à une vie parasitaire, est soumis à de nombreux stress que lui impose son nouvel environnement. Les facteurs de stress peuvent être des variations de température, d'osmolarité, les xénobiotiques ou les mécanismes effecteurs de l'immunité de son hôte.

Parmi les différentes stratégies de défense contre ces stress, les mécanismes de détoxification impliquant les enzymes anti-oxydantes, jouent un rôle primordial. Ces enzymes permettent de rendre les composés toxiques pour l'organisme plus facilement excrétables ou moins actifs. En inactivant les radicaux oxydants et leurs produits, les enzymes anti-oxydantes protègent la structure et le génome parasitaire contre les dommages oxydatifs.

L'exposé qui suit illustre la place des enzymes anti-oxydantes dans le mécanisme de détoxification mis en place par les helminthes.

A) Origine des radicaux oxydants

Les composés réactifs générés par les radicaux libres sont issus du métabolisme cellulaire, de l'action de certaines drogues (Do Campo et coll., 1986), de radiations ionisantes. La réponse immunitaire de l'hôte représente également une source de radicaux oxydants (Callahan et coll., 1988). En effet, certaines cellules du système immunitaire, telles que les éosinophiles, les neutrophiles, les plaquettes et les macrophages (activés par le complément ou les anticorps) peuvent générer des radicaux libres (Capron et coll., 1980; Joseph et coll., 1980). Les phagocytes peuvent entraîner par "flambée respiratoire" la production massive de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et d'anions superoxydes O_2^- . Ces deux composés peuvent interagir pour former l'oxygène singulet 1O_2 et des radicaux hydroxyl OH . extrêmement réactifs, via la réaction d'Haber-Weiss (Fig. 7).

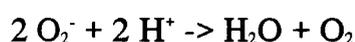
Le radical OH peut initier l'amorçage d'un cycle d'oxydo-réduction en chaîne des acides gras polyinsaturés (acide linoléique et acide arachidonique) alimenté par l'oxygène. Il en résulte une production de nouveaux radicaux libres créant des dommages membranaires pour le parasite (Jamieson, D., 1989).

B) Les enzymes anti-oxydantes

Les parasites possèdent plusieurs composés intra et extra-cellulaires pouvant inhiber les capacités toxiques des radicaux oxydants (Callahan et coll., 1988). La présence également de six types d'enzymes capables de gérer les propriétés de ces radicaux libres permet de conférer une protection.

1) La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) empêche l'O₂⁻ et l'H₂O₂ de coexister (Fig. 7) et par conséquent d'engendrer OH. selon la réaction:



Cytoplasmique, la SOD est un dimère de 32 kDa et contient un atome de cuivre ou de zinc par sous unités. Elle a été détectée chez les Nématodes, les Cestodes et les Trématodes. La forme classique de SOD (Cu/Zn) chez *S. mansoni* a été initialement identifiée et clonée dans notre laboratoire (Cordeiro da Silva et coll., 1992). Une forme de SOD extracellulaire a également été décrite (Simurda et coll, 1988).

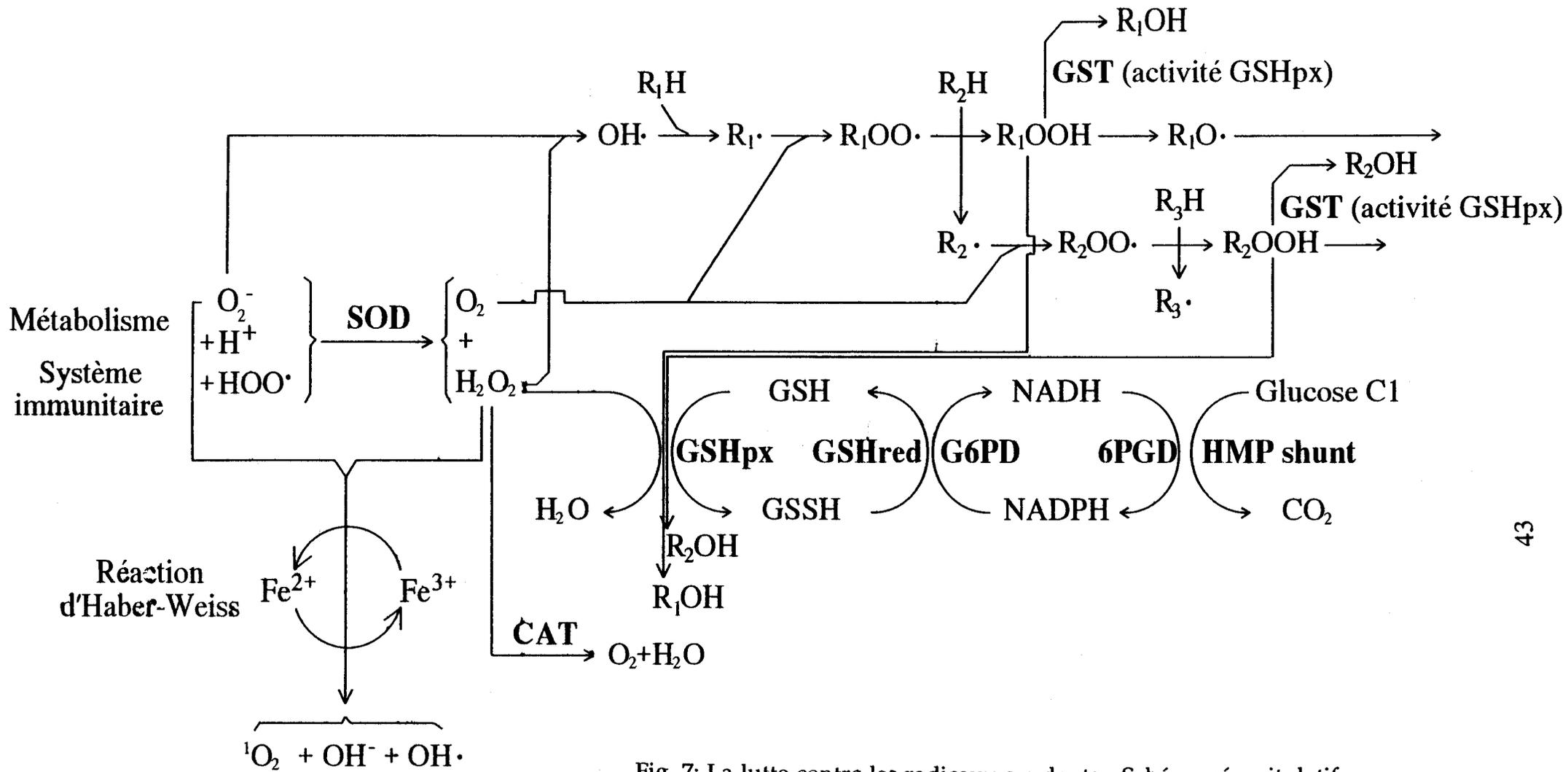
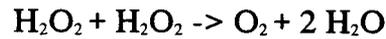


Fig. 7: La lutte contre les radicaux oxydants - Schéma récapitulatif

2) La catalase

La catalase intervient dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en empêchant celui-ci d'entrer dans la réaction d'Haber-Weiss (Fig. 7) selon la réaction:



Tétramère de 240 kDa, elle utilise l'hématine comme groupement prosthétique.

La catalase a été détectée chez les Nématodes (Smith et coll., 1986) mais semble être absente chez les Trématodes et les Cestodes.

3) La cytochrome C peroxydase

Cette enzyme utilise un groupement prosthétique (fer) et intervient dans les processus d'oxydo-réduction au dépend d'un peroxyde. La réduction de l'atome de fer est réalisée par un donneur d'électrons de faible spécificité. Lorsque ce donneur d'électron est le glutathion (GSH), la réaction catalysée est alors:



4) Les glutathion *S*-transférases

Les glutathion *S*-transférases (GSTs) semblent représenter chez les helminthes le système majeur de détoxification. Intensivement étudiées, plusieurs isoenzymes ont été décrites (pour revue voir Fig. 8). Elles présentent des similitudes biochimiques et de séquence avec les trois familles de GSTs décrites

chez les mammifères, sans pour autant pouvoir être clairement rangées dans une des familles (Brophy et coll., 1988 et 1990; Hughes, 1993). L'activité GST est plus importante chez les Plathelminthes à tégument d'origine cytoplasmique (Cestodes et Trématodes) que chez les Némathelminthes à tégument cuticulaire. Essentiellement retrouvées dans le cytosol, les GSTs d'helminthes participent aux réactions de détoxification suivant trois mécanismes principaux :

a) Détoxification des xénobiotiques

La résistance médicamenteuse de cellules tumorales de mammifères, d'insectes et de plantes a été associée à l'activité GST. En ce qui concerne les helminthes, les GSTs peuvent également constituer un élément majeur de la résistance aux drogues. Par exemple, O'Leary et coll. ont montré chez *S. mansoni* la capacité des GSTs à catalyser une réaction de O-déméthylation sur le métabolite du métrifonate (O'Leary et coll., 1991). Une autre étude a relaté des phénomènes d'induction différentielle des isoenzymes GSTs *in vivo* chez *S. mansoni* après traitement de souris infectées par le 3-méthylcholanthrène hydroxyanisole butylé et le phénobarbital (Vande Waa et coll., 1993).

Cependant, les GSTs, en se liant aux anti-helminthiques, peuvent également potentialiser les effets du médicament en facilitant son transport intra-cellulaire et entraîner la formation d'un conjugué inhibant l'activité GST. Par contre, un site de fixation pour le PZQ a été retrouvé sur la GST de 26 kDa de *S. japonicum*, suggérant un rôle potentiel des GSTs dans la résistance des parasites à ce médicament (Mc Tighe et coll., 1995).

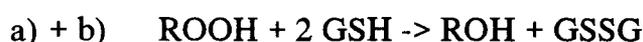
CLASSE	GENRE	REFERENCES
Némathelminthes	Ascaris Hæmonchus Dirofilaria Brugia Rhabditis Onchocerca Panagrellus	Douch et coll. (1978) Kawalek et coll. (1984) Jaffe et coll. (1986) Jaffe et coll. (1986) Below et coll. (1987) Pemberton et coll. (1989) Papadopoulos et coll. (1989)
Plathelminthes Cestodes	Cænorhabditis Echinococcus Hymenolepsis	Weston et coll. (1989) Morello et coll. (1982) Brophy et coll. (1990)
Plathelminthes Trématodes	Fasciola Schistosoma	Howell et coll. (1988) Smith et coll. (1986) Taylor et coll. (1988) O'Leary et coll. (1988)

Fig 8: Représentation des GSTs caractérisées chez les helminthes

b) Détoxification des peroxydes lipidiques

Les GSTs des Trématodes et des Cestodes sont capables de réduire les fonctions peroxydes (sauf H₂O₂) via une activité glutathion peroxydase (Taylor et coll., 1988). Dans ce cas, l'interaction entre le GSH et le ROOH conduit en un composé intermédiaire, le GS-OH. Ce n'est que si une seconde molécule de GSH intervient que la réaction est complète (Burk et coll., 1978; Prohaska, J.R., 1980). Ainsi nous avons:





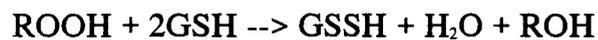
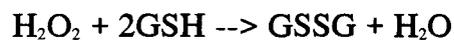
Les GSTs sont également capables d'éliminer les dérivés aldéhydiques issus de la peroxydation lipidique par conjugaison (Brophy et coll., 1990). Les Nématodes privilégient davantage l'activité glutathion réductase en utilisant le NADPH.

c) Fonction de liaison

La capacité des GSTs de fixer des ligands hydrophobes (hématine, acides gras insaturés, pigments biliaires ...) pourrait faciliter leur détoxification passive par transport. Il est à noter cependant que certains auteurs attribuent à cette fonction de liaison un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire en permettant la rétention de ligands lipophiles non toxiques (Brophy et coll., 1990).

5) Les glutathion peroxydases

Tétramériques ou monomériques, les glutathion peroxydases (GSHpxs) sont constituées de sous-unités identiques contenant chacune un atome de sélénium lié de façon covalente à une cystéine dans leur site actif. Utilisant la glutathion comme agent réducteur (Fig. 7), elles participent à la réduction de H₂O₂ ou d'hydroperoxydes membranaires suivant les réactions :



Dans ce mécanisme cinétique, l'oxydation par le ROOH est réalisée sur l'atome de Se. Ceci aboutit à la formation d'un composé intermédiaire Se-OH dans le site catalytique (Maiorino et coll., 1995). Ce produit intermédiaire est lié à l'enzyme (contrairement au mécanisme cinétique des GSTs). La réduction de Se-OH intermédiaire par deux réactions successives conduit à l'enzyme réduite (Ursini et coll., 1985; Flohé et coll., 1989). Ici, la spécificité du donneur d'électrons GSH est importante (Ursini et coll., 1995)(contrairement aux réactions catalysées par les cytochrome peroxydases).

Tout comme la catalase, les GSHpxs représentent une famille d'enzymes très efficaces capables de dégrader 42000 molécules d'H₂O₂ par seconde à 0°C (Callahan et coll., 1988). Malgré leur faible concentration chez les helminthes, une glutathion peroxydase de *S. mansoni* a été clonée dans notre laboratoire (Williams et coll., 1992; Roche et coll., 1994) et chez *B. pahangi*, *B. malayi* et *W. bancrofti* (Cookson et coll., 1993).

6) Les glutathion réductases

Le glutathion oxydé (GSSG) est à nouveau réduit par l'intermédiaire des glutathion réductases (GSHred, Fig. 7), en utilisant le NADPH comme cofacteur:



Chez *S. mansoni*, une partie de l'ADNc de la glutathion réductase (correspondante au site de fixation du GSH) a été récemment cloné dans notre laboratoire (E. Serra, communication personnelle).

C) Régulation de l'activité anti-oxydante au cours du développement

Les travaux de Mkoji et coll. (1988a) ont démontré que le schistosomule constitue le stade préférentiel d'attaque oxydative des cellules du système immunitaire. La sensibilité de ce stade du parasite aux agents oxydants a été corrélée à une diminution de la disponibilité en glutathion libre, suggérant ainsi le rôle primordial des enzymes anti-oxydantes glutathion dépendantes dans ce mécanisme (Mkoji et coll., 1988b). Nare et ses collaborateurs illustrent ensuite bien ce phénomène en établissant une étroite corrélation entre l'activité des GSHpxs, GSHreds et GSTs suivant les stades de développement du parasite et la résistance de celui-ci aux radicaux oxydants (Nare et coll., 1990). En effet, si le taux de SOD varie peu entre le stade schistosomule et le stade adulte, l'activité des GSHpxs, GSHred et GSTs augmente au cours du développement. La faible expression des enzymes anti-oxydantes glutathion dépendantes, au stade précoce, engendre donc une sensibilité accrue du schistosomule aux radicaux oxydants.

De façon plus générale, des travaux montrent que la susceptibilité ou la résistance des cellules au stress oxydatif est fonction d'un état d'équilibre entre les différents enzymes anti-oxydantes. Ainsi, des cellules JB6 transfectées avec

la SOD humaine confèrent une hypersensibilité. La cotransfection de ces cellules avec la SOD et une GSHpx bovine rétablit une résistance (Amstad et coll., 1994). Ainsi, une petite déviation des ratios physiologiques SOD/GSHpx peut avoir des effets dramatiques sur la résistance cellulaire aux dommages oxydatifs.

Dans le chapitre qui suit nous allons aborder plus particulièrement les glutathion peroxydases. En effet, cette classe d'enzymes anti-oxydantes est essentielle pour la protection et la biologie de la cellule. De plus, les sélénoenzymes GSHpxs présentent un mécanisme original d'incorporation de sélénium sous forme de sélénocystéine. Les modalités d'incorporation de cet acide aminé particulier seront également exposées.

Les glutathion peroxydases

L'intérêt croissant porté sur les glutathion peroxydases (GSHpxs) démontre les surprenantes capacités de cette classe enzymatique. En effet, les GSHpxs jouent un rôle fondamental dans la protection des organismes contre les agressions de l'environnement et sont impliquées dans divers processus biologiques.

Utilisant le glutathion comme agent réducteur, les GSHpxs existent sous plusieurs formes. Présentant ou non un atome de sélénium (Se) par sous-unité dans leur site actif, les GSHpxs diffèrent également selon leur affinité vis à vis de divers substrats et selon leur répartition tissulaire. Elles sont soumises à un fin mécanisme de régulation.

Le chapitre qui suit tente d'exposer clairement les récents acquis sur cette classe enzymatique. Il illustrera également le mécanisme particulier d'incorporation du Se sous forme de sélénocystéine (SeCys), indispensable pour l'activité biologique des GSHpxs dépendantes du Se.

I) Généralités

Les glutathion peroxydases (GSHpxs) ont été décrites pour la première fois en 1957 au sein d'érythrocytes bovins. Mills a en effet démontré les capacités de ces enzymes à catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion, protégeant ainsi l'hémoglobine des dommages oxydatifs (Mills et coll., 1957).

A) Réaction enzymatique

Toutes les GSHpxs catalysent la réduction d'hydroperoxydes (ROOH) au dépend de 2 molécules de GSH suivant la réaction:



R peut être un groupe organique aliphatique ou aromatique, ou de l'hydrogène. Les produits issus de cette réaction enzymatique sont H₂O, un alcool (ROH) ou une seconde molécule d'eau lorsque H₂O₂ sert de substrat, et du glutathion disulfide (GSSG).

B) Mécanisme cinétique

Bien que la réaction catalysée par les GSTs, les peroxydases présentant un groupement prosthétique (telle que la cytochrome peroxydase) et les GSHpxs semble identique, le mécanisme cinétique pour ces trois classes enzymatiques est différent (Maiorino et coll., 1995). Lorsque une séléno-GSHpx est impliquée dans la réaction, un composé intermédiaire hautement oxydé est présent dans le site actif de l'enzyme (E-SeOH). De plus, le potentiel oxydatif dans le site actif présente une grande spécificité de donneur d'électron (GSH) pour la forme "classique" GSHpx-1 (Flohé et coll., 1989). La réaction suit un mécanisme cinétique dit en "Ping-Pong" et présente des constantes de Michaelis infinies, une vitesse maximale infinie et une production de produits d'inhibition presque nulle (Ursini et coll., 1995).

Le schéma qui suit illustre le mécanisme catalytique proposé pour les GSHpxs:

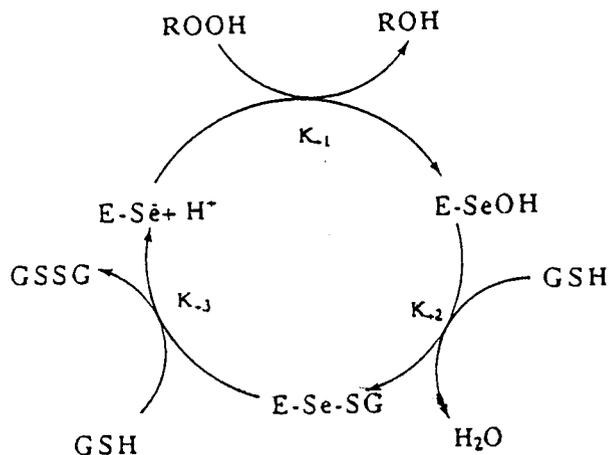


Fig. 9: Mécanisme catalytique proposé pour les GSHpxs (d'après Maiorino et coll., 1995)

Cette réaction enzymatique peut être décrite simplement par l'équation de Dalziel suivante:

$$\frac{[E_0]}{v} = \frac{\Phi_1}{[ROOH]} + \frac{\Phi_2}{[GSH]}$$

Avec:

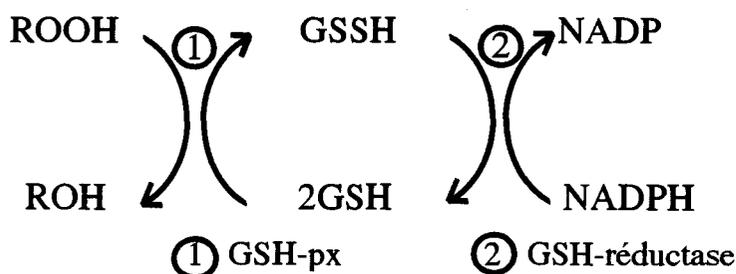
$$\Phi_1 = \frac{1}{k_{-1}}$$

$$\Phi_2 = \frac{1}{k_{-2}} + \frac{1}{k_{+3}}$$

k_{-1} représente une constante cinétique pour l'oxydation de l'enzyme par ROOH. Les constantes cinétiques k_{-2} et k_{+3} correspondent aux deux étapes de réduction en présence de GSH. En utilisant cette approche, les valeurs de k_{-1} des différentes séléno-GSHpxs ont été calculées vis à vis de divers substrats (Maiorino et coll., 1990) et permettent d'évaluer la spécificité de substrat que présente chaque type d'enzyme étudiée.

C) Principe de dosage de l'activité GSHpx

La réduction d'hydroperoxydes par les GSHpxs suit la cinétique suivante :



Il n'y a pas, au sein du mécanisme enzymatique des GSHpxs, de régénération de ROOH et de production de produits inhibiteurs (Ursini et coll., 1985). Le glutathion est régénéré par l'action de la glutathion réductase. Ainsi, la mesure de l'activité GSHpx peut être basée soit sur la consommation de ROOH ou de GSH; soit sur le taux de NADP généré (Mannervik et coll., 1985). Les substrats ROOH les plus classiquement utilisés sont : H₂O₂, tert-butyl hydroperoxyde, cumène hydroperoxyde, acide linoléique hydroperoxyde et phosphatidylcholine hydroperoxyde.

D) Rôle biologique

Les hydroperoxydes peuvent être issus du métabolisme cellulaire. Ils peuvent également provenir du système immunitaire ou de xénobiotiques oxydants. Parce qu'elles catalysent la réduction de ces divers hydroperoxydes, les GSHpxs permettent de maintenir l'intégrité des membranes lipidiques et de l'ADN des cellules. Elles confèrent ainsi une résistance cellulaire contre les dommages causés par les produits oxydants. En clinique, une augmentation de l'activité peroxydase glutathion dépendante a été associée aux phénomènes de

résistance de cellules tumorales vis à vis de drogues anticancéreuses (Mirault et coll., 1991). Ces propriétés enzymatiques permettent de caractériser les GSHpxs comme des enzymes antioxydantes.

Cependant, elles sont également impliquées dans d'autres processus biologiques. En effet, les GSHpxs participent à la régulation de la formation des prostacyclines (Meister et coll., 1988). Par ailleurs, la concentration en GSH dans le plasma est très faible. Or il existe une GSHpx synthétisée spécifiquement dans ce compartiment (la GSHpx plasmatique). On peut alors s'interroger sur le rôle biologique de cette dernière. Un autre argument en faveur d'une implication des GSHpxs autre que la lutte contre les produits oxydants est la synthèse hormono-dépendante de la phospholipide hydroperoxyde GSHpx (PHGSHpx) au sein des testicules de rats (Roveri et coll., 1992).

II) Les différents types d'enzymes GSHpx

E) La GSHpx "classique" GSHpx-1

Initialement décrite au sein d'érythrocytes bovins (Mills et coll., 1957), la GSHpx-1 (E. C. 1.11.1.9) est une protéine tétramérique comprise entre 76 et 105 kDa. Chaque sous-unité identique contient un atome de sélénium à l'état réduit, incorporé sous forme de SeCys (Flohé et coll., 1973). Cette enzyme est retrouvée dans tous les tissus, mais à des taux plus élevés dans les érythrocytes, le foie et les reins. Cytosolique, elle est active sur plusieurs types d'hydroperoxydes et particulièrement vis à vis de l' H_2O_2 (valeur de la constante cinétique K_{+1} pour l' H_2O_2 : $48.3 \mu M^{-1} sec^{-1}$) mais inactive sur la phosphatidylcholine hydroperoxyde (PCOOH). Chez les bovins, sa structure 3D a été déterminée par diffraction aux rayons X (Epp et coll., 1983) et sa séquence en acides aminés a

été élucidée (Mullenbach et coll., 1988). Cette enzyme est largement décrite chez la souris (Chambers et coll., 1986 et 1988), le rat (Ho et coll., 1992; Yoshimura et coll., 1988), le lapin (Akasaka et coll., 1989) et l'homme (Chada et coll., 1988). La GSHpx-1 humaine présente une masse moléculaire par sous-unité de 20 kDa. Chu et ses collaborateurs (1993) rapportent que l'activité peroxydase est augmentée de 50% chez les trisomiques 21. Par la suite, l'hybridation *in situ* de l'ADNc codant pour GSHpx a révélé 3 *loci* différents sur les chromosomes 3, 21 et X (Diamond et coll., 1992). Le gène fonctionnel est celui situé sur le chromosome 3 (Moscow et coll., 1992). Le locus 21 correspond à un pseudogène. En effet, la séquence génomique obtenue est homologue à celle de l'ADNc avec très peu de différences, notamment la perte du codon d'initiation ATG (muté CTG) et celle du codon TGA (déterminant l'incorporation de la SeCys) muté GGA (Diamond et coll., 1992). Ce résultat suggère l'existence d'une copie intégrée par le biais de rétrotransposons au chromosome 21. Deux protéines apparentées à la GSHpx, GPRP-1 et GPRP-2 (Dunn et coll., 1989; Akasaka et coll., 1990) identifiées au niveau du foie humain ont été rapportées. En clinique, dans le cadre de l'infection par HIV, le phénomène d'apoptose des cellules T CD4⁺ est induit par les peroxydes lipidiques. Il a été démontré que cette mort cellulaire est consécutive à une déficience des lymphocytes infectés en activité GSHpx (Sandstrom et coll., 1994).

B) La GSHpx gastro-intestinale (GSHpx GI)

La GSHpx GI est une enzyme présentant de grandes similarités avec la GSHpx-1. En effet, tout comme la GSHpx-1, elle est active sur l'H₂O₂, le tert-butyl ROOH, le cumène ROOH (CHP), les hydroperoxydes d'acides linoléiques. Cette forme n'est également pas active vis à vis de la PCOOH (les valeurs de la

constante K_{+1} n'ont pas été déterminées pour ce type enzymatique). Codée par un gène présentant 66% d'homologie avec la GSHpx-1 humaine, cette enzyme présente 4 sous-unités de 22 kDa. Immunologiquement différente de GSHpx-1, la GSHpx GI est retrouvée principalement dans le tractus gastro-intestinal. Cependant, chez l'homme, Chu et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence d'ARNm spécifique au niveau du foie (1993). Le *locus* du gène correspondant à cette enzyme a été localisé sur le chromosome 14 humain (Chu et coll., 1994).

C) La GSHpx plasmatique

Cette forme sécrétée de GSHpx est dénommée plasmatique (PGSHpx) car elle a été initialement décrite dans le sang. On pensait alors que cette activité dérivait de la lésion ou de la sécrétion de GSHpx-1 cytosolique de différents types cellulaires (Takahashi et coll., 1987). Après purification, la PGSHpx humaine présente 4 sous-unités de 25kDa et se révèle être très différente du point de vue immunologique de GSHpx-1. Elle diffère également par ses paramètres cinétiques et son état de glycosylation (Avisar et coll., 1991). La protéine a été modélisée d'après la structure 3D connue de la GSHpx-1 et d'après les similarités de structures primaires présentées entre les deux enzymes (Ursini et coll., 1995). PGSHpx possède de grandes similarités en spécificité de substrats avec GSHpx-1. Elle est cependant active vis à vis de PCOOH (Yamamoto et coll., 1993) et inactive sur les hydroperoxydes dérivés de phospholipides et du cholestérol (Maser et coll., 1994). Une activité GSHpx a été décrite dans d'autres liquides extra-cellulaires (lait, salive, bile). L'ADNc correspondant à PGSHpx a été cloné chez le rat (Yoshimura et coll., 1994), l'homme (Takahasi et coll., 1990) et les bovins (Martin-Alonson et coll., 1993). L'ARNm et la protéine ont

été localisés au niveau des reins chez les rongeurs (Yoshimura et coll., 1991) et chez l'homme. Cette protéine est synthétisée puis sécrétée par les tubules proximaux des cellules épithéliales (Maser et coll., 1994). La PGSHpx est également retrouvée au niveau des poumons, du coeur, du placenta, des glandes mammaires et du foie (sauf chez les rongeurs). Chez l'homme, le gène a été localisé sur le chromosome 5 (*locus* p32) (Maser et coll., 1994). L'ADNc présente 44% d'identité avec GSHpx-1. Ce gène présente également des homologies de séquence avec le gène *btuE* d'*E. coli* (Friedrich et coll., 1986), codant pour une protéine qui participe au transport de la vitamine B12 à travers la membrane cytosolique. Cependant, la PGSHpx humaine purifiée ne semble pas se fixer à la vitamine B12 (Takahashi et coll., 1990).

D) La phospholipide hydroperoxyde GSHpx

La phospholipide hydroperoxyde GSHpx (PHGSHpx) est la deuxième enzyme séléno-dépendante décrite chez les mammifères (Ursini et coll., 1982). Cette protéine monomérique d'environ 20 kDa est phosphorylée *in vivo*. Elle a été modélisée d'après la structure 3D connue de la GSHpx-1 et sur la base des similarités de structures primaires présentées entre les deux enzymes (Ursini et coll., 1995). Elle diffère également des autres GSHpxs par sa spécificité de substrat. En effet, la PHGSHpx catalyse avec une plus grande efficacité les peroxydes lipidiques (phospholipides, cholestérol, acide linoléique) et plus faiblement l' H_2O_2 (Thomas et coll., 1990 a et 1990b). Le tableau qui suit présente une comparaison des valeurs de K_{+1} pour différents substrats entre la GSHpx-1 et la PHGSHpx:

<u>SUBSTRATS</u>	$K_{+1} (\mu M^{-1} sec^{-1})$	
	GSHpx-1	PHGSHpx
Peroxyde d'hydrogène	48.3	3.1
Cumène hydroperoxyde	16.6	2.16
Tert-butyl hydroperoxyde	11.8	1.18
Acide gras hydroperoxyde	38.3	32
Phosphatidylcholine hydroperoxyde	Non active	116.2

La PHGSHpx présente une localisation cytosolique. Mais elle a également été retrouvée au niveau des membranes nucléaires et mitochondriales (Roveri et coll., 1992). Elle est capable d'interagir directement avec les peroxydes lipidiques intégrés aux biomembranes sans nécessiter l'action de phospholipases. Cette interaction est certainement facilitée par la nature monomérique de la PHGSHpx, permettant une meilleure accessibilité du site actif. De ce fait, la PHGSHpx représente la principale défense contre la destruction oxydative des biomembranes.

La décomposition d'hydroperoxydes lipidiques génère des radicaux alkoxy très réactifs, qui à leur tour forment de nouveaux hydroperoxydes. L'inhibition de cette réaction par la PHGSHpx nécessite pour être complète un taux physiologique de vitamine E dans les membranes (Maiorino et coll., 1990). En effet, la vitamine E réagit avec les radicaux hydroperoxydes lipidiques prévenant ainsi la propagation de la réaction. Les capacités de la PHGSHpx en absence de vitamine E sont rapidement dépassées.

En plus de son rôle anti-oxydant, la PHGSHpx semble impliquée comme élément régulateur d'événements biologiques médiés par les peroxydes lipidiques comme, par exemple, les mécanismes de prolifération et de différenciation cellulaires. Chez le rat, la PHGSHpx a été retrouvée dans tous les tissus, mais à un taux beaucoup plus élevé au niveau des testicules (Roveri et coll., 1992).

L'expression de PHGSHpx post-pubertaire est régulée par les gonadotropines. Elle semble impliquée dans la production de spermatozoïdes fonctionnels. Cette enzyme a également très bien été décrite dans le coeur de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994) et chez l'homme (Maiorino et coll., 1991; Esworthy et coll., 1994). L'ADNc humain codant pour la PHGSHpx, isolé à partir de l'ADN de testicules, révèle 94% d'identité avec l'ADNc de la PHGSHpx de porc (Esworthy et coll., 1994).

E) Les enzymes analogues aux GSHpxs

1) La gp 29

Une glycoprotéine majeure de 29 kDa (gp 29) a été caractérisée en gel SDS par E. Cookson et ses collaborateurs chez trois espèces de filaires lymphatiques : *Brugia pahangi*, *Brugia malayi* et *Wuchereria bancrofti* (Cookson et coll., 1992 et 1993). Cette protéine cuticulaire présente 42% d'identité de séquence en moyenne avec des GSHpxs de différentes sources. La gp 29 de *B. pahangi* ressemble beaucoup à une forme sécrétée de GSHpx de mammifère, mais diffère par son indépendance au sélénium. En effet, la gp 29 ne présente pas de codon UGA déterminant l'incorporation de SeCys, mais un codon cystéine UGC. Exprimée dans une lignée de cellules d'insectes, la gp 29 est enzymatiquement active (Cookson et coll., 1993) et a été également modélisée (Zvelbil et coll., 1993).

2) Autres GSHpxs décrites

Chez la souris, les cellules principales de la tête de l'épididyme de souris

synthétisent et sécrètent une protéine de 24 kDa en gel SDS capable de se lier à la surface des spermatozoïdes. L'ADNc présente 81% d'identité avec la GSHpx humaine et 61% d'identité avec la GSHpx érythrocytaire de souris (Ghyselinck et coll., 1991). Sécrétée par le fluide épидидymaire, cette protéine pourrait protéger les lipides membranaires des spermatozoïdes contre la peroxydation. L'expression de cette enzyme est hormono-dépendante (Perry et coll., 1992; Ghyselinck et coll., 1993). En effet, Perry et ses collaborateurs (1992) ont démontré qu'elle est induite par la testostérone.

D'autres GSHpxs sélénium indépendante sécrétées par l'épididyme de rat et de singe ont été décrites (Cookson et coll., 1993). Une GSHpx bovine ne présentant pas de sélénium a été rapportée (Schichi et coll., 1990) ainsi que deux autres séquences GSHpxs chez la levure *S. cerevisiae* (Rieges et Acjinovic, 1994, non publiés).

Dans le règne végétal, des GSHpxs ne présentant pas de sélénium dans leur site actif ont été également rapportées. Il s'agit par exemple d'une protéine chez le champignon *Mucor hiemalis* (Aisaka et coll., 1983). Un gène *csa* présente 86% d'identité avec un gène de peroxydase glutathion dépendante clonée chez les protoplastes du tabac (Holland et coll., 1994).

L'activité GSHpx n'a pas été décelée chez *E. coli*. Cependant, elle a été caractérisée chez plusieurs organismes procaryotes, notamment chez la cyanobactérie bleu-vert et chez les chlamydomonas (Holland et coll., 1994).

Bien que leur(s) rôle(s) physiologique(s) ne soi(en)t pas clairement élucidé(s), les enzymes analogues aux GSHpxs semblent être très largement répandue. La substitution de la SeCys par la Cys au sein de GSHpxs recombinantes a montré une diminution importante de leur activité enzymatique (Rocher et coll., 1992; Maiorino et coll., 1995b). Cependant, le mécanisme

cinétique est identique à celui observé pour les séléno-GSHpxs. C'est pourquoi un rôle antioxydant a également été proposé pour ces membres particuliers de la famille des GSHpxs. Elles doivent être impliquées dans la défense contre les radicaux libres générés par le métabolisme cellulaire ou l'environnement.

III) Régulation de l'expression des GSHpxs

L'expression des GSHpxs est soumise à un fin mécanisme de régulation. En effet, la répartition tissulaire observée s'explique par plusieurs facteurs. Il s'agit de la disponibilité de certains substrats selon les tissus, de la présence de Se libre. La localisation tissulaire des GSHpxs est également fonction du contexte hormonal, de l'âge, du sexe ou d'un état de stress oxydatif. Plusieurs exemples illustrent ces phénomènes:

Les enzymes séléno-dépendantes ont un taux de synthèse en rapport avec la disponibilité en Se. En effet, une diète de Se entraîne une diminution rapide de GSHpx-1 chez le rat (Yoshimura et coll., 1988), et de façon plus lente de PHGSHpx (Weitzel et coll., 1990). Par ailleurs il a été démontré que le taux de Se au sein des testicules est régulé de façon prioritaire (Behne et coll. 1988). En cas de déficit en Se libre, la perte d'activité peroxydase dépendante du Se est alors compensée par une augmentation du taux de vitamine E dans les tissus (Weitzl et coll., 1990) ainsi que par une augmentation des GSTs.

En cas d'exposition prolongée à l'oxygène, on constate une synthèse accrue de GSHpx-1 dans les tissus pulmonaires de rat (Ho et coll., 1992). C'est également le cas lorsque des rats sont exposés sur une courte période à l'ozone: ils développent alors une tolérance accrue aux oxydants (Harris et coll., 1992). Chez les plantes, D. Holland et ses collaborateurs (1994) ont montré une

augmentation de la synthèse de la protéine Cit-SAP dans les plants de *Citrus Shamati orange* acclimatés à un fort taux de NaCl.

L'activité peroxydase est augmentée en fonction de l'âge. En effet, des travaux ont montré une augmentation de l'activité GSHpx au cours du développement des larves filaires lymphatiques (Cookson et coll., 1993) et du schistosome (Nare et coll., 1990). Chez la souris, la PGSHpx est détectée dans le pancréas et le foie uniquement chez des femelles gestantes. Le taux d'ARNm augmente considérablement dans les reins des souriceaux juste après la naissance et pendant sept jours. Ensuite, l'augmentation de la synthèse de PGSHpx devient plus faible jusqu'à l'âge adulte (Maser et coll., 1994).

Roveri et ses collaborateurs (1992) ont relaté une variation de la distribution subcellulaire de PHGSHpx durant la spermatogenèse du rat: diffuse initialement, la distribution de l'enzyme se restreint de plus en plus au cours de la différenciation aux mitochondries et à l'enveloppe nucléaire. Elle n'est plus décelée au stade spermatozoïde .

Les GSHpxs sont également régulées de façon hormono-dépendante. C'est le cas de la GSHpx détectée au niveau de l'épididyme de souris, qui est inductible par la testostérone (Roveri et coll., 1992). L'injection de gonadotropines de femme rétablit la synthèse de PHGSHpx au niveau des testicules de rats hypophysectomisés. Cette singulière constatation est confirmée par l'analyse de la région 5' non codante et du premier exon du gène de PHGSHpx de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994). Cette région présente en effet des séquences consensus indiquant un contrôle des oestrogènes et de la progestérone pour l'expression de PHGSHpx. De récents travaux ont montré l'existence de régions voisines du gène de GSHpx-1 de souris particulièrement sensibles à la DNase I (O'Prey et coll., 1993). Une de ces régions, située du côté 3' du gène, correspond à un "enhancer tissu-spécifique". En effet, elle est responsable de l'expression

accrue du gène au sein d'érythrocytes. De tels "enhancers" ne sont pas mis en évidence dans des cellules exprimant GSHpx-1 à des taux plus faibles.

D'une manière plus générale, les enzymes anti-oxydantes sont régulées par des mécanismes synergiques (Harris et coll., 1992). Behne et ses collaborateurs (1988) ont démontré que l'incorporation du Se au sein de sélénoprotéines semble spécifique. Ainsi, en cas d'insuffisance en Se, la synthèse de PHGSHpx est prioritaire par rapport à celle de GSHpx-1. Une hypothèse possible expliquant l'incorporation préférentielle du Se dans certaines protéines serait l'existence de facteurs intervenants dans le processus de traduction, présentant des affinités différentes pour le Se.

IV) Glutathion peroxydases et sélénocystéine

Connu comme un élément essentiel pour le métabolisme des bactéries, des mammifères et des oiseaux (Stadman et coll., 1991), le Se est également retrouvé lié de façon covalente, sous forme de sélénocystéine (SeCys), au sein de certaines enzymes impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction. Le mécanisme d'incorporation de la SeCys est longtemps resté mystérieux. En 1986, le séquençage des gènes de sélénoenzymes de mammifère (GSHpx, Chambers et coll., 1986) et de bactérie (formate deshydrogénase H, fDhH, (Zinoni et coll., 1987) ont montré la présence d'un codon TGA (déterminant l'arrêt de la traduction) en phase de lecture. Cette observation a permis l'hypothèse selon laquelle la SeCys était incorporée au cours de la synthèse de la protéine. Plusieurs travaux réalisés sur les fDhH et F d'*E. coli* ont ensuite conduit à l'élucidation des mécanismes de reconnaissance du codon TGA et d'incorporation

de la SeCys. La SeCys est désormais admise comme le 21ème acide aminé, dont la distribution semble ubiquitaire.

A) Le sélénium

1) Historique

Le sélénium a longtemps été considéré comme un élément toxique. En effet, des animaux ayant ingéré des plantes cultivées sur des sols riches en Se présentaient des troubles neurologiques létaux (Maiorino et coll., 1995). Ce n'est qu'en 1950 que le Se est démontré comme étant un microélément essentiel. En effet, la supplémentation en Se a permis de prévenir la nécrose du foie chez des rats dénutris. Depuis, le rôle moléculaire du Se dans les tissus de mammifères suscite beaucoup d'intérêt. Un fait frappant dans la déficience en Se est le nombre d'organes différents affectés. Une diète en Se conduit à une dégénérescence pancréatique chez la volaille, une dystrophie musculaire chez le bétail, une dégénérescence du muscle cardiaque chez le porc (Weitzel et coll., 1990). Bien que rarement observée chez l'homme, une déplétion en Se provoque également des symptômes généraux comme un retard de croissance, une stérilité, la perte des cheveux et des ongles. Ce n'est qu'en 1970 que le rôle préventif du Se dans la nécrose du foie de rat a été compris. En effet, la supplémentation en Se a été corrélée à l'augmentation de l'activité des GSHpx d'hépatocytes de rat (Chada et coll., 1988). Le Se est principalement incorporé dans les protéines sous forme de SeCys, en réponse au codon opal TGA. Il peut également être incorporé au hasard sous forme de Séléno-méthionine (Avisar et coll., 1991) au sein de protéines riches en méthionine, mais cependant le rôle biologique de cet oligoélément n'est attribué qu'à la forme SeCys.

2) La Sélénocystéine

Plusieurs enzymes décrites chez les procaryotes, les archéobactéries et les eucaryotes, possèdent cet acide aminé particulier. Toutes ces enzymes catalysent des réactions d'oxydo-réduction (Böck et coll., 1991a et b) (Fig. 10). La SeCys est présente dans des positions très spécifiques chez trois types d'enzymes bactériennes : les formate deshydrogénases H, N et O, l'hydrogénase et la glycine réductase (Stadman et coll., 1991). Chez les mammifères, la sélénoprotéine P plasmatique, dont la fonction reste inconnue, présente 8 à 10 SeCys par sous-unités.

3) Rôle du Sélénium

Le mécanisme d'action du Se a été suggéré par Flohé en 1989. L'étude de la GSHpx et de la tétraiodine 5' déiodinase (5'DI) a permis de conclure à un mécanisme de cinétique en ping-pong suivant lequel le groupement séléinol oscille entre un état oxydé et réduit (Stadman et coll., 1991; Maiorino et coll., 1995). En effet, le groupement séléinol fonctionne comme un composé nucléophile dans la réaction avec ROOH, probablement pour former E-SeOH. La régénération de cette enzyme avec des groupements thiols (*in vivo* avec GSH) libère OH⁻ et reforme E-Se⁻. La nature nucléophile du groupement séléinol augmente considérablement le K_{cat} de l'enzyme (Böck et coll., 1991b). Des études de substitution (du Se par du Sulfure) ont été réalisées sur la fDhH (remplacement du codon TGA par TGC) (Böck et coll., 1991) et sur la 5'DI (remplacement de TGA par TGT) (Stadman et coll., 1991). Les résultats ont montré une diminution sensible de l'activité de la sélénoenzyme. Des études similaires ont également été réalisées sur GSHpx-1 murine. Deux protéines mutantes présentant une sérine (Ser) ou une cystéine (Cys) ont été exprimées

chez *E. coli* (Rocher et coll., 1992). La GSHpx-Ser ne présente pas d'activité peroxydase. La protéine GSHpx-Cys présente une activité peroxydase mille fois moindre que la protéine native. De plus, cette GSHpx-Cys est très facilement inactivée par les ROOH. Cette constatation résulte probablement du fait que cette protéine, parce qu'elle est moins active que la GSHpx-SeCys, est plus sensible à son auto-inactivation par les ROOH.

Protéine	Organismes	Fonctions
Formate déhydrogénase H	<i>E. coli</i>	$\text{Formate} \longrightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{H}^+$
Formate déhydrogénase N	<i>E. coli</i>	$\text{Formate} + \text{NO}_3^- \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$
Formate déhydrogénase O	<i>E. coli</i>	$2 \text{Formate} + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
Hydrogénase	<i>M. vannielii</i> <i>D. baculatus</i>	$\text{H}_2 \longrightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$
Glycine réductase	<i>C. sticklandii</i>	$\text{Glycine} + 2\text{e}^- + 4\text{H}^+ + \text{ADP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{Acétate} + \text{NH}_4^+ + \text{ATP}$
Glutathion peroxydase cytoplasmique [GSHpx]	Mammifère	$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \longrightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
GSHpx plasmatique	Mammifère	
Phospholipide hydroperoxyde GSHpx	Mammifère <i>S. mansoni</i>	
Type I tétraiodothyronine déiodinase	Mammifère	$\text{L-Thyroxine} + 2\text{e}^- + \text{H}^+ \longrightarrow 3,5,3' \text{ Triodothyronine} + \text{I}^-$
Protéine plasmatique P	Mammifère	Transport? Antioxydant?
Protéines apparentées à GSHpx [GPRP]	Mammifère	
	Mammifère	

Fig. 10: Sélénoprotéines et leurs fonctions catalytiques (d'après Böck et coll., 1991b)

B) Mécanisme d'incorporation de la SeCys

L'incorporation de la SeCys au sein de sélénoenzyme requiert trois conditions: l'existence d'un codon opal TGA, la présence d'un ARNt correspondant spécifique, et des modalités de discriminations entre le codon TGA opal et un codon TGA déterminant l'arrêt de la traduction.

1) Le codon TGA

En 1986, la séquence du gène codant pour la GSHpx-1 a révélé l'existence d'un codon TGA en phase de lecture. Ce codon se trouve à une position correspondante à celle de la SeCys dans la protéine (Chambers et coll., 1986). Dans le même temps, l'existence d'un tel codon est trouvée dans le gène de la fDhH d'*E. coli* (Zinoni et coll., 1986).

Par la suite, d'élégants travaux de Zinoni et de ses collaborateurs en 1987 ont prouvé que le codon TGA détermine l'incorporation de la SeCys au cours de la traduction du gène fDhH d'*E. coli* (Zinoni et coll., 1987)

2) L'ARNt supprimeur

Une des premières constatations permettant de comprendre le mécanisme d'insertion de la SeCys dans la protéine a été celle de Sunde et de ses collaborateurs. Ils ont en effet montré que le squelette carboné de la SeCys provient directement d'une sérine au cours de la synthèse de GSHpx-1 (Sunde et coll., 1987). Ainsi, un ARNt de mammifère, initialement identifié comme un seryl-ARNt, a été reconnu comme un sélénocysteyl-ARNt supprimeur (Lee et coll., 1989). Des séquences homologues au gène SeCys-ARNt ont été retrouvées

chez plusieurs organismes dans le règne animal (Lee et coll., 1990), permettant de conclure à une distribution ubiquitaire de cet ARNt spécifique. L'analyse de la structure de différents SeCys-ARNt a révélé une structure atypique. Chez *E. coli*, la structure primaire de cet ARNt (dont la taille de 95 nucléotides est supérieure à celle d'autres ARNts) présente notamment une région variable de 22 nucléotides (pour revue voir Baron et coll., 1993). Ces différences peuvent être reliées au fait que cet ARNt particulier est le support de deux fonctions distinctes. En effet, le SeCys-ARNt est, d'une part, une molécule porteuse permettant la conversion d'un résidu séryl en résidu sélénocystéyl, d'autre part, cet ARNt permet l'insertion de la SeCys formée au sein de la sélénoprotéine en cours de synthèse. Les travaux de Lienfelder et ses collaborateurs (1988) ainsi que de Böck et de ses collaborateurs (1991 a et b) sur différentes souches de *Salmonella* et d'*E. coli*, incapables de décomposer le formate, ont permis d'aboutir à la conclusion suivante : 4 facteurs agissant en *trans*, en plus du codon TGA, sont nécessaires à l'incorporation de la SeCys dans fDhH. La figure 11 récapitule le mécanisme observé.

Le gène *selC* correspond à l'ARNt suppresseur (Lienfelder et coll., 1988 a et 1988b). Le produit du gène *selA*, une sélénocystéine synthétase (Lienfelder et coll., 1989), permet la formation d'un complexe stable avec l'ARNt chargé d'un résidu Seryl. SELA catalyse l'élimination d'une molécule d'eau du résidu séryl. Le produit SELD permet l'apport d'un atome de Se réduit et activé (Lienfelder et coll., 1990). Ainsi, l'addition de Se⁻ au complexe formé permet la formation de l'ARNt opal chargé en SeCys. Le produit du gène *selB* correspond à une protéine de 70 kDa capable de fixer du GTP (Forchhammer et coll., 1989 et 1990). SELB a été identifié à un facteur d'élongation au cours de la traduction. Bien que présentant des homologies de séquences N terminales avec le facteur d'élongation EF-Tu, SELB reconnaît spécifiquement l'ARNt chargé en SeCys.

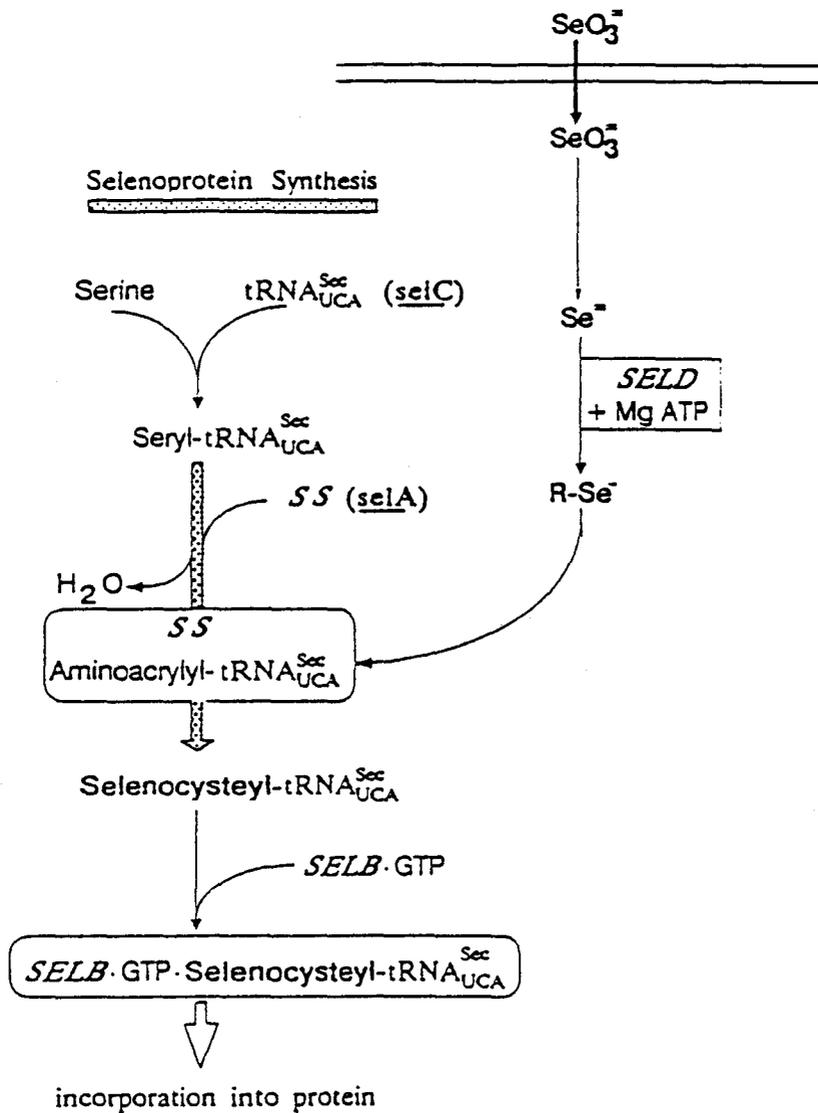


Fig. 11: Métabolisme du sélénium chez *E.coli*

SS: sélénocystéine synthétase

R-Se⁻: molécule donneur de sélénium activée

(d'après Böck et coll., Mol. Microbiology, 1991,5, p 518)

Chez les eucaryotes, des gènes homologues aux gènes *selA*, *selB* et *selD* n'ont pas été mis en évidence (Böck et coll., 1991).

Chez le xénope, l'expression du gène SeCys-ARNt est contrôlée par trois éléments de séquence situés dans la région 5' non codante adjacente (Lee et coll., 1989). Il s'agit d'une boîte "TATA", d'une région riche en C et G, et d'une région riche en A et T située à -62 et -76 nucléotides. Ce gène est transcrit *in vivo* et *in vitro*, à un taux supérieur à celui observé chez l'homme, le lapin et le poulet.

3) Modalités de reconnaissance du codon TGA

Comment le complexe ribosomal identifie-t-il le codon TGA spécifique de la SeCys par rapport au codon TGA déterminant la fin de la traduction? Depuis l'identification du codon SeCys TGA, des hypothèses ont été émises sur la présence de séquences consensus dont la fonction serait de signaler l'insertion de la SeCys, probablement par le biais de structures secondaires spécifiques de l'ARNm.

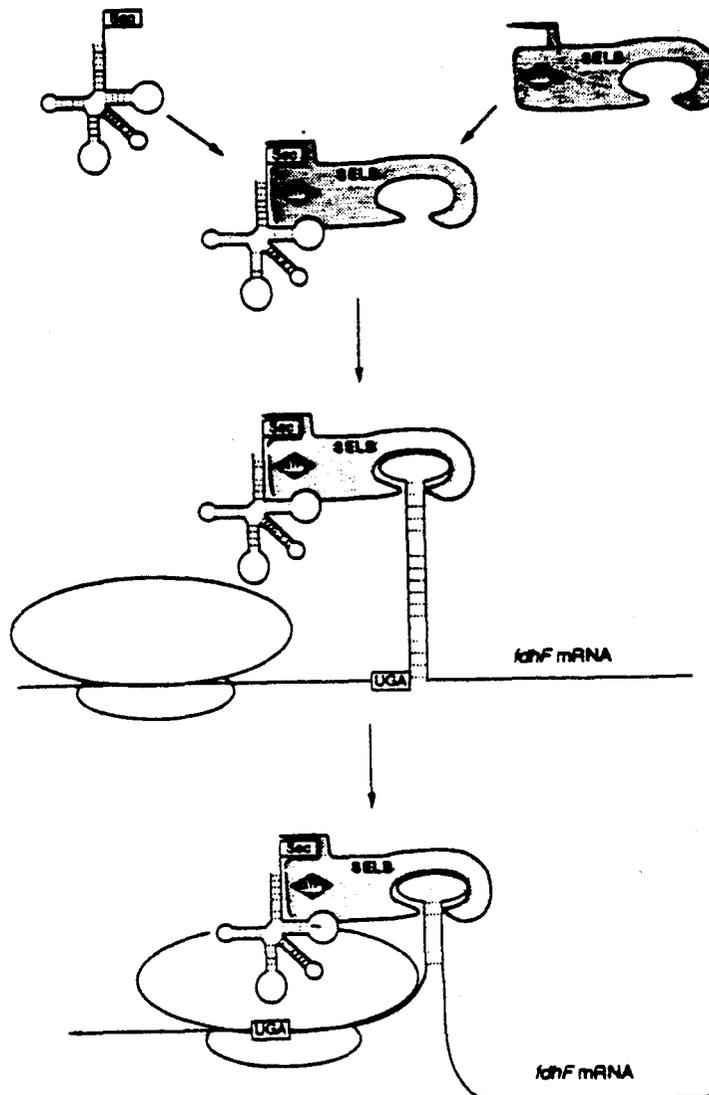
Deux principaux modèles ont été mis en évidence:

a) Les sélénoprotéines procaryotes:

Modèle de la formate deshydrogénase H d'*E. coli* (Berg et coll., 1991a et b)

Bien que n'étant pas apparentée à la famille des GSHpxs, l'insertion de la SeCys au cours de la synthèse de la fDhH d'*E. coli* dépend d'une structure de 40 bases de l'ARNm en épingle à cheveux. Cette structure, située juste en aval du codon TGA, présente des éléments de séquence indispensables à la traduction du codon SeCys. Ces constatations découlent de deux séries de travaux.

Premièrement, la substitution du codon TGA par un autre codon stop (TAA ou TAG) n'empêche pas l'insertion de la SeCys (Zinoni et coll., 1987). La mutation de TGA en codon sérine TCA conduit à l'incorporation d'une SeCys si l'anti-codon de l'ARN de transfert SeCys est également muté de la même manière (Baron et coll., 1990). Deuxièmement, des délétions ou des substitutions dans la région 3' adjacente au codon TGA suffisent à abolir la discrimination entre le codon TGA SeCys et un codon "stop". Une région similaire en taille et en structure a également été retrouvée dans l'ARNm codant pour les fDhN et fDhF d'*E. coli*. Ainsi, un modèle suivant lequel le facteur de transcription spécifique SELB interagit avec des éléments de séquences situés dans la boucle principale adjacente au codon TGA SeCys a été proposé :



(d'après Heider et coll., The EMBO J., 1992, 11, p 3765)

SELB diffère principalement du facteur d'élongation EF-Tu par son extension C- terminale. Ce domaine supplémentaire est probablement lié à la reconnaissance spécifique de la structure en boucle de l'ARNm. Le complexe SELB-GTP-ARNt-SeCys "reconnaît" la boucle adjacente au codon TGA. L'incorporation du codon TGA dans le site A du ribosome conduit à une déformation de la structure secondaire de l'ARNm, permettant ainsi à l'ARNt SeCys fixé au facteur SELB d'être positionné correctement dans le site A ribosomal. Une association correcte entre le codon TGA et l'anti-codon correspondant est ainsi possible.

Des structures très similaires en épingle à cheveux ont également été rapportées au sein de l'ARNm codant pour d'autres sélénoenzymes bactériennes (Shen et coll., 1993).

b) Les sélénoprotéines eucaryotes:

Modèle de la type I iodothyronine 5' déiodinase (Berry et coll., 1991)

La reconnaissance du codon TGA-SeCys au cours de la synthèse de la 5'DI de rat est basée sur la présence d'une région de 200 nucléotides dans la région 3' non codante (3'nc) du gène. L'analyse de cette région permet de prévoir la formation d'une structure secondaire en épingle à cheveux, présentant des motifs de séquence 5'UGAU3' et 5'AUGA3' ainsi que le motif 5'UAAA3' (dans la boucle majeure) dont les bases ne sont pas appariées (Fig. 12 A). Ces éléments de séquences sont également retrouvés dans la région 3'nc du gène de la 5'DI humaine. La région 3'nc de la GSHpx-1 de rat, bien que différente en terme de séquence, présente aussi une structure similaire et ces motifs de séquence dans des positions analogues (Shen et coll., 1993).

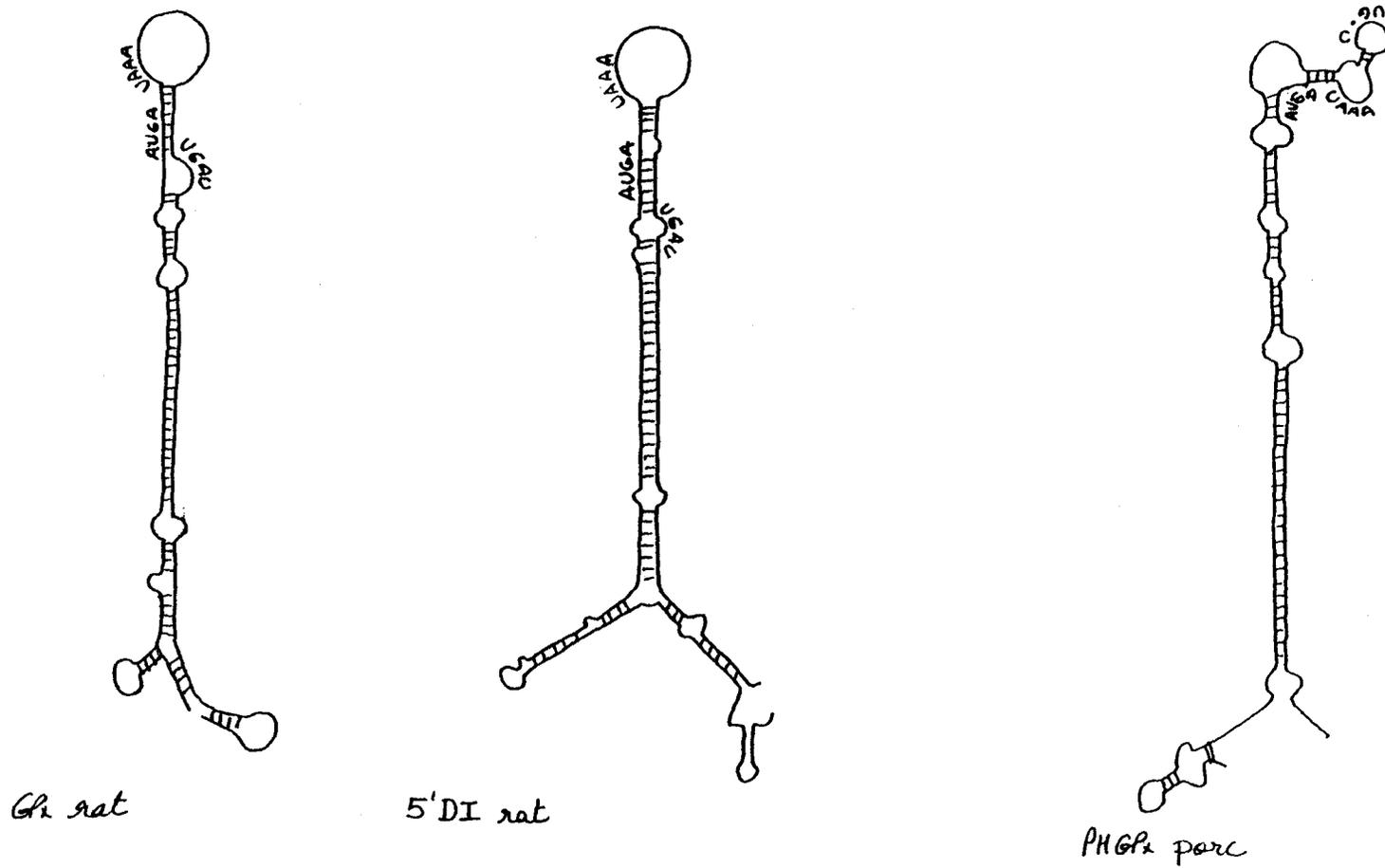


Fig. 12 A: Structures secondaires des régions 3' nc des ARNm de trois séléno-protéines (d'après Berry et coll., 1991; Brigélius-Flohé et coll., 1994)

PHGSHpx (porc)	CCACCTGGCA CCC	ATGACAG	T-CTG-C-CT	AAAACCAGC	-----	COTGGT	-GG-	----GGCAGA	CTCG
GSHpx (rat)	GGGAGGTTTT	TCC	ATGACGG	TGTTTCCTCT	AAATTTACAT	GGAGAAAC.A	CCTGATTTCC	AGA-AAAATC	CCCC
5'DI (rat)	TTTATATTTG	TTT	ATGATGG	.TCACAGTGT	AAAGTTCACA	CAGCTGTG.A	CTTGAT-TTT	T---AAAATG	TCGG
5'DI (humain)	TACATATTTG	TTT	ATGATGG	.CCACAGCCT	AAAGTACACA	CGGCTGTG.A	CTTGAT-TCA	A---AAAATG	TTAT

Fig. 12 B: Aligement des régions 3' nc de 4 séléno-enzymes GSHpxs
(d'après Berry et coll., 1994; Brigélius-Flohé et coll., 1994)

Par ailleurs, cette région fusionnée à la région codante rab 5B (déterminant la synthèse d'une protéine ne présentant pas de Se), suffit pour l'incorporation d'une SeCys au niveau d'un codon muté TGA. De même, l'alignement de la région 3'nc de la PHGSHpx de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994) avec les différentes régions similaires de 5'DI et GSHpx-1 connues actuellement démontre l'existence de séquences conservées, situées au niveau de la formation de boucles d'ARNm (Figs. 12 A et 12 B). Or il n'existe aucune relation phylogénique entre la 5'DI et les GSHpxs.

L'insertion de la SeCys au cours de la traduction, l'existence d'un ARNt spécifique et la présence d'un facteur d'élongation spécifique de l'ARNt-SeCys sont les pré-requis nécessaires permettant d'affirmer que la SeCys peut être assimilée à un 21ème aa. La question qui se pose alors est la suivante : le codon TGA déterminant l'incorporation de la SeCys est-il une ancienne ou une nouvelle acquisition du code génétique? Ceci est bien sûr en relation directe avec la constatation suivant laquelle le groupement séléniol offre un avantage fonctionnel par rapport à un groupement thiol pour la protéine. La présence de SeCys au sein des trois lignées eucaryotes, procaryotes et archéobactéries permet l'hypothèse selon laquelle la SeCys serait un des premiers aa dans l'histoire de l'évolution. Le codon TGA ne serait devenu un codon stop que récemment, suite à une mutation du codon stop TAA (Böck et coll., 1991a et b). Ainsi, le maintien de SeCys au sein de protéines spécialisées ne s'est effectué que par le développement d'une stratégie de reconnaissance spécifique, mettant en jeu la structure secondaire de l'ARNm et la présence d'un facteur de traduction spécifique, SELB. Les organismes présentant des enzymes GSHpxs sans Se dans leur site actif ne présentent pas de séquences consensus dans la région 3'nc du gène

correspondant. Il faudra attendre l'élucidation complète de la synthèse de la SeCys et des mécanismes d'incorporation de celle-ci au sein des différentes branches de l'évolution, pour fournir une réponse définitive.

Résultats - Discussion

A- Etude du gène de la glutathion peroxydase de *Schistosoma mansoni*

Les glutathion peroxydases (GSHpxs) forment une surprenante famille de protéines enzymatiques impliquées dans différents processus biologiques et dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs. Chaque type d'enzyme présente des spécificités de substrats, de localisation au sein des tissus, de régulation d'expression.

Jusqu'à présent, aucune GSHpx dépendante du sélénium n'avait été décrite chez les invertébrés. Le clonage et la caractérisation du gène correspondant à l'ADNc d'une séléno-GSHpx de *S. mansoni* obtenu dans notre laboratoire (Williams et coll., 1992) devrait nous permettre:

- De comprendre, par l'analyse de la structure du gène, l'organisation et les particularités du génome de *S. mansoni*;
- D'accéder à la région promotrice et de permettre ainsi l'étude du contrôle de l'expression du gène étudié;
- D'identifier plus précisément, par analogies de séquence, le type d'enzyme correspondant à l'ADNc initialement cloné.

Les résultats concernant le clonage du gène correspondant à une GSHpx de *S. mansoni* sont présentés dans l'article qui suit:

Roche, C., Williams, D.L., Khalife, J., LePresle, T., Capron, A. and Pierce, R.J.
(1994) Cloning and characterization of the gene encoding *Schistosoma mansoni*
glutathion peroxidase. *Gene* 138, 149-152.

GENE 07633

Cloning and characterization of the gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase

(Parasite; free radicals; antioxidant enzyme; UGA; selenoprotein; very small intron; regulatory sequences; vaccine; helminth)

Catherine Roche, David L. Williams*, Jamal Khalife, Thérèse LePresle, André Capron and Raymond J. Pierce

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille Cedex, France

Received by G. Bernardi: 27 April 1993; Revised/Accepted: 27 July/2 August 1993; Received at publishers: 30 September 1993

SUMMARY

Antioxidant enzymes are thought to play a crucial role in the survival of the parasite, *Schistosoma mansoni*, during its migration through the tissues of the definitive host. We recently cloned the cDNA encoding one such enzyme, glutathione peroxidase (Gpx). In order to elucidate the regulation of expression of this gene, we describe the cloning and characterization of a *Gpx* gene of *S. mansoni*. An initial screen of a λ EMBL4 genomic library using the corresponding cDNA sequence as a probe yielded 14 positive clones, two of which have so far been analyzed in detail. The complete *Gpx* gene contains five introns, four of which, located at the 5' end, are extremely short (30–51 bp) and the last of which is approximately 6 kb long. We present the sequence of the gene including 73 bp at the 5' end, the complete sequence to 137 bp downstream from the penultimate exon, 164 bp upstream and 131 bp downstream from the last 3' exon. The potential mRNA cap site is situated 219 bp upstream from the ATG start codon. All intron/exon junctions correspond to the conventional eukaryotic splice signal. Analysis of the 5' flanking region revealed the presence of a potential TATA box at –26 bp from the cap site, but no CAAT-like element is present. Southern blot analysis showed a unique *Gpx* gene organisation in the *S. mansoni* genome.

INTRODUCTION

In the search for a vaccine against parasitic helminths, increasing attention is being focused on the characterization of enzymes thought to be involved in their protection

Correspondence to: Dr. C. Roche, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille Cedex, France. Tel. (33-20) 877966; Fax (33-20) 877888.

* Present address: New York State Agricultural Experimental Station, Cornell University, Geneva, NY 14456, USA. Tel. (1-315) 787-2348.

Abbreviations: aa, amino acid(s); bp, base pair(s); GST, glutathione S-transferase; Gpx, glutathione peroxidase; *Gpx*, gene (DNA) encoding Gpx; kb, kilobase(s) or 1000 bp; nt, nucleotide(s); PCR, polymerase chain reaction; RACE, rapid amplification of cDNA ends; *S.*, *Schistosoma*; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, 0.15 M NaCl:0.015 M Na₃citrate pH 7.6; UTR, untranslated region(s).

against free radicals derived from the host oxygen metabolism (Mitchell, 1989). Notably, glutathione S-transferases (GST) are targets of protective immunity toward schistosomes and a 28-kDa GST, Sm28 GST, is one of the main vaccine candidates (for review see Pierce et al., 1990). In order to improve the effectiveness of a vaccine based on Sm28 GST, we sought to clone other potential components, and in particular *S. mansoni* glutathione peroxidase (Gpx), another glutathione-dependent antioxidant enzyme (Williams et al., 1992).

Gpx is a selenoprotein (Se-protein), which catalyzes the reduction of various hydroperoxides using reduced glutathione as a specific hydrogen donor. In several bacterial proteins and in the mammalian proteins Gpx, Se-protein P and type-I iodothyronine 5' deiodinase (Berry et al., 1991a), the Se-cysteine is cotranslationally

incorporated at an in-frame UGA codon by a specific Se-cysteine-inserting tRNA^{(Ser)Sec} (Stadman, 1991; Böck et al., 1991). The discrimination of the Se-Cys 'sense' codon from a regular stop codon has been shown to be dependent in prokaryotes on an RNA secondary structure (stem and loop) immediately 3' of the UGA codon and the existence of primary sequence elements located within the loop portion. In eukaryotes, the discrimination depends on sequence elements located within the 3' UTR loop portion, but at an appropriate distance from the UGA codon (Heider et al., 1992).

One point of interest is that the Gpx activity in *S. mansoni* increases significantly as worms mature in their host and is positively correlated with their resistance to antioxidants (Nare et al., 1990). To elucidate the molecular mechanisms that regulate the production of this enzyme, we chose first to determine the structure of the *Gpx* gene. The aim of the present study was the cloning and sequencing of an *S. mansoni Gpx* gene.

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Isolation of *Gpx* genomic clones

The *Gpx* cDNA sequence was used to screen an *S. mansoni* λ EMBL4 genomic library (Bobbeck et al., 1987). Fourteen positive clones from 30 000 recombinant plaques were initially identified, three of which (clones 4, 10 and 13) were isolated through several rounds of screening. Restriction enzyme analysis and Southern blotting with the cDNA probe (not shown) suggested that clones 10 and 13 contained the complete gene, but that clone 4, which presented only one of the three hybridizing *Eco*RI fragments, was not of full length. The work described here concerns clone 13, but the identical genomic organization of clone 10 has been confirmed by subcloning and sequencing the 5' and 3' ends as well as PCR products spanning the intervening sequences.

(b) Nucleotide sequence of *Gpx*

Fig. 1A shows the genomic organization of clone 13 and the nt sequence is shown in Fig. 1B. The comparison with the cDNA sequence allowed delineation of introns and exons. The gene presents four small introns at the 5' end (33 bp, 51 bp, 32 bp and 30 bp). The presence of small introns at the 5' end of *S. mansoni* genes was first described for the gene encoding hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (*HGPRT*) (Craig et al., 1989). This seems to be a common, but not ubiquitous, characteristic of *S. mansoni* genes, as is the case for genes of *Caenorhabditis elegans* in which more than 90% of all introns are between 45 and 55 nt long (Blumenthal and

Thomas, 1988). It is notable that the fourth intron is the smallest so far described for *S. mansoni* and approaches the theoretical minimum size of 29 bp (Rautmann et al., 1984). The 3' intron is larger than the general size of *S. mansoni* introns (6 kb approximately). Introns of up to 3 kb have been described for the *HGPRT* and *Sm28 GST* genes (Craig et al., 1989; McNair et al., 1993), but all other *S. mansoni* introns so far described are smaller. The first intron is situated just after the start codon ATG and the position of the third intron aligns well with the single intron in the human, bovine, rat and mouse *Gpx* genes (Chambers et al., 1986; Ho and Howard, 1992; Moscow et al., 1992). As is the case for the *S. mansoni HGPRT* gene, none of the four very small introns possesses a pyrimidine sequence longer than 7 nt, in contrast to the stretch of 11 pyrimidine nt generally required for splicing in eukaryotes. Both 5' and 3' splice junctions agree with the consensus sequence. The in-frame stop codon TGA at nt 431–433 aligns with the Se-Cys-encoding TGA codon of mammalian *Gpx*. The sequence immediately 3' of the TGA codon does not present an obvious 'stem and loop' secondary structure and confirms the lack of such structures in eukaryotes. On the other hand analysis of the 3' UTR region does show a structure similar to that found for the human and rat *Gpx* genes (Berry et al., 1991b)(not shown) and the presence of similar sequence elements within the loop. The function of this structure in the recognition of the TGA codon in the schistosome *Gpx* mRNA is under investigation. Analysis of the 5' end region revealed no CAAT box but a potential TATA box (5'-TTTAAATA) at –26 bp from the cap site. Analysis of the 3' non-coding region showed the presence of a polyadenylation signal-like element 5'-AATAAA which occurs 14 bp before the transcription termination point. Three mismatches were found in the 3' non-coding region of exon 5 compared to the cDNA sequence (Williams et al., 1992), only one of which corresponds to differences found between individual cDNA clones.

(c) Southern blot analysis

A Southern blot of *S. mansoni* cercarial DNA digested with *Sac*I and *Eco*RI was probed with the *Gpx* cDNA. The hybridizing fragments predicted from the gene organization of clone 13 were produced (Fig. 2). When the digest was performed with *Sac*I, which does not cut within the *Gpx* gene, a single hybridizing fragment is produced. This result suggests the presence of a single type of *Gpx* organization in the *S. mansoni* genome, in agreement with our data demonstrating an identical gene organization of clones 10 and 13. However, the large number of positive genomic clones obtained after the primary screen together with the mismatches we have observed between our published cDNA sequence and the

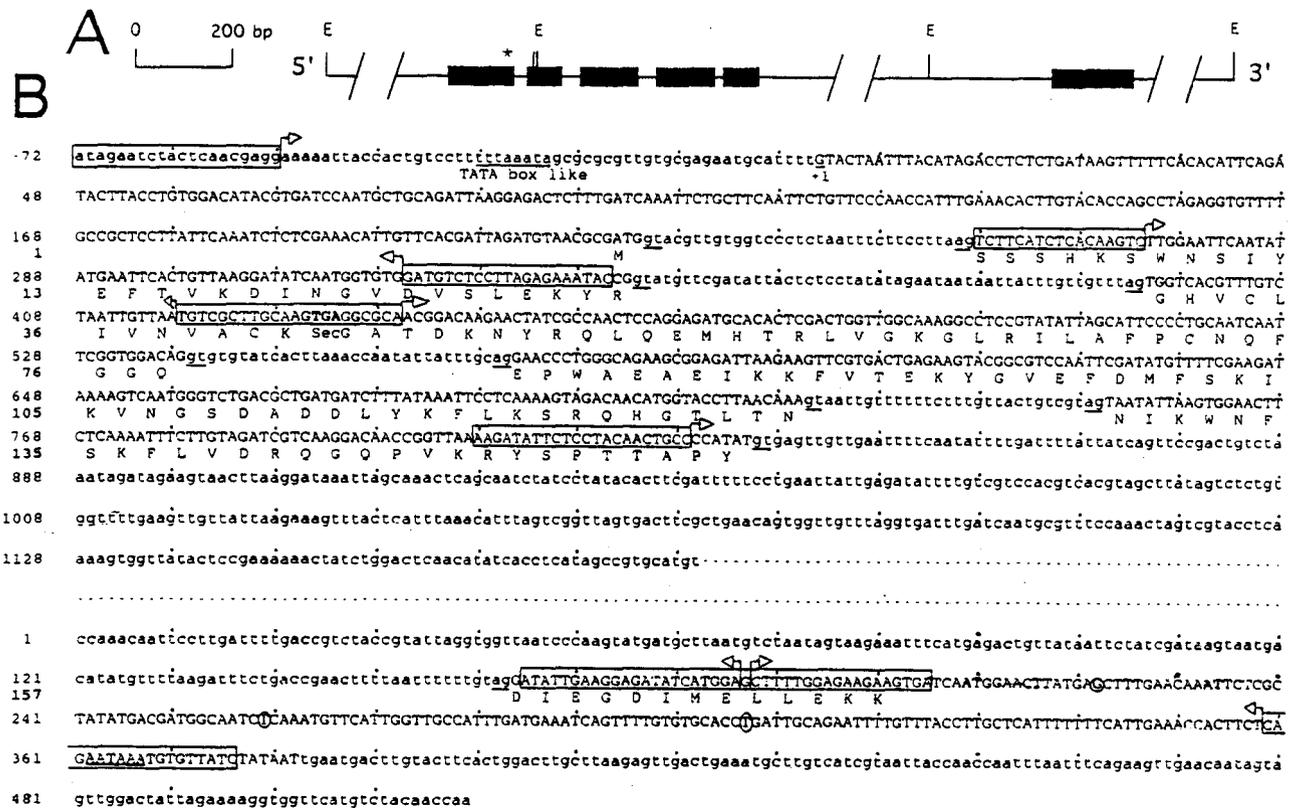


Fig. 1. Gene organization and nt sequence of *S. mansoni* *Gpx*. (A) Positions of exons (filled boxes) are shown on the three *EcoRI* fragments of clone 13 that hybridize with the cDNA insert after Southern blotting. The symbol * indicates the position of the ATG start codon. The total length of the three fragments is approximately 11 kb. Restriction fragments were subcloned into pUC18. E = *EcoRI*. (B) The nt sequence of *S. mansoni* *Gpx*. Using the Double Stranded Nested Deletion Kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and PCR products the sequence has been confirmed for both strands. Primers (sequences are boxed) were synthesized on a Cyclone Plus DNA Synthesizer (Milligen/Biosearch, France). PCR was performed using *Taq* DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) or Vent DNA polymerase (NE Biolabs, Beverly, MA, USA) on a DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus). Sequencing reactions by the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) were carried out using both fluorescein-labelled M13 universal and reverse primers and unlabelled internal primers (Auto-Read Sequencing Kit and Fluore-dATP Labelling Mix, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Sequencing reactions were analyzed on an A.L.F. sequencer (Pharmacia). The sequences obtained from PCR products have been confirmed on at least two different cloned fragments. 5' and 3' end sequences have also been confirmed on clone 10. The nt from 320 to 1000 have been confirmed on a further clone (not shown). Exons are indicated by uppercase letters with the encoded aa sequence given beneath. The potential mRNA cap site determined by 5' RACE PCR is underlined. 5' RACE PCR was performed essentially as described by Frohman et al. (1988) except that first strand cDNA was synthesized using oligo(dT) as a primer. Mismatches are located by open circles. Solid underlines show the possible TATA box, polyadenylation site and splice junctions. The in-frame TGA codon is indicated in bold letters. The GenBank accession Nos. are L14328 (5' end) and L14329 (3' end).

genomic sequence presented here may suggest the presence of multiple copies of the *Gpx* gene.

(d) Quantitative dot blot

In order to quantify the number of *Gpx* gene copies in the *S. mansoni* genome, we have made dilutions of the recombinant phagic DNA of clone 13 (from 50 ng to 0.003 ng) and compared by densitometry the intensity of the spots obtained after hybridizing with the cDNA probe with the intensity of spots of dilutions of *S. mansoni* genomic DNA (from 10 µg to 0.1 µg). Data from this dilution series taken out to extinction of the signal (not shown) suggested the existence of one to three *Gpx* gene copies in the haploid *S. mansoni* genome. It will be of

interest to determine whether this is the case, whether all the *Gpx* gene copies are functional and if their expression is coordinately regulated during worm development.

(e) Conclusions

(1) The characterization and sequence of the *Gpx* gene of *S. mansoni* is reported. The gene is approximately 8 kb in length and contains an in-frame Se-Cys-encoding TGA codon.

(2) The *Gpx* gene presents five introns, four of which are very small and are localized at the 5' end. The 3' intron, on the other hand, is larger in size than previously described *S. mansoni* introns.

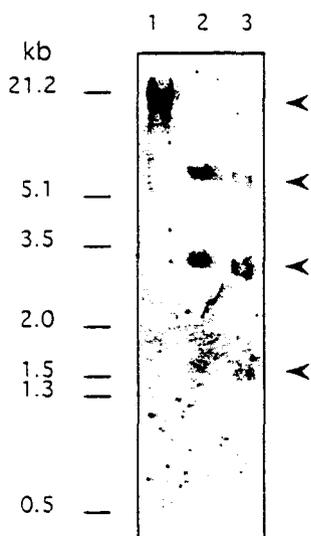


Fig. 2. Southern blot of *S. mansoni* cercarial DNA (10 µg per digestion) cut using *SacI* and *EcoRI*. Lanes: 1, *SacI*; 2, *EcoRI*; 3, *SacI* + *EcoRI*. Arrows indicate the positions of fragments hybridizing with the *Gpx* cDNA probe. Cercarial DNA was isolated and subjected to digestion by restriction enzymes using standard methods (Maniatis et al., 1982). Overnight electrophoresis on a 0.8% agarose gel in Tris-borate, EDTA buffer was performed. The gel was soaked for 30 min in 0.25 M HCl followed by 30 min in 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl and 30 min in 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0/1.5 M NaCl. The DNA was transferred under vacuum in 20 × SSC to a nylon N+ membrane (Amersham) and rinsed for 15 min in 2 × SSC. The DNA was fixed on the membrane by a 15 min incubation with 0.4 M NaOH and pre-hybridized in 1.5 M NaCl/5% blocking agent in ECL (Enhanced ChemiLuminescence) gold buffer (Amersham, UK) at 42°C. The hybridization was performed in the same buffer with the cDNA probe labelled with the ECL direct nucleic acid labelling system (Amersham, U.K.). The blot was washed 2 × 20 min in 2 × SSC/6 M urea/0.1% SDS at 42°C and 2 × 10 min in 2 × SSC at room temperature. Detection was effected using the ECL detection system (Amersham) and the blot was exposed to Kodak XAR film at room temperature for 2 h.

(3) The 5' non-coding region contains a TATA box-like element but no CAAT box-like element.

(4) Southern blot and quantitative dot blot analysis indicated that there is probably a unique organization of the one to three *Gpx* gene(s) in the *S. mansoni* genome.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr. Philip LoVerde for his kind gift of the genomic library. We want to thank J.P. Kusnier for synthesizing the oligodeoxynucleotides. This work was supported by INSERM U167, by the CNRS URA 624 and by the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. C.R. is a doctoral fellow of the Pasteur Institute, Lille.

REFERENCES

- Berry, J.M., Banu, L. and Larsen, P.R.: Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349 (1991a) 438–440.
- Berry, J.M., Banu, L., Chen, Y., Mandel, S.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W. and Larsen, P.R.: Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353 (1991b) 273–276.
- Blumenthal, T.J. and Thomas, J.: *Cis* and *trans* mRNA splicing in *C. elegans*. *Trends Genet.* 4 (1988) 305–307.
- Bobeck, L.A., Rekosh, D.M. and LoVerde, P.T.: Isolation and analysis of adult-female-specific genes from three species of human schistosome parasites. In: MacInnis, A.J. (Ed.), *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*. Alan R. Liss, New York, 1987, pp. 149–158.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J. and Baron, C.: Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* 16 (1991) 463–467.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBrain, W. and Harrison, P.R.: The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon. TGA. *EMBO J.* 5 (1986) 1221–1227.
- Craig, S.P., Muralidhar, M.G., McKerrow, J.H. and Wang, C.C.: Evidence for a class of very small introns in the gene for hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase in *Schistosoma mansoni*. *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 1635–1647.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. and Martin, G.R.: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8998–9002.
- Heider, J., Baron, C. and Böck, A.: Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.* 11 (1992) 3759–3766.
- Ho, Y. and Howard, A.J.: Cloning and characterization of the rat glutathione peroxidase gene. *FEBS Lett.* 301 (1992) 5–9.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- McNair, A.T., Dissous, C., Duvaux-Miret, O. and Capron, A.: Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene* 124 (1993) 245–249.
- Mitchell, G.F.: Glutathione S-transferases: potential components of anti-schistosome vaccine? *Parasitol. Today* 5 (1989) 34–37.
- Moscow, J.A., Morrow, C.S., He, R., Mullenbach, G.T. and Cowan, K.H.: Structure and function of the 5' flanking sequence of the human cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 5949–5958.
- Nare, B., Smith, J.M. and Prichard, R.K.: *Schistosoma mansoni*: levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development. *Exp. Parasitol.* 70 (1990) 389–397.
- Pierce, R.J., Auriault, C., Balloul, J.-M., Boulanger, D., Capron, M., Grzych, J.-M., Velge-Roussel, F., Verwaerde, C., Wolowczuk, I. and Capron, A.: Advances toward a vaccine against schistosomiasis. In: Van der Ploeg, L., Cantor, C.R. and Vogel, H.J. (Eds.), *Immune Recognition and Evasion: Molecular Aspects of Host-Parasite Interaction*. P&S Biomedical Sciences Symposia. Academic Press, San Diego, CA, 1990, pp. 105–122.
- Rautmann, G., Matthes, H.W.D., Gait, M.J. and Breathnach, R.: Synthetic donor and acceptor splice sites function in an RNA polymerase B (II) transcription unit. *EMBO J.* 3 (1984) 2021–2028.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–5467.
- Stadman, T.C.: Biosynthesis and function of the selenocysteine containing enzymes. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 16257–16260.
- Williams, D.L., Pierce, R.J., Cookson, E. and Capron, A.: Molecular cloning and sequencing of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52 (1992) 127–130.

Les principaux résultats présentés dans l'article sont résumés ci-dessous:

Le gène est structuré en 6 exons et 5 introns. Deux particularités dans l'organisation de ce gène retiennent notre attention:

- Les 4 premiers introns sont très petits (entre 30 et 51 pb) et s'approchent de la taille minimale théorique de 29 pb pour permettre un épissage correcte. Ils sont situés en 5' du gène. Le cinquième intron, situé du côté 3' du gène, présente une taille supérieure à celles déjà décrites chez *S. mansoni* (Craig et coll., 1989; Mc Nair et coll., 1993);

- Le premier intron est situé juste après le premier codon ATG.

Il est intéressant de noter à ce niveau que la séquence du gène déterminant la synthèse de la phospholipide glutathion peroxydase (PHGSHpx) de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994) présente la même organisation génomique. En effet, l'alignement des séquences entre ces deux gènes révèlent une alternance d'introns-exons vraiment très similaire (Fig 13). De plus, lorsque l'on compare la séquence du gène de la GSHpx de *S. mansoni* avec celle des différentes GSHpxs décrites, on constate que la position du troisième exon est très conservée au sein des gènes des différentes espèces étudiées.

La séquence du gène de la GSHpx de *S. mansoni* révèle:

- La présence du codon TGA déterminant l'incorporation de la SeCys;
- Les jonctions intron-exons révélant les motifs consensus GT du côté 5' et AG du côté 3' de chaque intron;
- La présence du signal de polyadénylation 5'AATAAA3' 156 pb après le codon de terminaison;

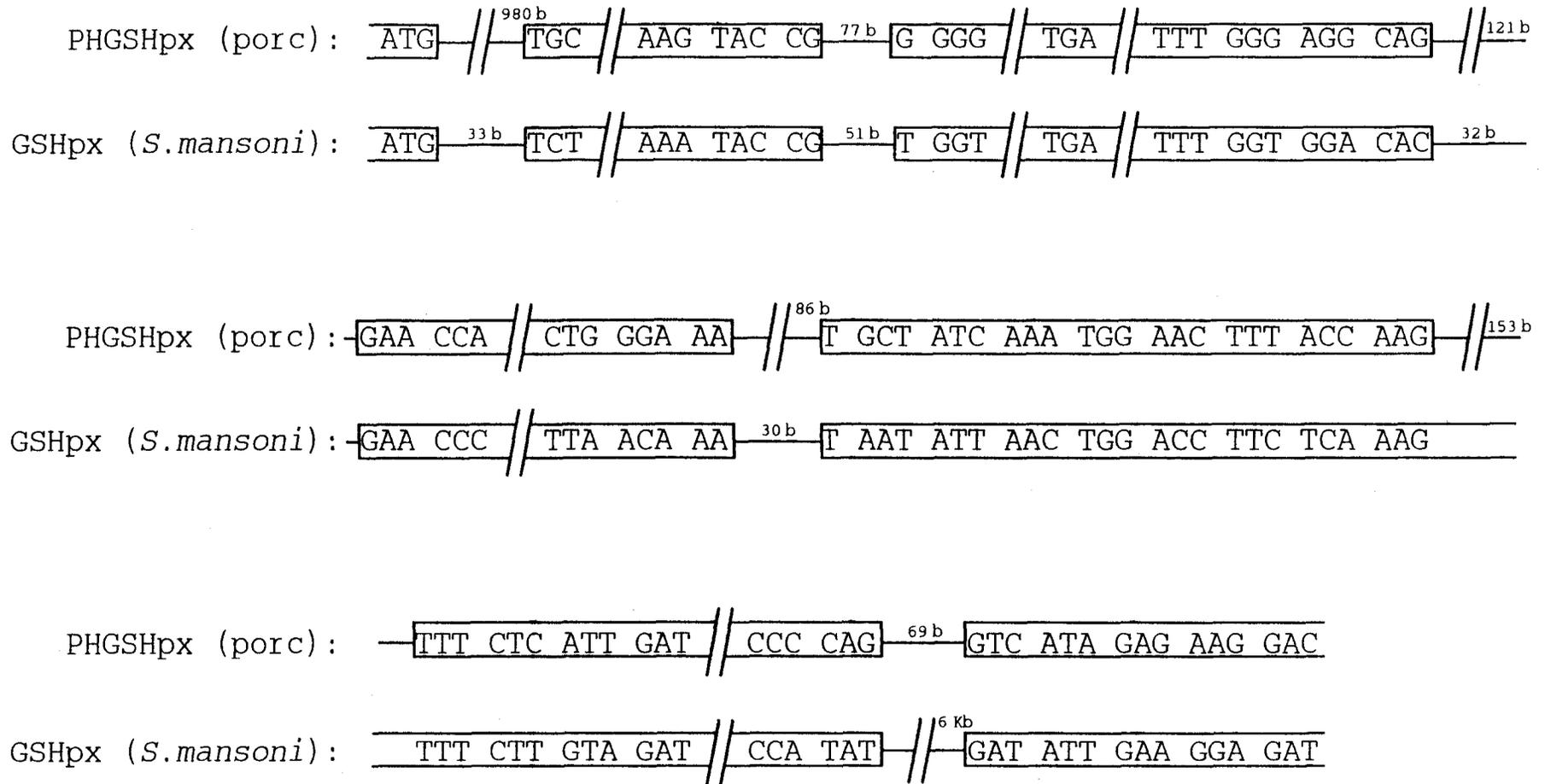


Fig. 13: Comparaison de l'organisation génomique de la PHGSHpx de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994) et de la GSHpx de *S.mansoni*.

- Trois bases différentes à celles correspondantes au niveau de l'ADNc. Ces trois bases, situées dans la région 3' non codante du gène, n'entraînent pas de modifications majeures et peuvent correspondre à des allèles différents;

- La région 5' non codante du gène présentant une séquence 5'TAAATA3' (-32 pb) apparentée à la boîte TATA. La recherche de séquences consensus correspondantes à d'autres motifs de reconnaissance pour des facteurs agissant en *trans* n'ont pas été retrouvées.

- Les résultats du dot-blot quantitatif réalisé permettent de conclure en la présence de 1 à 3 copies de ce gène par génome haploïde. Cependant, le Southern blot révèle une organisation unique du gène de la GSHpx clonée chez *S. mansoni*. Ces résultats suggèrent la présence de différents allèles possibles correspondants au locus étudié.

L'alignement des séquences protéiques correspondantes aux gènes de la GSHpx de *S. mansoni* et de la PHGSHpx de cochon (Brigélius-Flohé et coll.; 1994) révèle 55% d'identité. Les séquences présentant le maximum d'homologies correspondent aux régions impliquées dans la formation du site catalytique décrit pour la GSHpx bovine (Fig. 14), c'est à dire la région environnante de la SeCys, celle impliquée dans une configuration en hélice β (72-80) et adjacente à la glutamine 87, la région centrale de l'hélice située en position 91-99 et l'hélice β adjacente au tryptophane 165.

L'accès à la séquence ainsi qu'à l'organisation du gène de la GSHpx de *S. mansoni* représente un outil très utile pour nous permettre de progresser dans trois nouvelles directions:

```

                                                    TTTT
GSHpx (bovin)      1 : MCAAQRSAAALAAAAPRTVYAFSARPLAGG
PGSHpx (humain)   :MARLLQASCLLSLLLAGFVSQSRGQEKSKMDCHGGISGTIYEYGALTIDGE
PHGSHpx (porc)    : MCASRDDWRCARSMHEFSAKDIDGH
GSHpx (S.mansoni) : MSSHKSWNSIYEFTVKDINGV

                TTTTBBBBBBBB                BBBB BBBB
GSHpx (bovin)     31 : EPFNLSSLRGGKVLLENVAVSL#GITVVRDYTQMNDLQRRRLGPRGLVVLGFP
PGSHpx (humain)   : EYIPFKOYAGKYVLFVNVASY#GLTGO.YIELNALQEELAPFGLVILGFP
PHGSHpx (porc)    : M.VNLDKYRGYVCIVTNVA SQ#GKTEVNYTQLVLDLHARYAECGLRILAFP
GSHpx (S.mansoni) : .DVSLEKYRGHVOLIVNVACK#GATDKNYRQLQEMHTRLVKGGLRILAFP

                TTTT      HHHHHHHHH TTTT                TTTTHHHHH
GSHpx (bovin)     81 : CNQFGHQENAKNEEILNCLKYVRPGGGFEPNFMLEKCEVNGEKAHPLFA
PGSHpx (humain)   : CNQFGKQEEFGENSEILPTLKYVRPGGGFVPNFOLFEEKGDVNGEKEQKFYT
PHGSHpx (porc)    : CNQFGRQEEFGSDAEIK...EFAAGYNV...KFDMFSKIICVNGDDAHPLWK
GSHpx (S.mansoni) : CNQFGGOEEFWAEAEIK...KVVTEKYGVE...FDMFSKIKVNGSDADDLYK

                HHHHHH TTTT                TTTT TTTTBBBBSTTTT BBBB
GSHpx (bovin)     131 : FLREVLPTPSDDATALMTDPKFITWSPVCRNDVSWNFEKFLVGPDPVVR
PGSHpx (humain)   : FLKNSCPPTSSELLGTSDFLF...WEPMKVHDIRWNFEKFLVGPDPGIPIM
PHGSHpx (porc)    : WMKVQ.....PKGRGMLGNAIKWNFTKFLIDKNGCVVK
GSHpx (S.mansoni) : FLKSR.....QHGTLTNNIKWNFSKFLVDRQGQPVK

                BBBTTTT      HHHHHHHHHH
GSHpx (bovin)     181 : RYSRRFLTIDIEFDIETLLSQGASA
PGSHpx (humain)   : RWHHRRTTVSNVKMDILSYMRRQAALGVKRK
PHGSHpx (porc)    : RYGPMEEPQVIEKDLPCYL
GSHpx (S.mansoni) : RYSPTTAPYDIEGDIMELLEKK

```

Fig. 14: Alignement des séquences de différentes GSHpxs: mise en évidence des régions conservées.

- Les similarités de séquences observées entre le gène étudié et le gène correspondant à la PHGSHpx de porc (Brigélius-Flohé et coll.; 1994) permettent l'hypothèse selon laquelle le gène cloné s'apparenterait à une PHGSHpx. Il serait intéressant de purifier la protéine native correspondante ou d'établir sa synthèse *in vitro* afin de caractériser son profil enzymatique.

- L'accès à la séquence du gène permet d'établir, à partir du calcul de divergence de différentes enzymes similaires aux GSHpxs étudiées jusqu'à présent, une phylogénie. Cette étude permettrait une compréhension de l'évolution générale des GSHpxs dans le règne animal.

- A partir de différents fragments du gène cloné, il serait possible d'identifier le locus correspondant à la (PH)GSHpx sur les chromosomes de *S. mansoni*. Cette étude, corrélée avec plusieurs sondes correspondantes à d'autres enzymes anti-oxydantes, permettrait une meilleure compréhension de l'organisation du génome du schistosome.

- Les GSHpxs sont soumises à de fins mécanismes de contrôle de leur expression. Le séquençage en amont du gène pourrait permettre la recherche et l'étude de la fonctionnalité de séquences promotrices. La caractérisation d'éléments régulateurs faciliterait la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression du gène étudié.

Maiorino, M., Roche, C., Flohé, L., Laudet, V., Capron, A. and Pierce, R.J.

(1995) Phospholipid hydroperoxide glutathion peroxidase of *Schistosoma mansoni*:: purification, characterization and molecular phylogeny. Manuscrit en préparation.

B- Purification et caractérisation enzymatique de la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase de *S. mansoni*

La publication de la séquence du gène de la PHGSHpx de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994) nous a particulièrement intrigués. En effet, il existe une grande similarité de séquence (55% d'identité) entre cette enzyme et celle que nous étudions chez le schistosome. L'organisation génomique démontre une parfaite conservation dans la position des introns entre les deux séquences, exception faite de la présence d'un intron supplémentaire du côté 3' au sein du gène de la PHGSHpx de porc (Fig. 13). Lorsque l'on fractionne une préparation totale d'antigènes de vers adultes en gel de polyacrylamide avec ou sans β -mercaptoéthanol, l'identification par Western blot avec un anti-sérum spécifique de la protéine de schistosome révèle un monomère de 20 kDa. Or la PHGSHpx est la seule GSHpx décrite sous forme monomérique.

Par ailleurs, Maiorino a démontré qu'une préparation cytosolique de vers adultes de *S. mansoni* révèle une activité GSHpx vis à vis de H_2O_2 , du cumène hydroperoxyde (CHP) et de la phosphatidylcholine hydroperoxyde (PCOOH). Par Western blot, une préparation d'anticorps polyclonaux (obtenue après immunisation d'un lapin avec un peptide de synthèse PYDIEGDIMIELLEKK dirigé contre l'extrémité C-terminale de la protéine de schistosome (voir article suivant, Roche et coll., 1995)) met en évidence une bande de 20 KDa (Fig 16, piste 2) au sein de cette préparation cytosolique. De plus, l'utilisation d'un sérum dirigé contre la GSHpx de porc permet de mettre également en évidence une bande de 20 KDa (Fig 16, piste 4) au sein de cette même fraction.

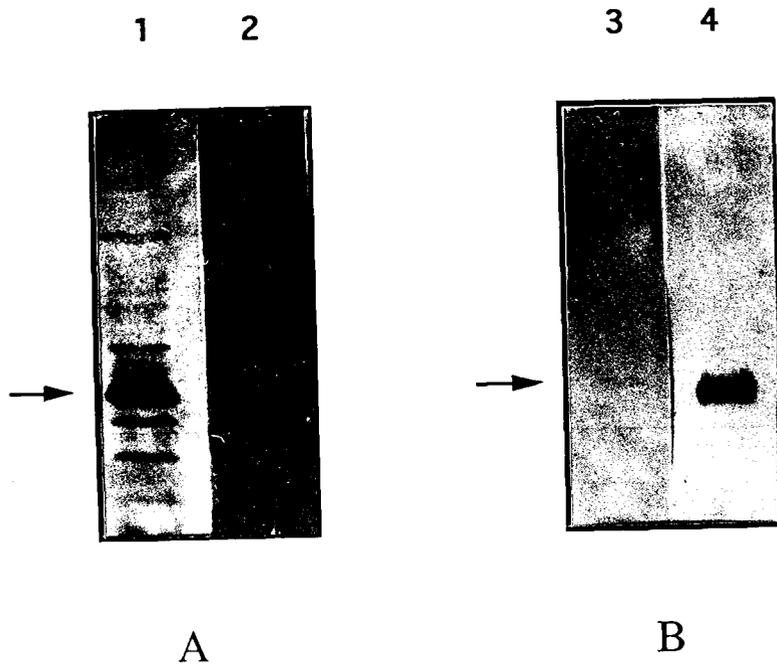


Fig.16: Western blot de la fraction cytosolique de *S.mansoni*.

A: anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de la GSHpx de *S.mansoni* (1/ 200). Piste 1: fraction cytosolique de *S.mansoni*. Piste 2: PHGSHpx recombinante de porc.

B: anticorps dirigés contre la PHGSHpx de porc (1/ 1000) . Piste 3: fraction cytosolique de *S.mansoni*. Piste 4: PHGSHpx recombinante de porc.

Ces différentes constatations argumentent en faveur de l'identification d'une PHGSHpx codée par le gène cloné ici plutôt que de la forme "classique" de GSHpx de *S. mansoni* et soulèvent plusieurs interrogations:

- L'activité enzymatique de la GSHpx du schistosome s'apparente-t-elle effectivement à une PHGSHpx?

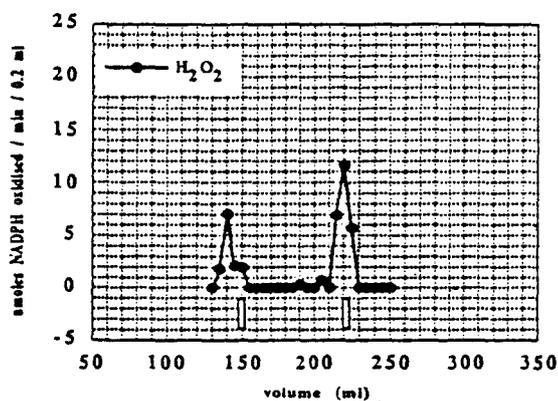
- Existe-t-il plusieurs types de GSHpxs chez *S. mansoni* tel que cela a été décrit chez les mammifères? Dans quelle proportion co-existent les éventuelles enzymes?

Les résultats suivants, établis en collaboration avec le Dr Maiorino tentent d'apporter quelques éléments de réponse:

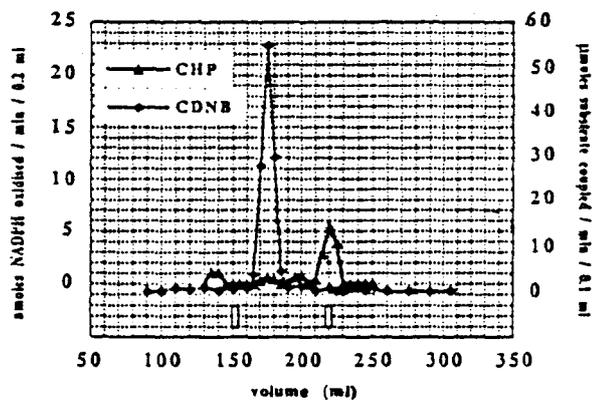
1°) Caractérisation d'une activité GSHpx au sein d'une préparation cytosolique de vers adultes

Une préparation cytosolique de vers adultes de *S. mansoni* (35 mg de protéines totales) a été fractionnée sur une colonne chromatographique de gel d'exclusion. Sur chaque fraction éluée, l'activité GSHpx a été mesurée en utilisant différents substrats. Ces substrats sont, soit communs à toutes les formes de GSHpxs (H_2O_2 , CHP), soit spécifiques des PHGSHpxs (PCOOH). L'activité GST a également été recherchée. Les résultats sont représentés dans la figure 17 suivante:

A.



B.



C.

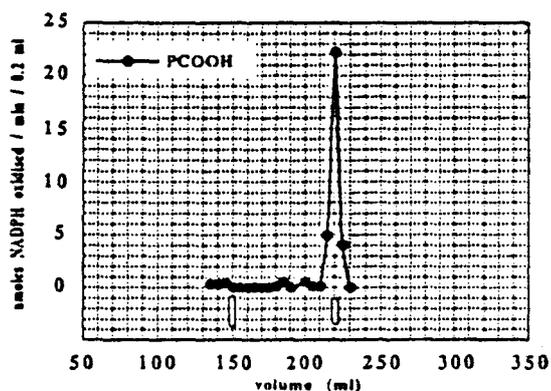


Fig.17: Profil d'élution de la fraction cytosolique de *S.mansoni*. après chromatographie en gel d'exclusion.

A: Profil d'élution de l'activité peroxydase vis à vis de H_2O_2

B: Profil d'élution de l'activité peroxydase vis à vis du CHP

Activité GST

C: Profil d'élution de l'activité peroxydase vis à vis de PCOOH

Les volumes d'élutions indiqués par des rectangles correspondent aux volumes d'élutions (de gauche à droite) de la GSHpx de globules rouges (MW 84 kDa) et de la PHGSHpx recombinante de porc (MW 19 kDa).

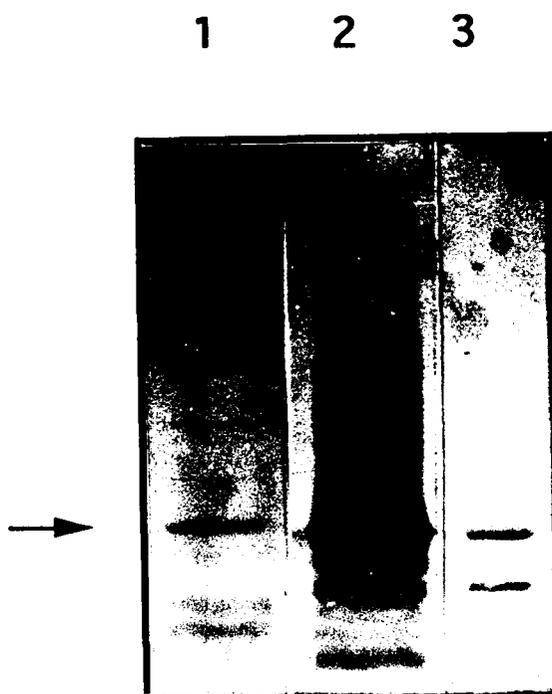
L'activité enzymatique détectée vis à vis de l' H_2O_2 (A) ou du CHP (B) est élue principalement dans deux volumes d'élution. Le premier (120-150 ml) correspond au volume d'élution de la GSHpx-1 de mammifères (masse moléculaire de 84 KDa) et le second (210-230 ml) correspond au volume d'élution de la PHGSHpx de porc (masse moléculaire de 19 KDa). Par contre, l'activité vis à vis du PCOOH est uniquement décelée dans le volume d'élution correspondant à la PHGSHpx (C), et à un taux d'activité 3 fois supérieur à l'activité dite "classique". D'autre part, une activité GST est détectée au sein de fractions clairement distinctes des deux autres volumes d'élution présentant une activité GSHpx (B). Notons toute fois une faible activité GSHpx (vis à vis du CPH) associée à l'activité GST.

Ces résultats sont parfaitement en accord avec les caractéristiques enzymatiques actuellement décrites. En effet, la GSHpx présente classiquement une activité vis à vis de l' H_2O_2 et du CHP. Seule la PHGSHpx est capable de métaboliser le PCOOH. D'autre part, les GSTs présentent une activité GSHpx vis à vis du CHP, mais pas vis à vis de l' H_2O_2 et du PCOOH.

Afin de clairement attribuer l'activité GSHpx mesurée au sein des deux volumes d'élution à une sélénoenzyme, des expériences d'inhibitions en présence d'iodoacétate et GSH ont été menées. Ces études sont en fait une preuve indirecte de l'implication d'une SeCys dans la catalyse de la réaction car le pK_a des groupements sélénoles vis à vis des groupements thiols est faible (Ursini et coll., 1985). Cependant, une inhibition complète de l'activité GSHpx a été mise en évidence au sein des deux fractions étudiées après une incubation de trois minutes en présence d'iodoacétate et de GSH à pH 7 (résultats non présentés).

Afin de caractériser l'activité GSHpx décelée chez *S. mansoni*, nous avons réalisé des expériences de Western blots. Les deux fractions présentant un profil d'activité GSHpx et PHGSHpx ont été testées vis à vis d'anticorps polyclonaux obtenus après immunisation de lapins avec un peptide de synthèse dirigé contre l'extrémité C-terminale de la protéine de schistosome (voir Roche et coll., 1995). La quantité déposée sur gel correspond au même taux d'activité enzymatique (180 nmoles/min en présence d'H₂O₂) au sein de chacune des fractions testées.

Les résultats sont présentés dans la figure qui suit:



Piste 1: fraction présentant une activité GSHpx de *S.mansoni*

Piste 2: fraction présentant une activité PHGSHpx de *S.mansoni*

Piste 3: Protéine PHGSHpx recombinante de porc

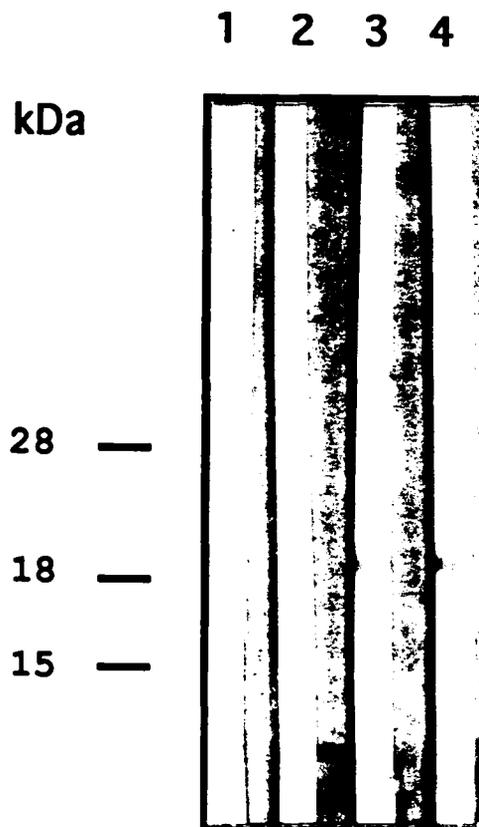
Les anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de la protéine Sm(PH)GSHpx reconnaissent une protéine de 20 kDa dans chacune des fractions (1 et 2). L'intensité des signaux obtenus confirme la présence en plus abondante quantité de l'activité GSHpx contenue au sein de la deuxième fraction (piste 2), surtout si l'on considère que la quantité d'antigène déposée dans la piste 1 (première fraction) est nettement supérieure à celle déposée dans la piste 2.

Ces résultats indiquent la présence de 2 activités GSHpx (dépendantes de Se) différentes du point de vue chromatographique chez *S. mansoni*. En effet, la première fraction correspond à une protéine tétramérique de masse moléculaire et de spécificité de substrat similaires à la forme classique de GSHpx-1 de mammifères. La seconde fraction correspond à une protéine monomérique de masse moléculaire et de spécificité de substrat similaires à forme PHGSHpx. L'abondance relative de la forme PHGSHpx par rapport à la forme GSHpx au sein de la préparation cytosolique de *S. mansoni* peut être expliquée par une déficience en Se au sein du schistosome (Behne et coll., 1988).

Le fait que le sérum polyclonal dirigé contre l'extrémité C-terminale de la PHGSHpx de *S. mansoni* reconnaisse une bande au sein des deux fractions étudiées ne permet malheureusement pas d'attribuer clairement au gène GSHpx cloné l'une ou l'autre des activités GSHpx observées. Ce résultat n'est cependant pas très surprenant puisque les deux formes enzymatiques GSHpx et PHGSHpx appartiennent à la même famille et doivent donc présenter des déterminants antigéniques communs. Néanmoins, les résultats de Western blots confirment la présence en plus abondante quantité de la forme cytosolique de PHGSHpx chez *S. mansoni*.



Afin d'exclure toute possibilité de contamination de GSHpx de hamster au sein des fractions testées, nous avons réalisé un Western blot d'extraits de foie de hamster. La réaction croisée entre cette préparation antigénique et le sérum dirigé contre l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx a été testée. Les résultats sont présentés dans la figure qui suit. Un contrôle a été réalisé en utilisant un sérum polyclonal dirigé contre la SOD de *S. mansoni*. En effet, la SOD présente de grandes similarités de séquence entre les différentes espèces où elle a été caractérisée.



Pistes 1 et 2: Anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de la SmGSHpx (1/200 (1)
1/100 (2))

Pistes 3 et 4: Anticorps dirigés contre la SOD (1/1000 (3) et 1/500 (4))

Aucune protéine n'est reconnue avec le sérum dirigé contre l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx (pistes 1 et 2). Par contre, une protéine de 16 kDa environ est détectée avec le sérum dirigé contre la Sm SOD (pistes 2 et 3). Ce résultat révèle la possibilité de réactions croisées entre certains types enzymatiques. En ce qui concerne l'épitope retenu pour la Sm(PH)GSHpx, soit le hamster ne présente pas de PHGSHpx (ce qui serait surprenant), soit l'épitope n'est pas conservé entre les PHGSHpxs (ou GSHpxs) de hamster et de *S. mansoni*. Ces résultats ne permettent donc pas d'exclure toute source de contamination de PHGSHpx de hamster au sein des fractions cytosoliques étudiées, mais la rendent peu probable. Seule l'adéquation complète entre la séquence protéique correspondante à l'activité enzymatique testée et la séquence du gène cloné permettra d'établir un résultat définitif. C'est pourquoi nous nous sommes attachés dans la suite de notre étude à la purification de l'activité PHGSHpx décelée chez *S. mansoni*.

2°) Purification de la protéine native Sm PHGSHpx

Afin de purifier la protéine native, 3 types de colonnes de chromatographie ont été successivement utilisées: une colonne d'affinité (bromosulfophtaléine), une colonne d'exclusion (Superdex 75®) et une colonne spécifique de ligands hydrophobes (phényl sépharose). La fraction purifiée a ensuite été caractérisée par dosage de l'activité enzymatique ou par Western blot. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant:

Fractions	Activité totale μmoles/min	Protéine totale mg	Activité spécifique μmoles/min/mg	Pourcentage %
Echantillon <i>S.mansoni</i>	15.8	316	0.0506	100
Colonne BSP (puis concentration)	16.5	23.8	0.695	100
Colonne Superdex 75®	15.8	0.6	26.4	100
Colonne Phényl Sepharose (puis concentration)	8.38	0.306	273	53

Ces résultats révèlent l'obtention, à partir d'une préparation cytosolique de vers adultes de *S. mansoni*., d'une protéine de 20 kDa très similaire à la PHGSHpx de porc (Ursini et coll., 1985). Le pourcentage d'activité PHGSHpx de 53% obtenu après élution de la colonne de Phényl Sepharose est expliqué par une forte proportion de sels, suite à l'étape de concentration des échantillons élués.

Ainsi, nous avons tenté d'établir la caractérisation de l'enzyme GSHpx codée par le gène cloné chez *S. mansoni*, en utilisant le sérum polyclonal dirigé contre l'extrémité C-terminale de la protéine comme sonde. Nous avons montré la présence de 2 sélénio-GSHpxs (l'une d'environ 84 kDa, moins abondante dans les conditions données de croissance des vers, et l'autre de 20 kDa). Malheureusement, notre sérum réagit de façon croisée avec les 2 formes enzymatiques. Ce dernier résultat ne nous permet pas d'attribuer au gène cloné l'une ou l'autre forme GSHpx caractérisées. Cependant, les analogies de séquences entre les gènes codant pour la GSHpx de *S. mansoni* et pour la PHGSHpx de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994) suggèrent que le produit du gène étudié s'apparente à une PHGSHpx. Il peut donc correspondre à la sélénoprotéine élue à 20 kDa, laquelle présente des spécificités de substrats

similaires à la PHGSHpx de mammifère. Mais seul le microséquençage de la protéine de 20 KDa purifiée (actuellement en cours) permettra une réponse définitive.

Si l'identité entre le gène cloné et la protéine purifiée est établie, on pourra alors envisager l'exploration biochimique et enzymologique de cette protéine (rebaptisée ici (PH)GSHpx).

Ce travail permet également de soulever plusieurs interrogations:

- Il a été décrit que le ratio entre la forme GSHpx et PHGSHpx est soumis à des variations selon la disponibilité en Se au sein de l'organisme, et ceci en faveur de la PHGSHpx. Une diète en Se chez l'hôte expérimental (souris ou hamster) modifierait-elle ce ratio chez *S. mansoni*?

- Parce que l'activité GSHpx (vis à vis de H₂O₂ ou du CPH) est régulée au cours du développement du parasite (Nare et coll., 1990), il serait intéressant d'explorer l'activité PHGSHpx au cours du cycle de développement du schistosome.

- Une autre expérience intéressante serait de purifier la fraction 130-150 ml par chromatographie d'affinité. Ceci permettrait ensuite l'élaboration d'une sonde anticorps et le clonage moléculaire du gène de la sélénoprotéine GSHpx de 84 kDa de *S. mansoni*.

Roche, C., Liu, J.L., LePresle, T., Capron, A. and Pierce, R.J.

(1995) Phospholipid hydroperoxide glutathion peroxidase of *Schistosoma mansoni*:
production using baculovirus, localization and stage-specific expression.

Mol. Biochem. Parasitol. Sous presse.

C- Etude de l'expression de la (phospholipide hydroperoxyde) glutathion peroxydase de *S. mansoni* *in vitro* et *in vivo*.

Une des particularités concernant la Sm(PH)GSHpx étudiée est la présence de sélénium dans le site actif de l'enzyme sous la forme d'une SeCys. Cet acide aminé est intégré au sein de la protéine en cours de synthèse par le biais d'un ARNt spécifique. L'incorporation de la SeCys est déterminée par la présence d'un codon TGA particulier. La "reconnaissance" de ce codon "TGA-SeCys" est essentiellement basée sur la formation d'un complexe d'initiation mettant en jeu la structure tridimensionnelle de la région 3' non codante de l'ARNm.

Or ce mécanisme de reconnaissance et d'incorporation de la SeCys semble être spécifique de l'organisme étudié. En effet, des travaux effectués sur la fDhH d' *E. coli* (Zinoni et coll., 1986 et 1987) et sur la 5'DI de rat (Berry et coll., 1991) démontrent des mécanismes de discrimination différents au sein des procaryotes et des eucaryotes. C'est pourquoi l'expression de la Sm(PH)GSHpx recombinante dans la bactérie *E. coli* a conduit à la synthèse d'une protéine tronquée: la discrimination entre le codon "TGA-SeCys" et un codon "stop" n'a pas été réalisée dans ce système procaryote. Cependant, il est parfois possible de détecter une faible quantité de protéine entière enzymatiquement inactive dans ce système d'expression (Lo Verde, communication personnelle).

Une des possibilités permettant de contourner ce problème conduit à l'expression chez *E. coli* d'une protéine recombinante Sm(PH)GSHpx mutée, présentant, non pas une SeCys mais une Cys dans son site actif. La mutation, réalisée par la technique de PCR, conduit à la conversion du codon TGA en codon TGT.

Il s'est avéré qu'un sérum de lapin immunisé avec cette protéine mutée ne "reconnaît" pas la protéine native au sein d'une préparation antigénique de vers adultes en Western-blot (Williams, communication personnelle). De plus, des travaux de substitutions effectuées sur une GSHpx murine révèlent une activité enzymatique au moins mille fois moindre de la protéine mutée par rapport à la forme sélénoprotéine (Rocher et coll., 1992).

Ces difficultés d'expression de la (PH)GSHpx en système procaryote ont orientées notre démarche vers la production *in vitro* d'une protéine recombinante en système eucaryote. Nous avons retenu le système d'expression au sein de cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant. Ce système devrait permettre la production d'une grande quantité de sélénoprotéine GSHpx enzymatiquement active.

Ce projet présente un double intérêt. Premièrement, il s'inscrit dans l'élaboration d'un vaccin multigénique en association avec la Sm28 GST. Deuxièmement, il pourrait permettre la caractérisation enzymatique de la protéine clonée.

Par ailleurs, Nare et ses collaborateurs (1990) relatent l'existence d'une augmentation de l'activité GSHpx vis à vis de H₂O₂ et du cumène hydroperoxyde au cour de la maturation du ver. Chez les mammifères, l'expression de la PHGSHpx a été particulièrement retrouvée au niveau des testicules et semble être impliquée dans les phénomènes de différenciation cellulaire (Roveri et coll., 1992). L'étude de l'expression de la (PH)GSHpx de *S. mansoni* au cours du développement du parasite ainsi que sa localisation tissulaire devraient permettre une meilleure caractérisation et une meilleure compréhension du rôle biologique de la sélénoenzyme étudiée.

Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*: production using baculovirus, localization and stage-specific expression

Catherine Roche, Jin Li Liu, Thérèse LePresle, André Capron and Raymond J. Pierce*

Relation hôte-parasite et stratégies vaccinales, unité INSERM U167, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. A. Calmette - BP 245, 59019 Lille Cedex (France). Tel. 20877966- Fax. 20877888.

* To whom correspondance should be addressed

Abbreviations: AcNPV, *autographa californica* nuclear polyhedrosis virus; anti-C-term-SmPHGSHpx, purified rabbit immunoglobulin fraction directed against SmPHGSHpx C-terminal aa; GSHpx, glutathione peroxidase; SeCys, selenocysteine; Sf9, *Spodoptera frugiperda*; SmPHGSHpx, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*; SWAP, soluble antigen preparation of adult worms; 3'UTR, 3' untranslated region.

Summary

The tissue localization and the stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni* (SmPHGSHpx) have been determined. An antiserum raised against the C-terminal region of the predicted protein sequence was used for immunocytochemical investigations. The native protein is expressed only in female and egg vitelline cells and is practically absent from male worm tissue. Western blot data confirmed these results and showed the complete absence of SmPHGSHpx from cercariae. However, northern blotting indicated the presence of the corresponding mRNA at all life-cycle stages investigated. The sequence determination of the 5' flanking region of the SmPHGSHpx gene revealed the presence of an extended TATA box (5'TAAATA3') at -32, a possible CAAT box at -75 and a putative monomeric estrogen response element 5'GGTCAA3' at position -486. In addition direct and inverted repeat elements are present. The *in vitro* production of SmPHGSHpx using the baculovirus system allowed the weak expression of an enzymatically inactive form of the protein. This despite the presence of conserved 5'T(N)AAA3' and 5'TGNT3' elements at or near the terminal loop in the predicted secondary structure of the 3'UTR of the SmPHGSHpx gene.

Key words: *Schistosoma mansoni*, female specific expression, vitelline cells, regulatory response element, selenocysteine.

1. Introduction

We have recently cloned and sequenced the cDNA and the gene encoding a glutathion peroxidase (GSHpx) of *Schistosoma mansoni* [1,2]. Molecular phylogenetic analyses show the *S. mansoni* enzyme to be more closely related to phospholipid hydroperoxide GSHpx (Blaxter, M., personal communication and [3] and the native *S. mansoni* PHGSHpx has been purified and shown to be identical to the cloned enzyme (Maiorino *et al*, in preparation).

The GSHpxs constitute a family of selenocysteine (SeCys)-containing enzymes which play a key role in protecting cells against the oxidative damage caused by H₂O₂ or lipid hydroperoxides. Four types have so far been identified in man: the classical GSHpx (GSHpx-1; E.C. 1.11.1.9); plasma GSHpx (PGSHpx) [4]; gastrointestinal GSHpx (GSHpx GI) [5] and phospholipid hydroperoxide GSHpx (PHGSHpx); E.C. 1.11.1.12) [6]. First described in 1982 by Ursini *et al* [7], PHGSHpx differs from the other tetrameric GSHpxs by a high level of activity toward phospholipid and cholesterol hydroperoxides [8] even if these lipids are integrated in biomembranes. High levels of PHGSHpx activity and protein were found in rat testis after puberty [9] and appear to be gonadotrophin-dependent. The change observed in its subcellular distribution during spermatogenesis suggests a specific role for this enzyme in cellular differentiation in mammals rather than a general antioxidant function.

Molecular cloning data have revealed that SeCys is incorporated into SeCys-proteins at an opal non-sense codon TGA by a specific SeCys-inserting tRNA^(ser)sec [10]. It has been demonstrated that the determinants for recognition of the SeCys-codon in eucaryotes are both the correct folding of the 3'RNA secondary structure and the existence

of sequence elements located within the 3'UTR loop portion (at an appropriate distance from the UGA codon in procaryotes) [11, 12, 13].

We have attempted to understand the biological role and the control of the expression of PHGSHpx in *S.mansoni* (SmGSHpx). In this paper, we present the production of the recombinant enzyme using the baculovirus system. We also present data on the expression of the protein at different stages of the life-cycle of *S.mansoni*, the specific localization of SmGSHpx in vitelline cells and the presence of putative regulatory control sequence elements located in the 5' flanking region of the SmPHGSHpx gene.

2. Materials and Methods

2.1. Expression of SmGSHpx by insect cell lines

The full length cDNA for SmPHGSHpx was obtained as described in [1]. In order to subclone the cDNA insert at the *Bam* HI and *Hind* II cloning sites of the plasmid transfer vector pBlueBacIII (Invitrogen, San Diego CA) a polymerase chain reaction was carried out using the forward primer 5'ATCGGGATCCATGTCTTCATCTCACAAGTC 3' and the reverse primer 5' ATCGAAGCTTATGATAACATTTATTCAG 3' (cloning sites are underlined). Transfer of SmPHGSHpx cDNA by the chimaeric transfer vector to the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) genome was achieved by co-transfection with the linear wild type AcNPV viral DNA of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells using the Cationic Liposome Transfection Module (Invitrogen, San Diego CA). AcNPV recombinant viruses were produced in Sf9 cells using complete TNM-FH medium (Gibco BRL, Scotland) according to the manufacturer's instructions, supplemented

or not with 0.1 μ M of sodium selenite (Sigma, USA), and incubated for 3 days at 28°C. Following harvesting, the cytosolic and the membrane fractions of cells were fractionated on a SDS-polyacrylamide gel and the immunoreactivity of expressed protein was analysed by Western blotting with a rabbit antiserum specific for SmPHGSHpx (see below).

2.2. *Synthetic peptide and production of antisera*

For the production of antisera, a synthetic peptide corresponding to the highly hydrophilic C-terminal region of SmPHGSHpx, PYDIEGDIMELLEKK [1], was produced by solid phase methodology [14]. A Cys residue was added at the N-terminal end of the polypeptide to facilitate coupling to a ovalbumin (OVA) as a carrier protein [15]. New Zealand rabbits were immunized by injection of 2mg of the coupled synthetic peptide, kindly provided by H. Gras-Masse (Institute Pasteur, Lille, France), in the presence of complete Freund's adjuvant [16]. Rabbits were boosted 2 months later by a subclavicular injection of 1 mg of the coupled synthetic peptide. The immunoglobulin fraction was purified using 1g of protein A Sepharose (Pharmacia, Sweden) from 3ml of serum in PBS pH 7.4 overnight at 4°C. After several washes in PBS, the purified immunoglobulin fraction was recovered in elution buffer (2M glycine/0.2M HCl, pH 2.8), neutralized with 2N NaOH and dialysed against PBS overnight at 4°C. Immunoglobulin specificity was tested by Western blotting against a soluble antigen preparation from adult worms (SWAP). A single 20 kDa band was detected (see results) and the immunoglobulin fraction did not cross-react with proteins in hamster liver extract (not shown). Moreover, the immunoglobulins recognized the ovalbumin-conjugated peptide in ELISA (not shown).

2.3. Parasites and antigen preparation

The Puerto Rican strain of *S.mansoni* was routinely maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters. Eggs were recovered from infected livers of hamsters. Cercariae were released from infected snails and concentrated on ice. Adult worms were obtained by perfusion of the hepatic portal system of infected hamsters 40 days after cercarial infection. For Western blot experiments, parasite antigens (adults worms, cercariae and eggs) were prepared by sonication for 6 times 30s in PBS containing 0.05% NP40, 1mM EDTA and 0.5mM PMSF using a Labsonic (B.Braun, USA) sonicator. The supernatants were recovered and measurement of protein content was done using the BCA protein assay reagent (Pierce, USA).

2.4. Immunocytochemistry

Adult worms were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, dehydrated and embedded in paraffin. Deparaffinized 3 μ m thick sections were incubated for 30 min in a solution of 0.5% OVA in TBS (20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.4) containing 5% decomplexed goat serum. The blocking step was followed by incubation with anti-SmPHGSHpx rabbit immunoglobulin fraction (1:200) overnight at 4°C. Washed slides in TBS-0.5% OVA were then treated with a phosphatase alkaline-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma, USA) and incubated for 1h at room temperature. The alkaline phosphatase reaction was developed after washing with New Fuschin substrate (Dako, Denmark). Counterstaining was performed with Harris' haematoxilin. A negative control was performed using immunoglobulins purified from a non-immune rabbit serum.

2.5. Western blotting

Antigen preparations (1.5 mg of protein from female adult worms, cercariae and eggs and 6 mg from male adult worms) were fractionated on 13% SDS-polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to nitrocellulose filters [17]. Non-specific protein binding sites were blocked in PBS containing 5% non-fat dried milk for 1 h at room temperature. Filters were incubated with primary immunoglobulin fraction (1:100) diluted in PBS-5% non-fat dried milk overnight at 4°C and washed 3 times in PBS containing 0.5% Tween 20. Filters were then treated with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Diagnostic Pasteur, France) for 1 h in PBS-5% non-fat dried milk followed by three washes in PBS containing 0.5% Tween 20. Detection was done using 60 mg of 4-chloro-1-naphthol reagent (Biorad, USA) in 20 ml methanol/ 80 ml PBS, pH 7.2 and 10mM H₂O₂.

2.6. Northern blotting

Ten micrograms of total RNA prepared using the 4M guanidine thiocyanate lysis solution and the caesium chloride gradient purification method [18] from adult worms and eggs and thirteen micrograms from cercariae were resolved on a 1% formaldehyde gel [19] and blotted to a positively charged nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham, UK). The 333 nts *Eco*RI/*Kpn*I cDNA fragment of SmPHGSHpx was labelled with (α -³²P) dCTP by the random primer DNA labelling method (Megaprime DNA labelling system, Amersham, UK). The membrane was hybridized at 42°C in 5XSSC /2% BSA/5X Denhardt's solution/ 50% deionized formamide overnight and washed twice in 2XSSC/ 0.1% SDS at room temperature for 15 min

followed by two washes in 0.1 SSC/ 0.1% SDS at 42°C. The blot was exposed 2 days to Kodak XAR film at -80°C.

2.7. Sequence determination

The region 5' to the transcribed region of the SmPHGSHpx gene was obtained from a 7 Kb EcoRI fragment derived from lambda EMBL3 clone 10 subcloned in pUC 18 (see 2). Using the Double Stranded Nested Deletion kit (Pharmacia, Sweden) and PCR products, the sequence has been determined from both strands. Sequencing reactions by the dideoxy-chain termination method were carried out using fluorescein-labelled M13 universal and reverse primers (Auto-Read Sequencing Kit, Pharmacia, Sweden) and were analysed on an A.L.F sequencer (Pharmacia). The sequence has been submitted to GenBank with the accession number XXX

3. Results

3.1. Identification of recombinant proteins expressed in infected *Sf9* cells

Due to the presence of the in-frame SeCys encoding TGA codon, the recombinant protein proved impossible to synthesize in *Escherichia coli*. We did produce a protein in which the TGA codon was replaced by a Cys-encoding TGT codon (not shown). However, antisera raised against the recombinant protein failed to recognise a native *S.mansoni* protein on Western blots. We therefore used a synthetic peptide corresponding to the C-terminal aa of the predicted protein sequence to produce a purified rabbit immunoglobulin fraction (anti-C-term-

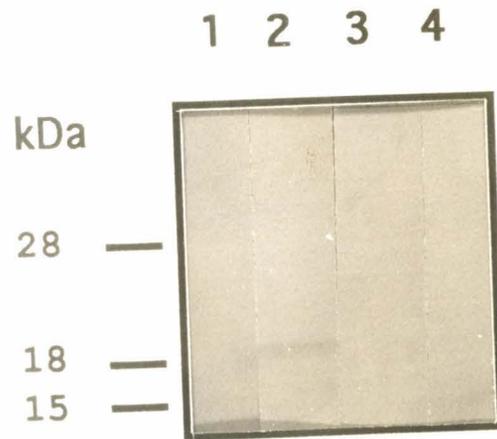


Fig 1. Production of SmPHGSHpx in Sf9 infected cells (lanes 1 and 2) or in uninfected Sf9 cells (lanes 3 and 4). Western blot of cytosolic fractions probed with anti-C-term-PHGSHpx serum (lanes 2 and 4) or with normal rabbit serum (lane 1 and 3).

SmPHGSHpx). The expression of the SmPHGSHpx by recombinant baculovirus-infected Sf9 cells was tested after separation of cytosolic and membrane fractions on SDS-polyacrylamide gels and Western blotting (Fig.1). No reaction with the anti-C-term-SmPHGSHpx specific antibodies was detected in the cytosolic or membrane fractions of cells infected with wild type AcNPV (lanes 1 and 2). The expressed 20 kDa protein is recognized by this antibody in the cytosolic fraction of cells infected with recombinant baculovirus (lane 4), suggesting a full-length synthesized protein. The fact that the anti-C-term-SmPHGSHpx immunoglobulins recognized the 20 kDa protein only in cells infected with recombinant baculovirus indicates that these antibodies are indeed specific for SmPHGSHpx. Media from infected cell cultures had no detectable SmPHGSHpx antigen (not shown), indicating that the protein was not secreted. However, the yield of the recombinant protein was estimated to be only about 0.05% of the total cell proteins, and the addition of selenium in the culture medium did not increase the amount of the recombinant protein (not shown). No significant activity towards substrates H₂O₂, ter-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide according to [20] was detected in the cytosolic fraction of Sf9 cells infected with recombinant baculovirus compared with cells infected with the wild-type baculovirus. This result suggests that an enzymatically inactive form of recombinant SmPHGSHpx is produced.

3.2. Localization of SmPHGSHpx in adult worms

Expression of SmPHGSHpx was demonstrated in sections through adult male and female worms (Fig 2) probed with the anti-SmPHGSHpx immunoglobulins (Figs 2A, 2C, 2D and 2E). Only females were intensely labelled (Fig 2E). Positive reactions were localized in the

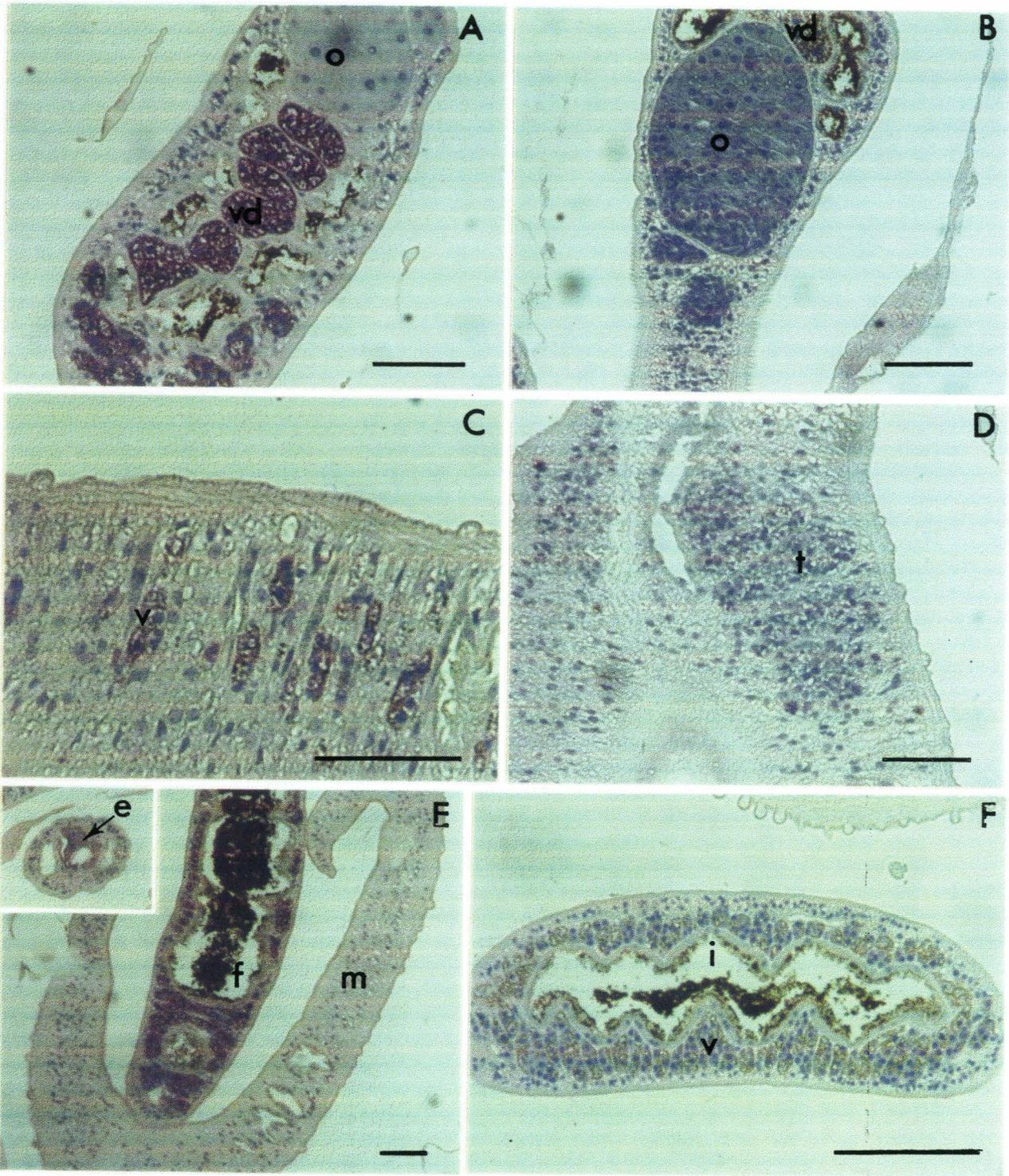


Fig 2. Immunolocalization of SmPHGSHpx in *S.mansoni* adult worms. A: SmGSHpx is localized only in vitelline ducts (*vd*). The ovary (*o*) is unlabelled. B: Negative control. C: Vitelline cells (*v*) are stained in the male parenchyma. D: Section of a male worm: testes (*t*) are unlabelled. E: Only vitelline cells of female (*f*) or eggs (*e*) are stained. A male worm (*m*) showed no staining. F: Negative control of female worm, showing intestinal duct (*i*) full of red blood cells.

nuclei and in the cytoplasm of vitelline cells, both in females and in eggs (Figs 2A and 2E). No immunostaining is observed elsewhere in the reproductive system of females or in parenchymal cells (Figs 2A and 2E). Control sections with non-immune rabbit immunoglobulin fraction did not show any staining (Figs 2B and 2F). In the male worm parenchyma, some stained vitelline cells are present due to partial hermaphroditism [21] (Fig 2C). Fig 2D shows five testes that are completely unlabelled. These results suggest that SmPHGSHpx in *S.mansoni* is a female-specific protein synthesized by vitelline cells.

3.3. Life cycle stage-specific expression of SmPHGSHpx

To extend observations of the expression of SmPHGSHpx to other stages, Western blots of total extracts of male or female adult worms (Fig 3A), cercariae or eggs (Fig 3B) were probed with our anti-C term-SmPHGSHpx immunoglobulin fraction. Control sera used were non-immune rabbit immunoglobulins or an immunoglobulin fraction of a rabbit immunized with SWAP. The anti-C-term-PHGSHpx immunoglobulins recognized a strong band of 20 kDa in female worm extracts (Fig 3A, lane 3). Only a faint band of 20 kDa is observed in the adult male worm preparation (Fig 3A, lane 4) despite the four-fold greater quantity of protein in this lane. These results confirm our previous data obtained after immunocytochemistry. No band was detected in cercarial extracts (Fig 3B, lane 5). Nevertheless, Northern blotting demonstrated the presence of RNA transcripts of SmPHGSHpx at all life cycle-stages investigated (Fig 4). Surprisingly, the amount of specific RNA transcript at the cercarial stage was in the same range that we observed in adult worms and eggs.

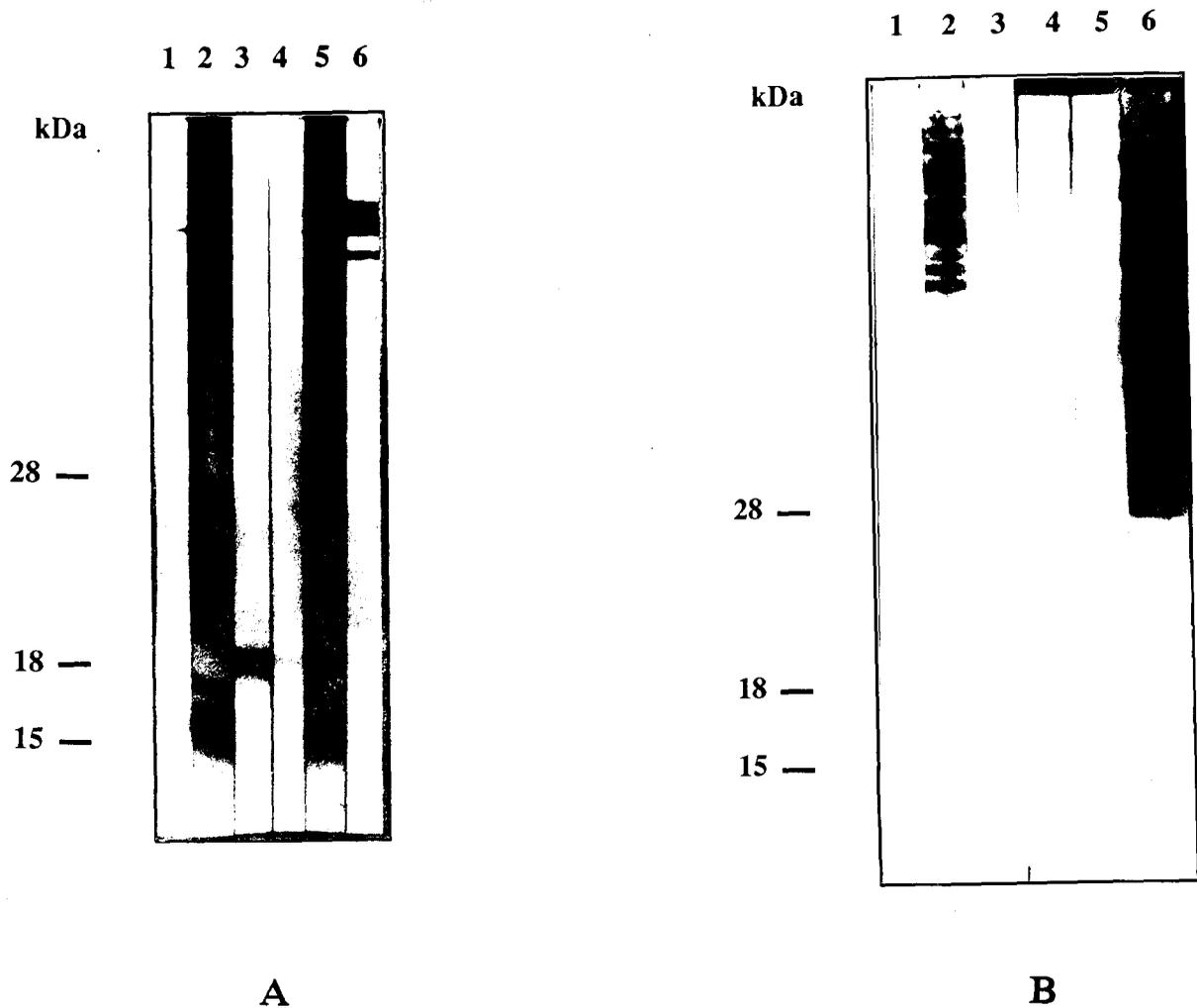


Fig 3. Expression of SmPHGSHpx during the life-cycle of *S.mansoni*. Western blots of total extracts. 3A: Female worm extract (lanes 1, 2, 3) and male worm extract (lanes 4, 5, 6) probed with normal rabbit antibodies (lanes 1 and 6), rabbit serum directed against whole worm antigen (lanes 2 and 5) and with anti-C term-PHGSHpx rabbit immunoglobulins (lanes 3 and 4). 3B: Egg extract (lanes 1, 2, 3) and cercariae extract (lanes 4, 5, 6) probed with normal rabbit antibodies (lanes 1 and 5), rabbit serum directed against whole worm antigen (lanes 2 and 6) and anti-Cterm-PHGSHpx rabbit immunoglobulins (lanes 3 and 4).

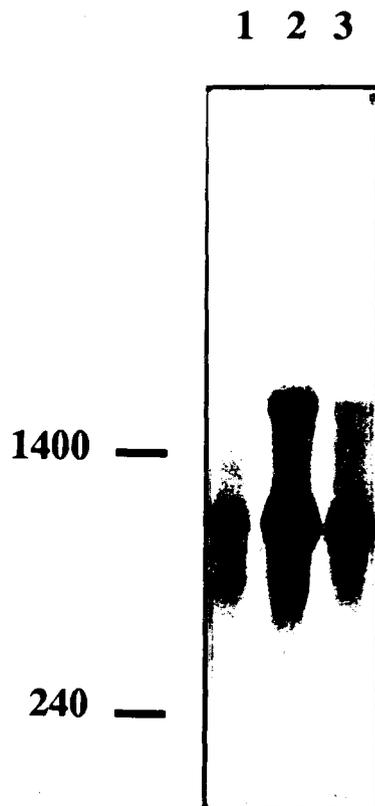


Fig 4. Analysis of mRNA transcripts for SmPHGSHpx in different life-cycle stages. Northern blot of total mRNA preparation from eggs (lane 1), cercariae (lane 2), adult worms (lane 3) probed with the ^{32}P -labelled SmPHGSHpx cDNA.

3.4. Search for putative regulatory DNA sequences in the 5' flanking region of the *SmPHGSHpx* gene

Fig. 5 shows the sequence of the 5' flanking region of the *SmPHGSHpx* gene from nt -1164 to the nt at -1 from the cap site (see [2]). The sequence was derived from a 7 Kb *Eco* RI fragment from EMBL3 clone 10 using both the nested deletion technique and PCR to generate fragments for sequencing. We have confirmed that the sequence agrees with the corresponding fragment in cercarial DNA both by PCR using the oligonucleotides boxed in Fig. 5 and Southern blotting using the PCR-generated fragments and the full-length cDNA as probes (not shown). The described sequence contains an extended TATA box (5'TAAATA3') at -32 and a putative CAAT box (5'CAAT3') at -74. In view of the localization of the *SmPHGSHpx* protein in female reproductive organs, we have searched for putative hormonal control elements in the promoter region. Only a monomeric estrogen response element (5'GGTCAA'3) is present at -486. However, palindromic sequences are present, including an inverted repeat motif 5'GGTACTnnGAGTACC'3 sequence at -232 and a direct repeat sequence 5'TAGGCTnnnTAGGCT3' at -1190 that are reminiscent of response elements for nuclear hormone receptors. In contrast, no AP-1 sites, implicated in the oxidative stress response, are present. Similarly, no regulatory response elements for chorion gene expression were found. Elements similar to the HSE II (heat shock element) described by Levy-Holtzman and Schechter [22] are present at positions -736 and -129, but they are of the 5'GAAnTTC3' type, shown not to be functional.

- 1164 ACTTTGAGAAGTCTAGGCTGATTAGGCTTAAAGATGCGCCAGGTTTCCTAGTCTATACACCTTTAGCAAGGTGACTCCGGAAAIGTTTTAGGGCATAACTTGGTTGAGTAGTTGTTTATCA
 - 1044 ACACAATGTCGTGCTCAAAACGAGCTTTTGGTTCCGAGCTTTCCTCTCCTTGACTCTATGGAAAATGGCTGATCTGTGCTGTGATCGGACTTCGGCTTTTCGACCTTTTGGTGGGGG
 - 924 TAGGATTTCCTTTAAACGTCATTTTGTCTGTTTTTTTCTTACGACCTGTACTCAATCGTCGACGTTGTTTGGAGTAGTAACCACAGTCGCGTCAGGAGTACTATGAGATTCGGAGGGTTGA
 - 804 GGACGACTTGGGAGGTTGGGCCGTCTTCTCACTGGAAACTGACTAAGCCTTGCGGTTTCGGCTTCCGGAAGTTCCCTTCTGGGTATCATTTTATAGATACGGGAGACAGTAGGGACCTTTT
 - 684 TTTTCGCGAGTTTCTGGTTGGGACAGACCTCTTTGGTGGCTGTCCTTCTCCTTCGGACGATGTCAGTCAGCATTTTTAAAGACTCACTTGTGTCTGTCTTACATCAATCTGCGTGTGCGACA
 - 564 GACTCGAGTTCTGACCGACGTGTCCCGACCCGCGCTTGCCGGGACACTTCTCGCAGCATTGATCATTGAGATGGTCTCGGTCAAAGGCTATTTGCGTCCAGACATCACTGTTGACATAG
 - 444 CCATATCGAGCCATGCTTACTAAACCGTTTGAAGCCGCAAGCGTTAGATTGATGCAAACTTCGTAGTACCAACCTTTGCACTCATCGCACTGCATGACGCTGTCAACAGGATATCAACA
 - 324 TCCTGGGCGCCGGCAAATGCTTTTGTGACCTTCCAGTCATTTTAGGATGAGAAAGTGAGTTTGGACTAAAAGTAGAAAAAAACTGTAAATAGTTAGAACCAAAGTACTAACAGATAC
 - 204 AATAGAAAAACAAGGTACTCTGGAGTACCGACGATAAAACTATTTAGGATACCAAAAATGATACTCTAGTCGAAAAGAAATTCACTCAAAATATAGACAGTAGTCTTGATACGTTAAATAA
 - 84 CGATCAAAACAATAGAACTACTCAACGACGAAAAATTACCACTGTCCTTTTAAATAGCGCGCGTGTGCGAGAATGCATTTT+1

Fig 5. The nt sequence of the 5' flanking region of the SmPHGSHpx gene. Putative CAAT and TATA boxes are underlined. Oligonucleotide sequences used for PCR and sequencing are boxed. Bold underlines show direct repeat and palindromic sequences. The bold box shows the putative estrogen responsive element. The HSE II-like elements are double undrelined.

4. Discussion

Although an apparently full-length recombinant SmPHGSHpx molecule was produced in the cytosolic fraction of baculovirus infected Sf9 cells, the amounts of protein were always very low, even when the medium was supplemented with sodium selenite. Moreover, no enzyme activity attributable to this protein was detectable toward classical substrates of GSHpxs. An enzymatically active form of gp 29 produced in insect cells has been reported [23]. However, gp 29 is a GSHpx-like protein that contains a cysteine residue at the equivalent position to the SeCys in SmPHGSHpx. The feeble quantity of SmPHGSHpx produced may therefore have been due to poor incorporation of SeCys in the Sf9 cells and we have therefore determined whether the structures required for recognition of the TGA codon are present in the 3'UTR of the schistosome SmPHGSHpx mRNA. Alignment of the 3'UTR region of SmPHGSHpx with the 3'UTR consensus from different selenoproteins is presented in Fig 6A. Consensus sequences derived from these enzyme families correspond to those described in [11]. In all three consensus sequences, motif elements 5'ATCA'3; 5'T(n)AAA'3 and 5'TGnT'3 are observed. The structural organisation of the 3'UTR region is most closely similar within the PHGSHpx family than with other selenoenzymes. When the complete 3'UTR of SmPHGSHpx was subjected to analysis of possible secondary structure formation (using the RNAfold program of PCGENE, Intelligenetics, USA), a stem-loop structure of considerable stability (-41.4 kCal) was obtained, and the overall consensus sequences presumed to be relevant to the correct TGA translation are found at or near the terminal major loop (Fig 6B). These data suggest that the mechanism of recognition for the opal SeCys codon in eukaryotes

SmPHGSHpx	AATTCTCGC - TATATGACGA T-GGCAATCT CAAATGTTCA ----- -TTGGTTGCCQ ATTTGATGAA ATCA
Pig PHGSHpx	CCACCTGGCA CCCATGACAG T-CTG - C-CT AAAAACCAGC ----- CCTGGT-GG- ----GOCAGA CTCG
PHGSHpx consensus CT . G ATGAC . . T - CT . AAA ----- . . TGGT . G G A . TC .
GSHpx consensus	. GG . . TT . G . C . ATGA . GG TGTT . CCTCT AAA . T . C . , GG A . . CCTGAT . . T . ---- AAAAT . C . . .
5'DI consensus	T . . ATATTTG TTTATGATGG . . CACAG . . T AAAGT . CACA C.GCTGTG.A CTTGAT-T . . ---- AAAATG T . . .

Fig 6A: Alignment of the 3'UTR region of pig and *S.mansoni* PHGSHpx genes and of the 3'UTR consensus sequences from three families of selenoproteins. Conserved elements are shown in bold-face.

follows similar rules but is not necessarily interchangeable between organisms. The three-dimensional conformation of the structure maybe a limiting factor for the formation of a hypothetical species-specific translation factor-RNA complex.

Immunolocalization showed that SmPHGSHpx is present in vitelline cells and nowhere else in adult worms. This result is completely different from the known localization of PHGSHpx in rodents. The presence of PHGSHpx has been reported in all tissues [9], and high levels were described in rat testes after puberty. In *S.mansoni*, SmPHGSHpx seems to be a female stage-specific protein. Its expression requires a mature reproductive system and the protein might therefore be implicated in the formation of eggs. These results were confirmed by Western blotting. The protein is principally detected in adult female worms and eggs with only very small amounts in extracts of male worms. The absence of SmPHGSHpx from cercariae is understandable in the light of the immunolocalisation data. However, the presence of specific mRNA transcripts in cercariae was a surprising result. The expression of SmPHGSHpx mRNA in miracidia and 3 h schistosomula is under investigation. The search for possible regulatory elements in the 5' flanking region of the SmPHGSHpx gene, and in particular consensus recognition sequences involved in hormonal control of expression showed only the presence of a monomeric estrogen response element 5'GGTCAA'3 at -486. This response element has also been reported in the 5' flanking region of the pig PHGSHpx gene [3]. The presence of proteins binding the estrogen response element consensus sequences has been detected in male and female worms [24]. These observations, though in agreement with the hormone regulated expression of PHGSHpx observed in the rat [9], have to be confirmed using functional assays. The absence of AP-1 sites from this region

supports the view that SmPHGSHpx is probably not involved in the defense against oxidative stress. Functional AP-1 sites have been described in the promoters of both the *S.mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase [25] and *S.mansoni* calreticulin [26].

The presence of similar levels of mRNA for SmPHGSHpx at all developmental stages tested, including cercariae from which the protein was absent, argues in favour of a post-transcriptional control of the expression of this enzyme. This might be related either to the availability of specific translational factors implicated in the recognition of the TGA-SeCys codon or to the availability of selenium, particularly in the case of cercariae. The investigation of the control of expression of SmPHGSHpx and of its biochemical and enzymological characteristics (Maiorino *et al*, in preparation) will lead us to a greater understanding of this very singular type of GSHpx enzyme in *S.mansoni*.

Acknowledgements

We wish to thank C. Drolez and D. Lazarecki for technical assistance and J.P.Kuznierz for synthesizing the oligonucleotides. We particularly thank H.Gras-Masse and E. Diesis for help with synthesizing and coupling the C-term SmPHGSHpx peptide. We particularly thank Dr M. Maiorino for her help and advice. We acknowledge the support of Volvic S.A. for the maintenance of the schistosome life-cycle. This work was supported by the CNRS, INSERM and the Groupement de Recherches et d'Etudes sur les Génomes. C.R. is a doctoral fellow of the Institut Pasteur de Lille.

References

- [1] Williams, D., Pierce, R.J., Cookson, E. & Capron, A. (1991). Molecular cloning and sequencing of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 52,, 127-130
- [2] Roche, C., Williams, D., Khalife, J., LePresle, T., Capron, A. & Pierce, R.J. (1994). Cloning and characterization of the gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase. *Gene*, 138, 149-152
- [3] Brigélius-Flohé, R., Aumann, K-D., Blöcker, H., Gross, G., Kiess, M., Klöppler, K-D., Maiorino, M., Roveri, A., Schuckelt, R., Ursini, F., Wingender, E. & Flohé, L. (1994). Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase: genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, 269, 7342-7348
- [4] Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J. & Koyama, J.(1990). Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J. Biochem.*, 108, 145-148
- [5] Chu, F.F., Doroshov, J.H. & Esworthy, R.S. (1993). Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependant glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.*, 268, 2571-2576.
- [6] Maiorino, M., Chu, F.F., Ursini, F., Davies, K.J.A., Doroshov, J.H. & Esworthy, R.S. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione

peroxidase is the 18 kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *J. Biol. Chem.*, 266, 7728-7732

[7] Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L. & Gregolin, G. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochem. Biophys. Acta.*, 710, 197-211

[8] Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F. & Girotti, A.W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, 265, 454-461

[9] Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P. & Ursini, F. (1992). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis: gonadotropin dependence, and immunocytochemical identification. *J. Biol. Chem.*, 267, 6142-6146

[10] Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J. & Baron, C. (1991) Selenocystein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends in Biochem. Sci.*, 16, 463-467

[11] Berry, M.J., Banu, L., Mandel, S.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W. & Larsen, P.R. (1991) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in Type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*, 353, 273-276

[12] Heider, J., Baron, C. & Böck, A. (1992). Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.*, 11, 3759-3766

[13] Berry, M.J., Banu, L., Harney, J.W. and Larsen, P.R. (1993) Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *The EMBO J.*, 12, 3315-3322.

[14] Merrifield, R.B. (1983). Solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem.Soc.*, 85, 2149-2151

[15] Lee A.C., Powel, J.E., Tregaer, G.W., Niall, H.D. & Stevens, V.C.(1980). A method for preparing beta-HCG COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition. *Mol. Immunol.*, 17, 749-754

[16] Vaitukatis, J., Robbins, J.B., Nieschalaf, E. & Ross, G.T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *Journal of Clinical Endocrinology*, 17, 988-991

[17] Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels onto nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354

[18] Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, J., and Rutter, W.J.(1978). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18, 5294-5299.

- [19] Lehrach, H.; Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical reexamination. *Biochemistry*, 16, 4743-4747.
- [20] Maiorino, M., Gregolin, F. & Ursini, F. (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. In: *Methods in enzymology*; Packer, L. and Glazer, A.N eds. Academic Press, Inc., 186, 448-457
- [21] Erasmus, A.D. (1987) The adult schistosome: structure and reproductive biology. In: *The biology of schistosomes. From genes to latrines* (Rollinson, D. and Simpson, A.J.G., eds), pp 51-82. Academic Press, N.Y.
- [22] Levy-Holtzman R. & Schechter, I. (1994). Schistosome extracts with heat factor activity revealed by the gel shift assay. *Parasitology*, 108, 35-42
- [23] Cookson, E., Tang, L. & Selkirk, M.E. (1993). Conservation of primary sequence of gp29, the major cuticular glycoprotein, in three species of lymphatic filariae. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 58, 155-160
- [24] Giannini, A.L.M., Caride, E.C., Martin-Braga, V.M. & Rumjanek, F.D. (1995). F-10 nuclear binding proteins of *Schistosoma mansoni*: structural and functional features. *Parasitology*, 110, 155-161

[25] Zemzoumi, K., Dissous, C., Cochu, A., Trolet, J., Capron, A. & Mc Nair, A. (1995). *Schistosoma mansoni*: interaction of nuclear extracts with the CCAAT-binding site revealed by gel shift assay. *Exp. Parasitol.*, 110, 149-154

[26] Khalife, J., Godin, C. & Capron, A. (1995). Involvement of an anti-oxidant response element in transcriptional regulation of *Schistosoma mansoni* calreticulin: role of AP-1. *Parasitology*, in press.

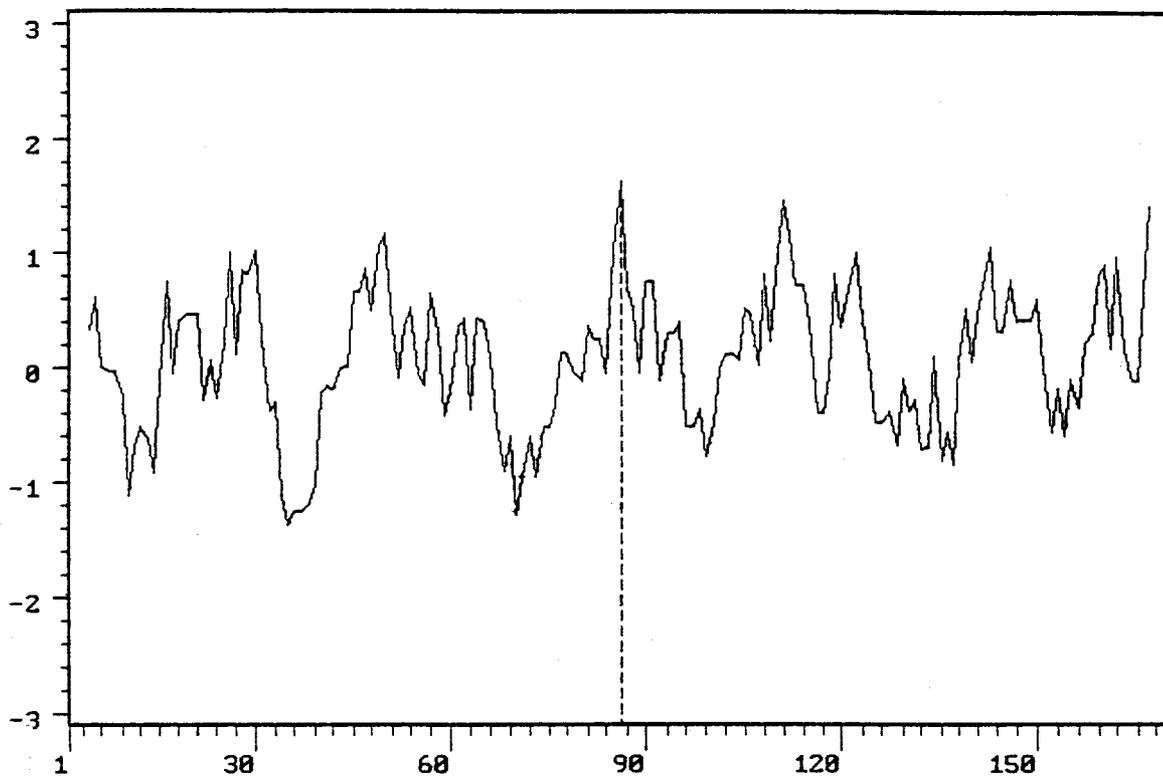


Fig. 18: Profil hydrophile de la Sm(PH)GSHpx

Les principaux résultats présentés dans l'article sont résumés ci-dessous:

- Nous avons réalisé la synthèse d'un peptide en collaboration avec H. Gras-Masse, correspondant à la séquence C-terminale de la Sm(PH)GSHpx étudiée. Cette région a été retenue d'après l'étude du profil d'hydrophilie de la protéine. En effet, cette extrémité nettement hydrophile peut constituer un épitope accessible (Fig. 18).

L'immunisation d'un lapin avec ce peptide couplé à l'ovalbumine (grâce à l'ajout d'une cystéine) nous a permis d'obtenir un anti-sérum de lapin spécifiquement dirigé contre l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx. Cet anticorps a ensuite été utilisé pour l'exploration de l'expression de la protéine native *in vivo* et pour l'identification de la protéine entière produite *in vitro*.

- La production de Sm(PHGSH)px *in vitro* par le baculovirus recombinant représente environ 0,05% du taux total de protéines synthétisées. Ce faible pourcentage n'est pas amélioré par la supplémentation du milieu en sels de sélénium. De plus, des expériences de dosages d'activité enzymatique vis à vis de l'H₂O₂, du cumène hydroperoxyde, du tert-butyl hydroperoxyde et de la phosphatidylcholine hydroperoxyde à partir des fractions cytosoliques des cellules infectées ne révèlent pas d'activité significative (résultats non présentés).

Une hypothèse possible serait la synthèse d'une protéine recombinante ne présentant pas de SeCys, résultante d'une reconnaissance et d'une traduction défectueuse du codon "TGA-SeCys" au sein de l'ARNm correspondant. L'alignement des séquences consensus de la PHGSHpx de porc et de la Sm(PH)GSHpx révèle la présence de motifs conservés. Il s'agit principalement

de séquences 5'AUGA3'; 5'U(N)AAA3' et 5'UGNU3', retrouvées également au sein de séquences 3' non codantes de différentes GSHpxs ainsi que de la 5'DI (Berry et coll., 1991).

La modélisation en deux dimensions de la région 3' non codante de la Sm(PH)GSHpx révèle une structure très stable présentant une conformation d'épingle à cheveux voisine de celles observées pour d'autres sélénoprotéines mais de sensibles différences sont observables au niveau des boucles mineures (Fig. 19). Les motifs consensus sont retrouvés dans et à proximité de la boucle majeure.

Lorsque l'on compare les séquences des régions 3'nc des gènes de la GSHpx-1 de rat, de la PHGSHpx de porc et de la Sm(PH)GSHpx, on constate que la distance entre le codon SeCys et le motif de séquence 5'AUGA3' est variable au sein des 3 espèces étudiées (744 pb pour le rat; 588 pb pour le cochon et 438 pb pour *S. mansoni*). Par contre, la distance entre les motifs 5'AUGA3' et 5'U(N)AAA3' est bien conservé (12 pb chez le rat, 13 pb chez le cochon et 12 pb chez *S. mansoni*). Il a été démontré par Heider et ses collaborateurs (1992) que la distance entre le codon SeCys et les motifs de séquence identifiés ici est déterminante pour l'insertion d'une SeCys au sein de la fDhF d' *E. coli*. Par contre, les travaux de Berry et de ses collaborateurs (1993) démontrent une complète flexibilité de la distance entre le codon SeCys et les motifs de séquences 5'AUGA3' et 5'U(N)AAA3' chez les eucaryotes.

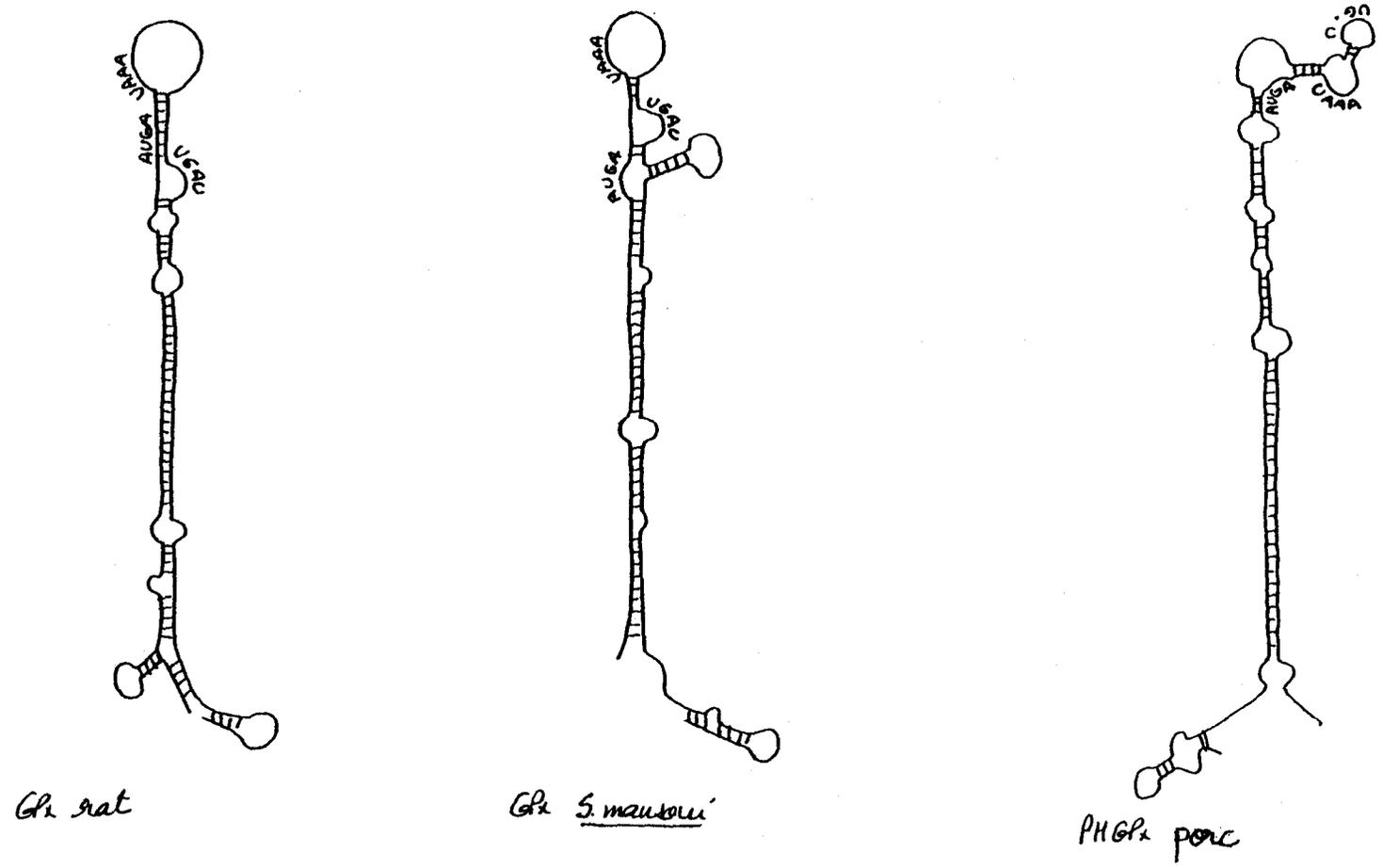


Fig. 19: Structures secondaires des régions 3'nc des ARNm de trois sélénoprotéines
 (d'après Berry et coll., 1991; Brigélius-Flohé et coll., 1994; Roche et coll., 1994)

- La localisation de la protéine native révèle être spécifique de la femelle. Elle semble limitée aux cellules vitellines, présentes également dans l'œuf où elles assurent leur fonction nourricière. Chez le mâle, les rares cellules vitellines retrouvées dans le parenchyme suite à un phénomène d'hermaphrodisme, synthétisent également la Sm(PH)GSHpx. L'investigation de la présence de la protéine native à différents stades de développement du parasite par la technique de Western blot confirme ce résultat : la protéine est présente au niveau de l'œuf et est essentiellement retrouvée chez la femelle.

La cercaire, ne possédant pas de cellules vitellines, ne présente pas de Sm(PH)GSHpx.

Par contre, l'exploration de la présence d'ARNm spécifique révèle l'existence du messager à un taux similaire au niveau de l'œuf, de la cercaire et de l'adulte, suggérant un mécanisme de régulation post-transcriptionnel. Il faut en effet remarquer que la cercaire se trouve dans un environnement probablement déficitaire en Se.

- Lorsque l'on étudie la séquence de la région promotrice, nous retrouvons seulement l'existence d'un élément de séquence 5'GGTCAA3' (-486; -481 pb) monomérique correspondant à la séquence de reconnaissance par le récepteur nucléaire de l'œstrogène. Cependant, cet élément a été décrit comme actif uniquement sous forme dimérique. Nous retrouvons également une séquence palindromique 5'GGTACTCNGAGTACC3' (-217; -232 pb) et une séquence répétée 5'TAGGCT(NNN)TAGGCT3' (-1176; -1190 pb), semblables à celles impliquées dans la liaison de récepteurs hormonaux nucléaires potentiels. Aucun site AP-1, impliqué dans la réponse à un stress oxydatif, n'a été identifié.

Ces différents résultats soulèvent plusieurs interrogations :

- L'hypothèse selon laquelle nous obtenons une faible quantité de protéine inactive, issue d'une lecture erronée du codon TGA-SeCys, peut être confirmée par deux expériences complémentaires:

a) D'une part, il serait envisageable de confirmer l'absence de sélénium en réalisant une culture de baculovirus recombinant dans un milieu enrichi en sélénium radio-marqué (⁷⁵Se);

b) D'autre part, si l'on suppose qu'une grande majorité de transcrits produits correspondent à la protéine tronquée (le codon TGA est reconnu comme un codon "Stop"), il serait intéressant d'évaluer le taux de protéine tronquée produite en utilisant un anti-sérum dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine ou dirigé contre la protéine native purifiée.

- La structure secondaire de la région 3' non codante du gène de la Sm(PH)GSHpx présente de grandes analogies avec celles obtenues à partir des séquences d'autres gènes de sélénoprotéines. Cependant elles ne sont pas identiques. Ces différences suffisent-elles à rendre le mécanisme de reconnaissance du codon "TGA-SeCys" spécifique de l'espèce? Cette spécificité est-elle basée sur la correspondance entre un facteur d'élongation (de type SELB) particulier par type de structure tridimensionnelle de la région 3' non codante du gène?

Les difficultés de synthèse *in vitro* de la Sm(PH)GSHpx obligent à orienter différemment l'approche vaccinale par une stratégie basée, par exemple, sur le peptide de synthèse utilisé ici.

- La localisation très spécifique de la Sm(PH)GSHpx, au niveau de l'appareil reproducteur de la femelle, permet une hypothèse quant à sa fonction biologique : elle serait en effet impliquée dans la formation des œufs et ainsi dans la fécondité du parasite. Quelle est alors sa place au sein du système de défense contre le stress oxydatif? L'identification d'autres formes de GSHpxs au sein du schistosome permettrait d'élargir les perspectives actuelles.

Il est, de plus, intéressant de constater que la PHGSHpx a été principalement caractérisée au niveau des testicules de mammifères (Roveri et coll., 1992). Or chez le schistosome, la femelle est hétérozygote (ZW). Peut-on s'attendre à retrouver le *locus* correspondant à la Sm(PH)GSHpx sur le chromosome W de la femelle? L'hybridation *in situ* sur les chromosomes de *S. mansoni* permettrait d'apporter un élément de réponse.

- La régulation de l'expression de cette sélénoprotéine est spécifique de la femelle et semble être corrélée à l'état de développement du schistosome. La synthèse de l'ARNm est constitutive, impliquant un mode de régulation de l'expression post-transcriptionnelle (disponibilité en sélénium ou présence d'un facteur d'élongation spécifique; implication hormonale). Existe-t-il un important taux d'ARNm spécifique chez le mâle? Quelle est la signification des séquences consensus retrouvées dans la région 5' adjacente au gène? La région étudiée correspond-t-elle à une séquence promotrice constitutive?

- Parce que la synthèse de la Sm(PH)GSHpx est régulée au cours du développement et de la maturation du parasite (Roche et coll., 1995), il serait intéressant d'explorer l'activité enzymatique PHGSHpx au cours du cycle de développement du schistosome. De plus on pourrait envisager l'étude d'un inhibiteur d'hormones stéroïdiennes, tel que le Tamoxifène, sur l'expression

enzymatique de la protéine.

L'exploration fonctionnelle de la région promotrice permettrait d'apporter de précieux éléments de réponse concernant la régulation de l'expression de la (PH)GSHpx de *S. mansoni*.

Approche dans l'analyse fonctionnelle de la région promotrice du gène de la Sm(PH)GSHpx

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à la mise en évidence d'une éventuelle fonction promotrice de la région 5' adjacente au gène étudié. Pour cela, nous avons choisi de cloner en amont du gène de la luciférase (vecteur pLuc, InVitrogen), soit la région complète représentée par le fragment de restriction *Sal I/ Eco RI* (possédant l'ATG et le premier intron), soit le fragment *Sal I/ Pst I* (Fig. 20 A). L'analyse d'un signal chimio-luminescent au sein de cellules Jurkat ainsi transfectées est quantifiée par spectrophotométrie. La co-transfection d'un vecteur porteur d'un gène codant pour une β -galactosidase (vecteur pSV/ β gal, Proméga) permet de rapporter l'activité luciférase au nombre de cellules effectivement transfectées.

Les résultats de cette étude (Fig. 20 B) révèlent une activité promotrice du fragment *Sal I/ Pst I*, équivalente à celle d'un promoteur d'activité dite moyenne (correspondante à celle du promoteur du gène de la thymidine kinase). Cependant, cette activité promotrice n'est effective que dans l'orientation "anti-sens" 3' vers 5'. Le fragment *Sal I/ Eco RI* ne présente pas d'activité. La présence du codon ATG perturbe peut-être la synthèse d'une enzyme luciférase fonctionnelle.

1 GTTCGACAGACTCGAGTTCTGACCGACGTCGTCCGACCCGCGCTTGCCGGG
Sal I
51 AACACTTCTCGCAGCATTGATCATTGAGATGGTCTCGGTCAACAGCTATT
101 GCGTCCAGACATCACTGTTGACATAGCCATATGCAGCCATGCCTACTAAA
151 CCGTTTGAAAGCCGCAAGCGTTAGATTCATGCAAACCTTCGTAGTACCAAC
201 CTTTGCACCTCATCGCACTGCATGACGCTGTCAACAGGATATCAACATCCT
251 GGGCGCCGGCAAATGCTTTTGTGTCACCTTCCAGTCATTTTAGGATGAGA
301 AAGTGAGTTTGGACTAAAAGTAGAAAAAAACTGTAAATAGTTAGAACCA
351 AAGTACTAACAGATACAATAGAAAAACAGGTA CTCTGGAGTACCGACGAT
401 AAAACTATTTAGGATACCAAAAAATGATACTCTAGTCGAAAGAATTCACT
451 CAAATATTAGACAGTAGTCTTGATACGTTAAATAACGATCAAACAATAG
501 AATCTACTCAACGAGGAAAAAATTACCACTGTCCTTTTAAATAGCGCGC
551 GTTGTGCGAGAATGCATTTTGTACTAATTTACATAGACCTCTCTGATAAG
601 TTTTTCACACATTCAGATACTTACCTGTGGACATACGTGATCCAATGCTG
651 CAGATTAAGGAGACTCTTTGATCAAATTCTGCTTCAATTCTGTTCCCAAC
Pst I
701 CATTTGAAACACTTGTACACCAGCCTAGAGGTGTTTTGCCGCTCCTTATT
751 CAAATCTCTCGAAACATTGTTACGATTAGATGTAACGCGATGGTACGTT
801 GTGGTCCCTCTAATTTCTTCCTTAAGTCTTCATCTCACAAGTCTTGGAAT
Eco RI
851 TC

Fig. 20 A: Séquence de la région promotrice *Sal I*/ *Eco RI* du gène de la (PH)GSHpx de *S.mansoni*.

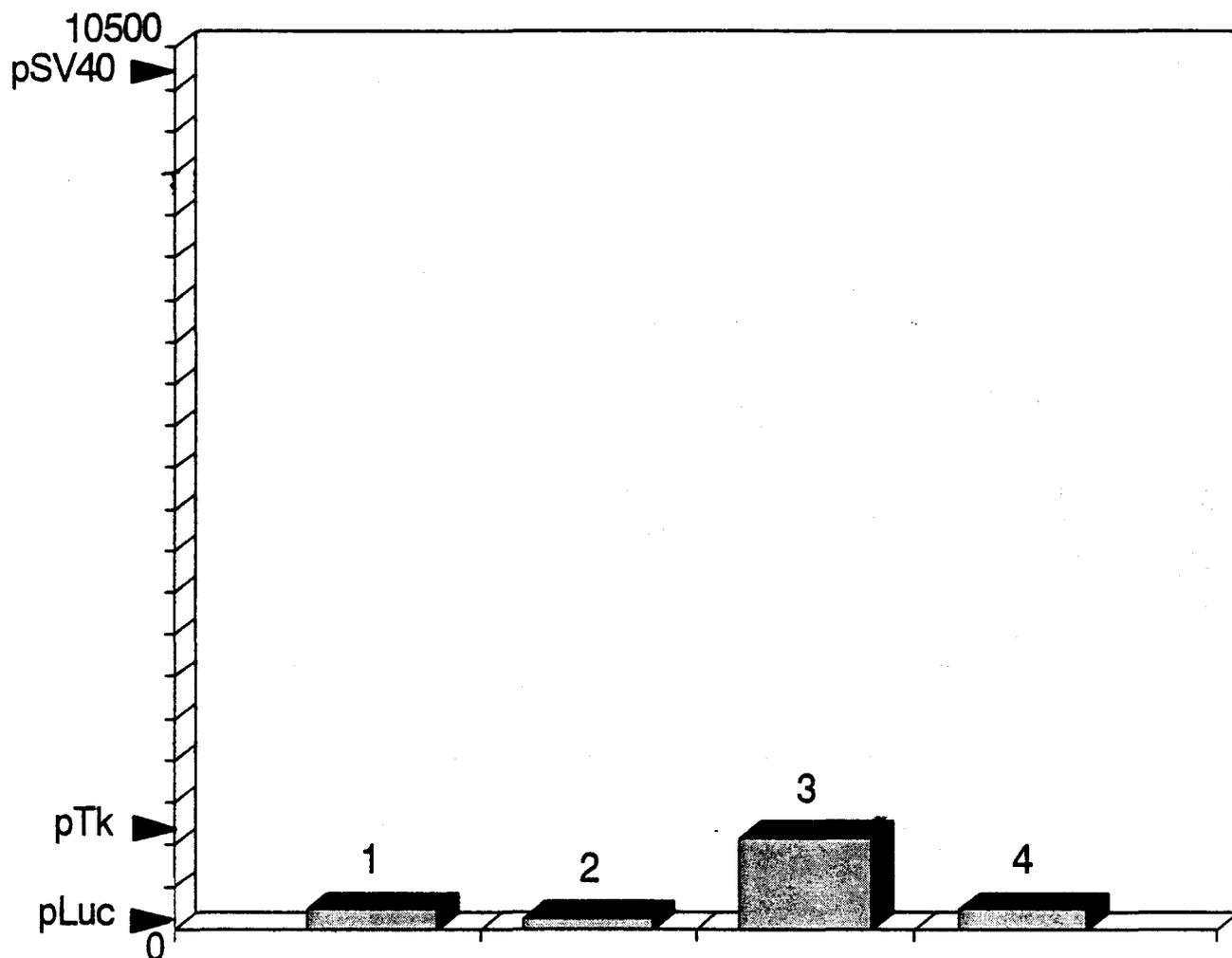


Fig. 20 B: Représentation de l'activité luciférase mesurée au sein de cellules Jurkat transfectées.

Les valeurs obtenues avec les plasmides de contrôle sont positionnées sur l'axe d

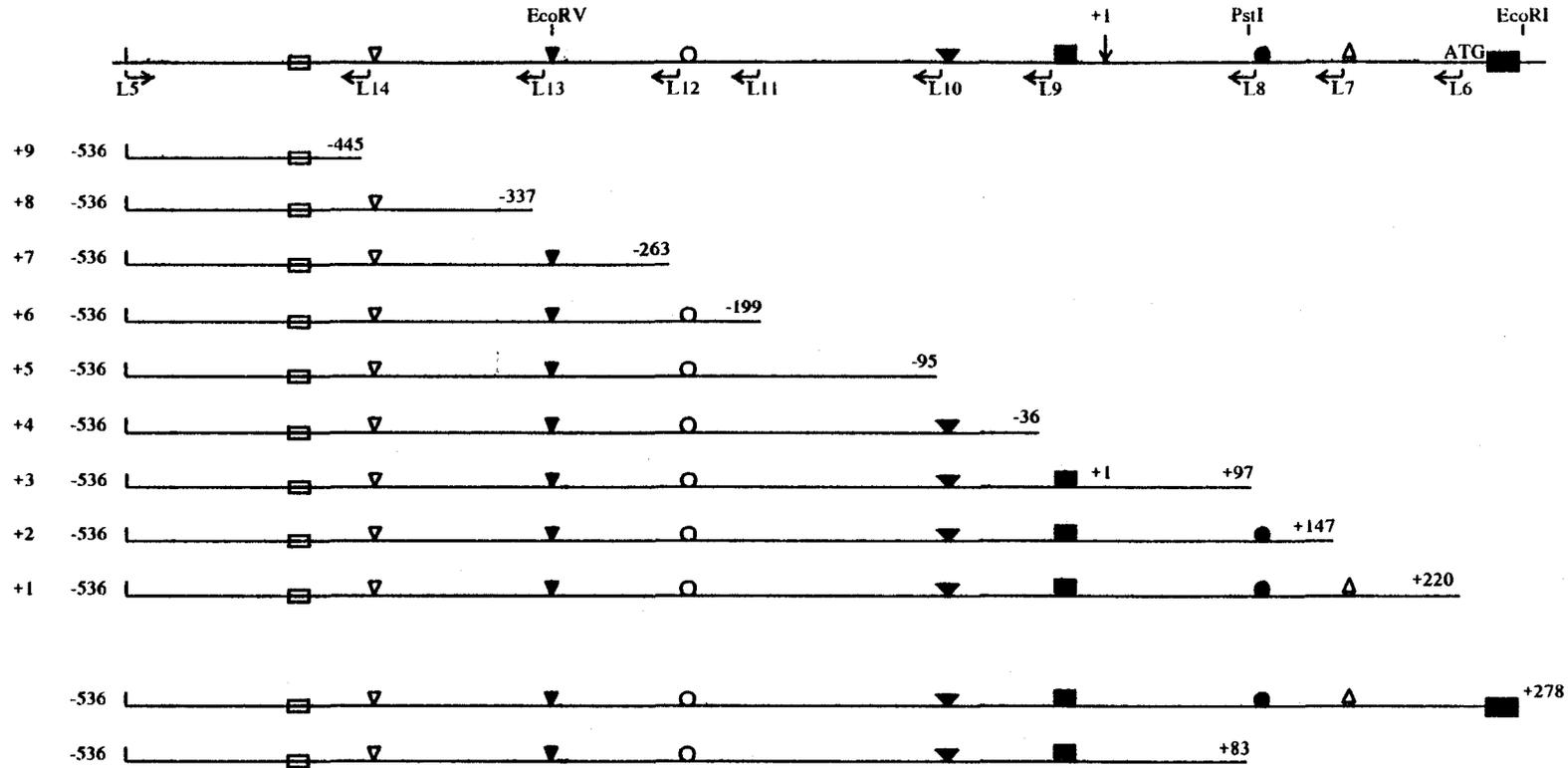
- 1: construction *Sal* I/ *Eco* RI; sens (5' vers 3')
- 2: construction *Sal* I/ *Eco* RI; anti-sens (3' vers 5')
- 3: construction *Sal* I/ *Pst* I; sens (5' vers 3')
- 4: construction *Sal* I/ *Pst* I; anti-sens (3' vers 5').

Afin de vérifier la fonctionnalité de la région étudiée et de permettre de cerner les régions indispensables à sa fonction, nous avons choisi de réaliser des délétions progressives par PCR. La position des amorces utilisées dans cette étude correspond à la séquence du côté 5' de régions pouvant potentiellement représenter des motifs régulateurs de l'expression (séquences palindromiques; séquences répétées). Les séquences des amorces utilisées sont présentées ci-dessous:

L5	: 5' TCT GAC CGA CGT GTC CCG A 3'	19 mers
L6	: 5' CGC GTT ACA TCT AAT CGT GAA 3'	21 mers
L7	: 5' TAC AAG TGT TTC AAA TGG TTG GGA 3'	24 mers
L8	: 5' GAG TCT CCT TAA TCT GCA GCA 3'	21 mers
L9	: 5' GGA CAG TGG TAA TTT TTT CCT 3'	21 mers
L10	: 5' TAT CAA GAC TAC TGT CTA TAT TTT G 3'	25 mers
L11	: 5' CTA TTG TAT CTG TTA GTA 3'	18 mers
L12	: 5' CTC ACT TTC TCA TCC TAA AA 3'	20 mers
L13	: 5' TTG ACA GCG TCA TGC AGT GCG A 3'	21 mers
L14	: 5' ATG TCA ACA GTG ATG TGT GGA 3'	21 mers

La région concernée comprend 756 pb en amont du codon d'initiation ATG.

La position des amorces sur cette région est illustrée dans la figure 21. Chaque fragment délété a été sous-cloné dans les deux directions, en amont du gène déterminant la synthèse de la luciférase.



- | | | | |
|---|---|---|--|
| ▽ | Motif répété direct 5' AGCCATxxxxAGCCAT 3' | ■ | TATA box like element 5' TTAAATA 3' |
| ▼ | Motif répété inversé 5' CAGGATxxxxxxATCCTG 3' | ● | Palindrome 5' TTTGATCAAA 3' |
| ○ | Séquence "palindromique" 5' TTTTGACTAAAA 3' | △ | Séquence "SPI" inversée 5' CACCAGCCTA 3' |
| ▼ | Motif répété inversé 5' CGTTAxxTAACG 3' | □ | Séquence monomérique 5' GGTCAA 3' |

Echelle : 0 35pb

Fig. 21: Carte des délétions réalisées par PCR de la région promotrice de la Sm(PH)GSHp

Le dosage de l'activité luciférase engendrée avec différents fragments délétés ne conduit pas à un résultat reproductible dans le système utilisé (résultats non présentés). C'est pourquoi l'approche effectuée nécessiterait plusieurs nouvelles orientations:

- Il faudrait, d'une part, changer de lignée cellulaire. Il est bien évident que dans la mesure où le travail est réalisé en système hétérologue (il n'existe pas de lignée cellulaire de schistosome), il est nécessaire d'être très prudent quant aux observations énoncées;

- Peut-être que la région choisie pour l'étude est trop limitative;

- Il serait intéressant également de réaliser une approche plus restrictive, par la technique de retard sur gel, limitée uniquement aux séquences consensus observées. Cette approche permettrait de travailler dans un système homologue.

Notons cependant, si l'on considère que la synthèse de l'ARNm est constitutive, le promoteur du gène étudié doit être constitutif. Dans ce cas, l'absence d'éléments régulateurs connus au sein de cette séquence semble confirmer cette constatation.

D- Elaboration d'une construction phylogénique des GSHpx

Le clonage et la caractérisation enzymatique d'une (PH)GSHpx de *S.mansoni* permet pour la première fois la description d'une sélénoenzyme présentant une région 3' non codante déterminant l'incorporation de la SeCys chez un invertébré. De plus, le même mécanisme cinétique concerne les GSHpxs présentant, soit une SeCys, soit une Cys dans leur site actif. Ceci suggère que la spécificité de chaque enzyme appartenant à cette "super-famille" est le résultat d'une divergence à partir d'une protéine primitive dont le mécanisme cinétique a été conservé.

L'établissement d'une phylogénie basée sur la totalité des séquences protéiques correspondantes à des GSHpxs connues à ce jour (obtenues d'après les banques de données Protein ((SwissProt., NBRF-PR et Genbank), DNASTAR Inc., WI USA)) devrait nous permettre d'étudier l'origine et l'évolution des différentes formes de GSHpxs à travers le règne vivant.

Les résultats qui suivent ont été établis en collaboration avec le Dr Laudet:

Après alignement des séquences (MUST package, (Philippe, 1993)) des différentes protéines accessibles, plusieurs arbres ont été construits en utilisant deux approches: celle dite de "parcimonie" ou celle basée sur les distances génétiques. La validité des branchements des arbres obtenus a ensuite été testée de manière statistique par une méthode dite de "bootstrap" (Felsenstein, 1985). Les constructions phylogéniques obtenues par les deux approches sont similaires. Nous n'avons retenu que les valeurs de "bootstrap" supérieures à 90%. La figure 22 représente l'arbre phylogénique consensuel.

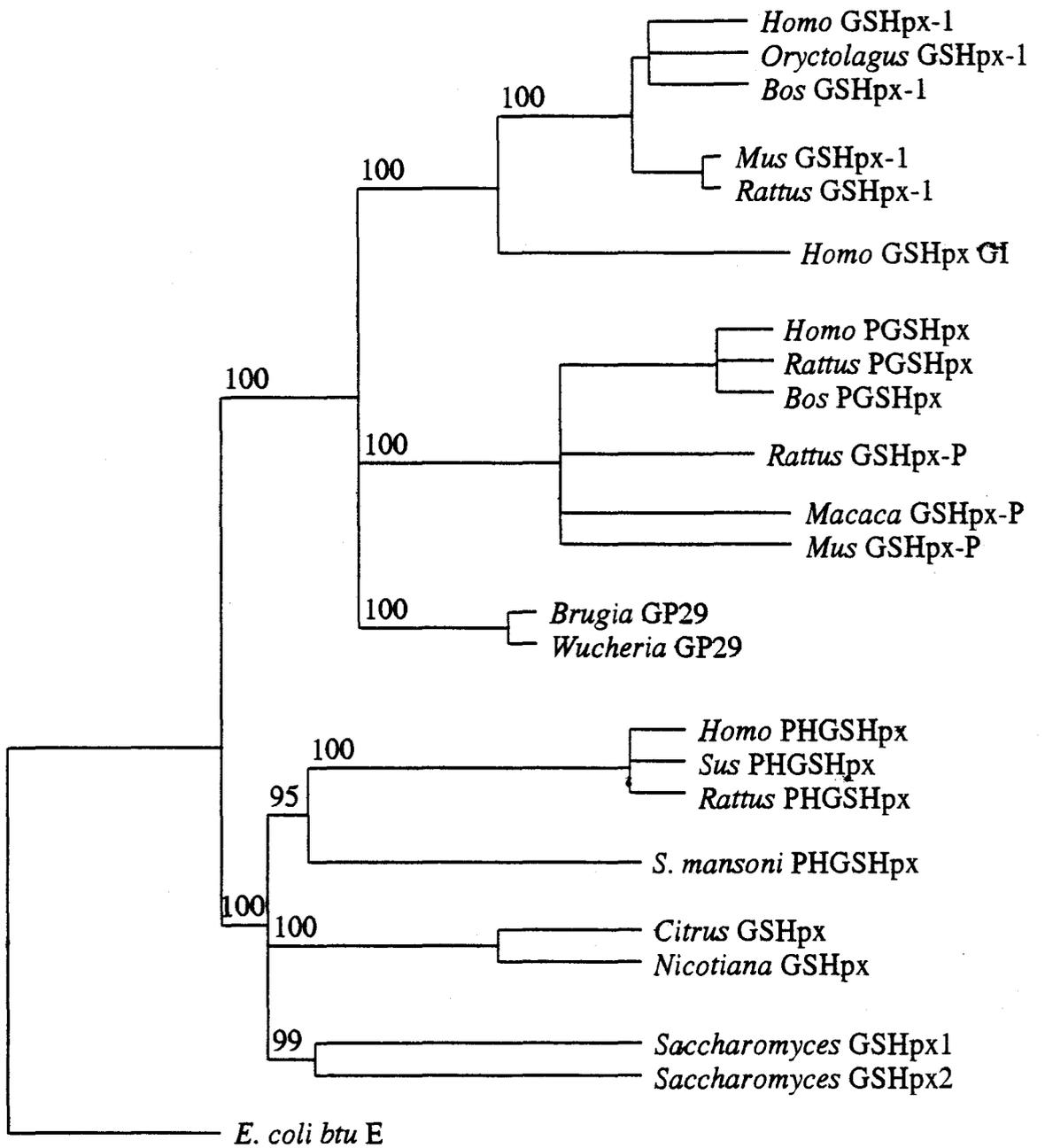


Fig. 22: Phylogénie moléculaire des glutathions peroxydases.

Cette représentation permet plusieurs remarques:

- On peut actuellement observer 5 à 7 types de gènes différents. Il s'agit de gènes présentant un codon TGA-SeCys (GSHpx-1; GSHpx GI; PGSHpx; PHGSHpx) ou de gènes ne présentant pas de codon TGA-SeCys (GSHpx-P; gp 29 et les GSHpxs de plantes, de levures ou de bactéries). Ces différents types de gènes sont originaires d'une duplication d'un gène primitif;

- Suivant la méthodologie utilisée, le gène de nématodes (gp 29) se retrouve plus ou moins lié au groupe représenté par GSHpx-1. Il faut cependant noter que l'horloge d'évolution interne des nématodes est plus rapide que celle des autres organismes étudiés (Philippe, 1993), ce qui peut expliquer les difficultés que l'on retrouve pour les situer au sein d'une phylogénie;

- Dans tous les cas analysés, le gène de *S. mansoni* se retrouve toujours fortement lié à la PHGSHpx de porc. Ce résultat est en accord avec l'étude enzymatique de la protéine native;

- On constate dans cette construction un déséquilibre dans la répartition des espèces au sein des deux principaux groupes. En effet, les GSHpx-1 ne sont représentées qu'au sein de mammifères. Cependant, si la dichotomie initiale s'est effectuée avant la séparation des eucaryotes et des procaryotes, on devrait retrouver au moins deux formes principales chez les espèces étudiées (et donc chez le schistosome).

Cette phylogénie soulève deux remarques principales:

- La séquence nucléotidique des GSHpxs-1 révèle un seul intron alors que les PHGSHpxs présentent plusieurs introns dans leur séquence. Or, la position de l'unique intron des gènes de GSHpxs-1 correspond exactement à la position du troisième intron des gènes de PHGSHpxs. Cette remarque suggère que cet intron représente probablement un des introns (ou l'unique intron) du gène primitif.

- Il est également intéressant de remarquer la présence d'enzymes Cys-GSHpxs au sein des deux principaux groupes. Il a été démontré que les GSHpxs ne présentant pas de Se dans leur site actif présentent néanmoins le même mécanisme catalytique que les SeCys-GSHpxs (Maiorino et coll., 1995b). Notons ici que ce mécanisme est différent de celui observé pour les peroxydases telles que la cytochrome C peroxydase ou les GSTs. De plus, bien que des sélénoenzymes existent au sein des procaryotes, la GSHpx Se-dépendante n'est pas retrouvée chez les bactéries.

Ces différentes constatations permettent deux hypothèses:

En effet, si l'on suppose que le gène ancestral présente une SeCys, on peut alors constater la perte du codon TGA à plusieurs reprises au cours de l'évolution. Il en résulte une perte de la fonctionnalité de la région 3'nc au sein des gènes concernés par absence de pression de sélection. Si l'on suppose, au contraire, un gène primitif ne présentant pas de SeCys, l' "invention" que représente l'insertion d'une SeCys au sein d'un codon TGA par l'intermédiaire d'un complexe mettant en jeu la structure 3'nc de l'ARNm, s'est alors effectuée deux fois de manière indépendante au cours de l'évolution. Mais cette deuxième

hypothèse représente un coût évolutif considérable.

L'intégration d'autres séquences d'enzymes apparentées à l'un des différents types de GSHpxs, et appartenant à des espèces primitives (mollusques, protozoaires ou anémones) ou non représentées (arthropodes) permettrait d'enrichir cette étude et de compléter nos connaissances concernant l'origine et l'évolution des GSHpxs à travers le monde vivant.

E- Exploration du pouvoir immunogène de la SmGSHpx

En terme de stratégie vaccinale, et si l'on considère les implications possibles de la Sm(PH)GSHpx dans la fécondité du parasite, il serait intéressant de savoir si la Sm(PH)GSHpx est un antigène naturellement représenté dans une population infectée et s'il peut donc potentiellement s'inscrire dans un projet de vaccin multigénique en association avec la Sm28 GST.

Afin d'explorer le pouvoir immunogène de la Sm(PH)GSHpx, 40 sérums humains ont été testés en Elisa. Le principe est de mettre en évidence d'éventuels anticorps humains spécifiques de l'extrémité C-terminale de la SmPHGSHpx au sein d'une population infectée.

Les 40 sérums utilisés représentent une population d'hommes et de femmes sénégalais entre 10 et 30 ans dont 30 (15 hommes et 15 femmes) ont été infectés soit en 1988, soit en 1994. Après lecture des résultats obtenus en densité optique (D.O), un test de Student à 5 degrés de liberté révèle que 23 sérums reconnaissent significativement le peptide correspondant à la partie C-terminale

de la SmPHGSHpx, ce qui représente une positivité de 57%.

L'analyse des moyennes en fonction de l'âge ou en fonction du nombre d'oeufs fécaux (EPG) ne révèle pas de résultats significatifs (Fig. 23).

Des études de corrélation (Fig. 24) mettent en évidence une absence de corrélation en fonction de l'âge, du nombre d'oeufs fécaux ou en fonction du type de réponse obtenu vis à vis de la Sm28 GST (mais il faut noter ici que le nombre d'échantillons testés est relativement restreint). Cependant, une différence dans le profil de réponse entre les deux sexes a été retrouvée, de la même manière que ce que l'on peut observer dans des études similaires réalisées avec la Sm28 GST.

Ces résultats mettent en évidence la présence d'anticorps dirigés contre la Sm(PH)GSHpx au sein de populations infectées par *S. mansoni*.

Représentant probablement un antigène naturel dans la schistosomiase, la Sm(PH)GSHpx semble, de plus, être impliquée dans la reproduction du parasite.

Ces deux constatations renforcent l'intérêt que l'on peut porter à cette sélénoprotéine au sein d'une stratégie vaccinale basée sur la Sm 28GST.

L'évaluation du pouvoir immunogène de la région C-terminale de la Sm(PH)GSHpx nécessite plusieurs études complémentaires:

- Il serait nécessaire de travailler sur un grand nombre d'échantillons;
- D'utiliser un peptide irrelevant comme contrôle supplémentaire;
- De caractériser le profil isotypique (IgG2, IgG4, IgA, IgE) de la réponse observée.

			AGE	EPG	Moyenne des D.O.
EPG	0 - 300	a	21,2 ± 7	97,5 ± 51,4	0,83 ± 0,31
		b	1,8	23,6	0,08
		c	20	37,6	0,78
	301 - 1500	a	18,5 ± 6,6	723,1±258,5	0,72 ± 0,25
		b	1,8	82,1	0,07
		c	17,4	663,5	0,69
	> 1500	a	15,5 ± 2,7	3067,1±1380,8	0,93 ± 0,46
		b	0,7	356,51	0,12
		c	15,3	2829,5	0,84
AGE	10 - 14	a	12,36 ± 1,5	2054,1±2002,1	0,81 ± 0,28
		b	0,4	535	0,07
		c	12,27	838	0,77
	15 - 20	a	17,06 ± 1,8	1463 ± 1301	0,91 ± 0,45
		b	0,44	325,4	0,11
		c	17	561,2	0,82
	> 20	a	26,17 ± 2,66	381,8 ± 543,5	0,76 ± 0,31
		b	0,71	158,6	0,09
		c	26	123,5	0,72

- a Moyenne décimale
- b Ecart à la moyenne
- c Moyenne géométrique

Fig. 23: Exploration du pouvoir immunogène du peptide PYDIEGDIMIELLEKK correspondant à l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx. Analyse des moyennes.

		Corrélation	Valeurs de p
Hommes + Femmes	Age , D.O. moy.	- 0,17	0,3016
	EPG , D.O. moy.	0,20	0,9154
	D.O. moy. , Aa Sm28GST	- 0,40	0,7843
	D.O. moy. , Aa Nt	- 0,10	0,5282
	D.O. moy. , Aa Ct	- 0,12	0,4809
Hommes	Age , D.O. moy.	- 0,06	0,8030
	EPG , D.O. moy.	0,12	0,6203
	D.O. moy. , Aa Sm28GST	0,04	0,8614
	D.O. moy. , Aa Nt	0,08	0,7262
	D.O. moy. , Aa Ct	0,03	0,8956
Femmes	Age , D.O. moy.	- 0,08	0,7493
	EPG , D.O. moy.	- 0,05	0,8396
	D.O. moy. , Aa Sm28GST	- 0,26	0,2792
	D.O. moy. , Aa Nt	- 0,31	0,1857
	D.O. moy. , Aa Ct	- 0,29	0,2141

Seuil : $p \leq 0,05$

Fig. 24: Exploration du pouvoir immunogène du peptide PYDIEGDIMIELLEKK correspondant à l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx. Etude de corrélation.

Discussion- Perspectives

S'inscrivant dans un vaste programme de développement d'un vaccin anti-bilharzien basé sur les glutathion *S*-transférases, notre travail de thèse s'est orienté vers l'étude d'une séléno-GSHpx de *S. mansoni*, protéine appartenant à la famille des enzymes anti-oxydantes. La caractérisation génétique et moléculaire de cette enzyme (Sm(PH)GSHpx) permet de contribuer à l'élucidation de l'organisation génomique et de la biologie du schistosome, et ainsi de progresser dans la compréhension des mécanismes d'adaptation du parasite à son hôte définitif.

Le clonage initial de l'ADNc correspondant à une GSHpx de *S. mansoni* (Williams et coll., 1992) a soulevé plusieurs questions:

- Existe-t-il un ou plusieurs gènes différents pour cette protéine chez *S. mansoni*? Quelle est sa place au sein du système de défense du parasite vis à vis de son environnement?

- L'expression de cette enzyme est-elle régulée au cours du développement du ver (tel que cela a été décrit par Nare et coll., 1990)?

- Quelles sont les modalités de reconnaissance du codon "TGA-SeCys" chez le schistosome?

- La Sm(PH)GSHpx peut-elle s'inscrire comme candidat pour un vaccin multigénique?

Ces différentes interrogations ont orienté nos travaux suivant plusieurs axes:

- Le clonage et la caractérisation du gène de la Sm(PH)GSHpx;
- La caractérisation enzymatique et la purification de la protéine native;
- L'expression *in vitro* et *in vivo* de la protéine;
- L'étude de la régulation de son expression;
- L'établissement d'une phylogénie des GSHpxs;
- L'évaluation du pouvoir immunogène d'un peptide dérivé de la Sm(PH)GSHpx.

Voici une discussion concernant les principaux résultats:

A) Organisation et séquence du gène de la Sm(PH)GSHpx

L'organisation du gène de la Sm(PH)GSHpx est similaire à celle décrite pour des gènes de trématodes (Craig et coll., 1989; Duvaux-Miret et coll., 1991; Charrier-Ferrara et coll., 1992; Reis et coll., 1993) et nématodes (Blumenthal et coll., 1988; Henkle et coll., 1993), révélant une grande hétérogénéité dans la taille des introns qui les composent:

D'une part, nous observons une succession de très petits introns (entre 30 et 51 pb) du côté 5' du gène. Ces introns présentent une taille voisine de la taille minimale requise (50 pb) ainsi que l'absence de séquence de 11 pyrimidines nécessaires au mécanisme d'auto-épissage (Padgett et coll., 1986). Cependant, les sites de coupure sont du type classique GT à la jonction 5' et AG à la jonction 3'.

D'autre part, l'observation d'un intron de grande taille (environ 4.5 Kpb) à l'extrémité 3' du gène de la Sm(PH)GSHpx peut laisser suggérer une fonction intrinsèque éventuelle. En effet, la présence d'éléments activateurs (enhancers) d'autres gènes, des signaux de réplication et d'empaquetage du chromosome ou des séquences nécessaires à l'emballage de pré-ARNm dans des particules ribonucléo-protéiques ont été décrits au sein de séquences introniques (Singer et coll., 1992b).

La récente publication de la séquence du gène déterminant la synthèse d'une GSHpx de *S. mansoni* par Mei et Lo Verde (1995) a suscité beaucoup d'interrogations. En effet, l'alignement de la séquence publiée avec celle du gène que nous étudions révèle une organisation génétique identique ainsi qu'une quasi-identité dans les régions exoniques. Cependant, les séquences comparées s'avèrent totalement divergentes en amont du "cap site". De plus, la taille de l'intron situé du côté 3' du gène ne coïncide pas (1.5 Kpb pour le gène de Mei et Lo Verde et 4.5 Kpb environ pour celui que nous étudions) (Fig. 25).

Dans le souci de contrôler l'identité de la séquence issue de la banque génomique d'ADN de vers adultes (clone 10) à celle retrouvée au sein de l'ADN génomique de cercaire, nous avons réalisé quelques expériences complémentaires par la technique de PCR:

Nous avons choisi des couples d'amorces situés dans la région 5' du gène (au sein du premier exon et dans la région promotrice) et réalisé des réactions de PCR en utilisant comme matrice, soit le clone 10, soit la préparation d'ADN de cercaire. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes:

-577 TAAACAAATGGAAAGGAGACAGCACAGAGTTGGTGTAGAATTCTGTTCGGTGGCCCT
 -517 ATGCACTAATAGGGTAAACAGCCTTAAGCAAGCGACGAACCTCTAAATGAACAGTTGAGTA
 -457 ACAAATCTATCCACTAATTACTAGCACCTTTGGCTCGGCCCGTCTAGAATATGGAGGCG(C
 -397 AATAAAGTTTTCCTCAATCATAAAAAATGAGG)AATATTATAGAATGCATTTACAGGTCGGTCA
 -337 AGGATATCAGTTAAGAGATTCAAATTCAACCCCTCACAAAGAACGCCCTGAATGTCTGAAT
 -277 CGTTAGTCAGTGGAGTACAACAACCTTAAAAGTGACCTTTAAATGACACACGGCATCCCA
 -217 AGCACTCTGGACATCCATTAAAATACCTATTTACGCTCGACTCCAACCCACATTCAGGA
 -157 AGAATATCCAGAAATTAGAATCACAACATAACAGAATGAAGTGTAGGCACACATTCCTGCT
 -97 CTTTACGAGCAGTCAAAATGCTGGAATTCAAATG(ACGGTTGACGTGGTCCAAGAAGTTTCCT)
 -37 ACAAGCTCTTTTAGAAGAACTTGATCAGTACTTAATGATTGAGAAATGCATTTTGTACT
 +24 AATTTACATAGACCTCTCTGACTAGTTTTTTCACACATCCAGATCCTCACCTGTGTACATA
 +84 CGTGATCAATTGCTACAGATCAAGGAGGCTTCTTGACCGAATTCGCCCTCGATTCGTGTC
 +144 CCGACCATTTGAAACACTTGTACACCAGCCTAGAGGTGTTTTGCCGCTCCTTATTCAAAAT
 +204 CTCTCGAAACATTGTTACGATTAGATGTAACGCGATGGTACGTTGTGGTCCCTCTAATT
 M
 +264 TCTTCCTTAAGTCTTCATCTCACAAGTCTTGGAAITCAATATATGAATTCAGTGTAAAGG
 S S S H K S W N S I Y E F T V K D
 +324 ATATCAATGGTGTGGATGTCTCCTTAGAGAAATACCGGTATGTTTCGATATTACTCTCCTA
 I N G V D V S L E K Y R
 +384 TATAGAATAATAATTATTTGTTGTTTAGTGGTCACGTTTGTCTAATTGTTAATGTGCGCTT
 G H V C L I V N V A C
 +444 GCAAGTGAGGCGCAACGGACAAGAACTATCGCCAACCTCCAGGAGATGCACACTCGACTGG
 K * G A T D K N Y R Q L Q E M H T R L V
 +504 TTGGCAAAGGCCCTCCGTATATTAGCATTCCCTTGCAATCAATTCGGTGGACAGGTTGTGA
 G K G L R I L A F P C N Q F G G Q
 +564 TCACITAAACCAATATTATTTGCAGGAACCCCTGGGCAGAAGCGGAGATTAAGAAGTTCGT
 E P W A E A E I K K F V
 +624 GACTGAGAAGTACGGCGTCCAATTTCGATATGTTTTCGAAGATAAAAGTCAATGGTCTGA
 T E K Y G V Q F D M F S K I K V N G S D
 +684 CGCTGATGATCTTTATAAAATCCCTCAAAGTAGACAACATGGTACCTTAACAAAGTAATT
 A D D L Y K F L K S R Q H G T L T N
 +744 GTTTTTCTTTGTTACTGTCTAGTAATATTAAGTGGAACTTCTCAAATTTCTGTAGA
 N I K W N F S K F L V D
 +804 TCGTCAAGGACAACCGGTTAAAAGATATTCTCCTACAACCTGCCCATATGTGAGTTGTTG
 R Q G Q P V K R Y S P T T A P Y
 +864 AATTTCAATATTTTGTATTTATATCAGTTCGACTGTCTAAATAGATAGAAGTAACTTA
 +924 AGGATAAATTAGCAAACCTCAGCAATCTATCTATACACTTCGATTTTTCTGGGTTATTG
 +984 AATATATTTGTCGTCTATTCTTAAGCATGTAACCTTGATGACTTATTGGATGCGGTTA
 +1044 ACTTCGGTCTGATGATATGTAGACGTAAGCATGGTTCATAAACAATCACTTAAGGTCA
 +1104 CATATAGTTTACATCACAAGAAATCAGTGTAAACACGTCCAAACAACACTAGTAACG
 +1164 TATACAACATCAGAAATTGAGGAGCGAAATATTCACAATTGAAATATAGTTATTGCCTCC
 +1224 GCTTGGTTGATCGCAAGCAATGTCGTCAGGCCACGTCACGTAGCTTATAGTCTCTGTGGT
 +1284 TTTGATGTTGTTATTAAGAAGGTTAATGTTCTGAACATTTAGCCGGTTAGTACTTTGT
 +1344 TGAATAGCGGTTGTTTGGTGATTTTCATCAATGCGTTTCCAAACTAGTCGTACCTCAGAA
 +1404 GTGGTTACCGTCAAAAACCTACCGGGACACAACATATCACCTCATAGCCGTCATGTT
 +1464 GATAAATTCACCGGCTAATTTTCATGAATGACAAAATGATATATCAACTTTAGTTACTTG
 +1524 TTAGTTAATGGTATATGAATGAGGTCCATCGTTGCATACAGATACCTAAGTACCTTGT
 +1584 AATAGTCCGACGCTTACAATTATTCGTGCCTCAACGTACTACAAGCAGTAAGTATGATA
 +1644 ATTAAGATTTGTGTGGAAGTACGAGACTTTGTATGACAGTTCATCTCTCCATTTTC
 +1704 CTGGTTTAGTGACACCGGTTAGCGGTTAGTACTTTGATGTGTAGCGGTTATTGAACAA
 +1764 TATATCAATCTTGGCACAGTTTGTGTCAAACAATAGTGAATCCTGGACTACTGCAGATT
 +1824 TCAAGGCTAGGAATATCTAATTTCTCACACTACGTAATTCATATGATTCTGAATCTA
 +1884 ACTTCCTACAAGTATTCTTATATTCTTCATTTACCTGGCGTGTGCTGTATTAGGCAGA
 +1944 TACTCGCAACATATGATTGCGTGAAGTGACCCACTTCTATCTGGCATTCTTAACCTATT
 +2004 TTTCTCAATCCACATTTTCTTTCTGTAATACATTTTATGTACTGTGCTTTCACATAG
 +2064 CGTTGATCTCTCGTGTGTAATAGTGGTATGGAGTTCGGGAAGTTGGACTGATGATGTG
 +2124 CATCCAAACAATTCCTTGATTTGACCGTCTACCCTATTAGGTGGTTAATCCCAAGTAT
 +2184 GATGCTTAATGTCTAATAGTAAAGAAATTCATGAGACTGTTATAATTCTATCGATAAGTA
 +2244 ATGACATATGTTTTAAGATTTCTGACCGAACTTTTAATTTTTGTAGGATATTGAAGGAG
 D I E G D
 +2304 ATATCATGGAGCTTTTGGAGAAGAAGTGATCAATGGAACCTATGAGCTTTGAACAAATTC
 I M E L L E K K *
 +2364 TCGCTATATGACGATGGCAATCTCAAATGTTTCAATGGTTGCCATTTGATGAAATCAGTTT
 +2424 TGTGTGCACCTGATTGCAGAAATTTGTTTACCTTGCTCAATTTTTTCAATTGAAACCACTT
 +2484 CTCAGAAATAAATGTTGTTATCTATAATTGAATGACTTGTACTTACTGACTTGCTTAAGA
 +2544 GTTACTGAAATGCTTGTCTATCGTAATTACCAACCAATTAATTTGAGAAGTGAACAATA
 +2604 GTAGTTGGACTATTAGAAAAGG

Fig. 25: Séquence du gène d'une GSHpx de *S.mansoni* (d'après Mei et coll., 1995).

Les séquences encadrées correspondent aux régions divergentes entre les deux séquences publiées de GSHpxs de *S.mansoni* (Roche et coll., 1994;Mei et coll., 1995).

a	5'	GGC	TGT	CCT	TCC	TCC	TTC	GG	3'
b	5'	ACG	TGT	CCC	GAC	CCG	CGC	TT	3'
c	5'	ATA	GAA	TCT	ACT	CAA	CGA	CG	3'
d	5'	TGG	ATC	ACG	TAT	GTC	CAC	AGG	T 3'
e	5'	GTA	TTT	CTC	TAA	GGA	GAC	ATC	3'
f	5'	TGC	GCC	TCA	CTT	GCA	AGC	GAC	A 3'
g	5'	TGT	CGC	TTG	CAA	GTG	AGG	CGC	A 3'
h	5'	CTT	TTG	GAG	AAG	AAG	TGA		3'

Les positions des amorces utilisées sont mentionnées dans la Fig. 26.

Nous avons également réalisé des réactions de PCR afin de contrôler la taille de l'intron 3' du gène.

Dans tous les cas, nous obtenons toujours un produit de PCR de taille attendue quelle que soit la matrice utilisée (Fig. 27). Ces résultats suggèrent bien l'identité entre la séquence du gène obtenue à partir du clone 10 et celle présente au sein du génome du parasite.

Les différences de séquences observées soulèvent alors la question d'une éventuelle duplication du gène. Cependant, si cette hypothèse explique la différence de séquence observée dans la région 5', elle n'explique pas la différence de séquence concernant le dernier intron. La localisation sur les chromosomes en utilisant des sondes génomiques correspondantes à une partie de séquence des introns situés en 3' des gènes permettrait de mettre en évidence l'existence d'un ou plusieurs *loci* différents correspondants à une (PH)GSHpx.

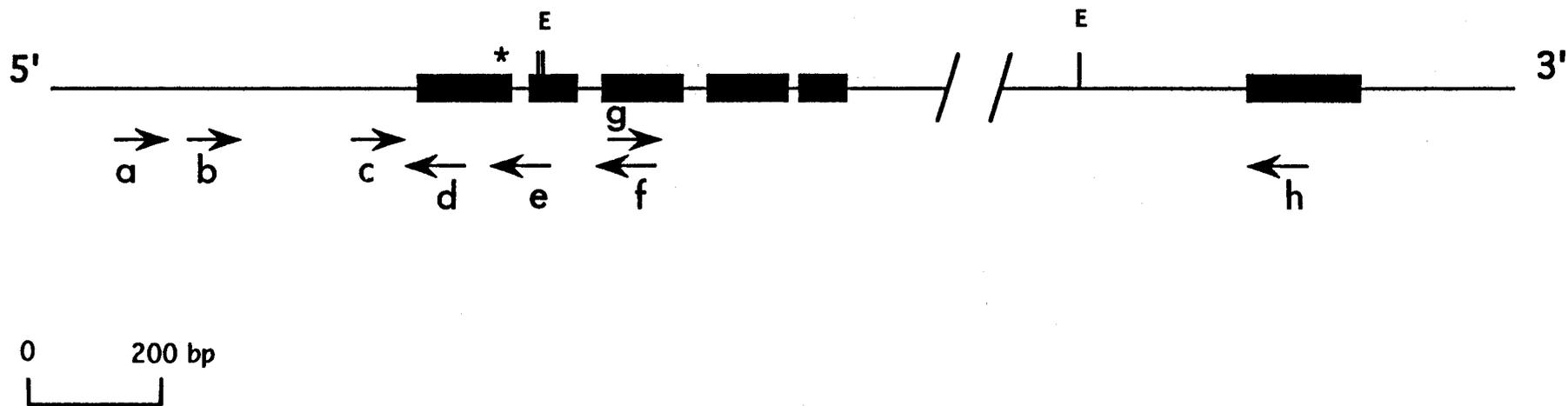


Fig. 26: Schéma représentatif de la position des amorces utilisées sur le gène de la (PH)GSHpx de *S.mansoni*.

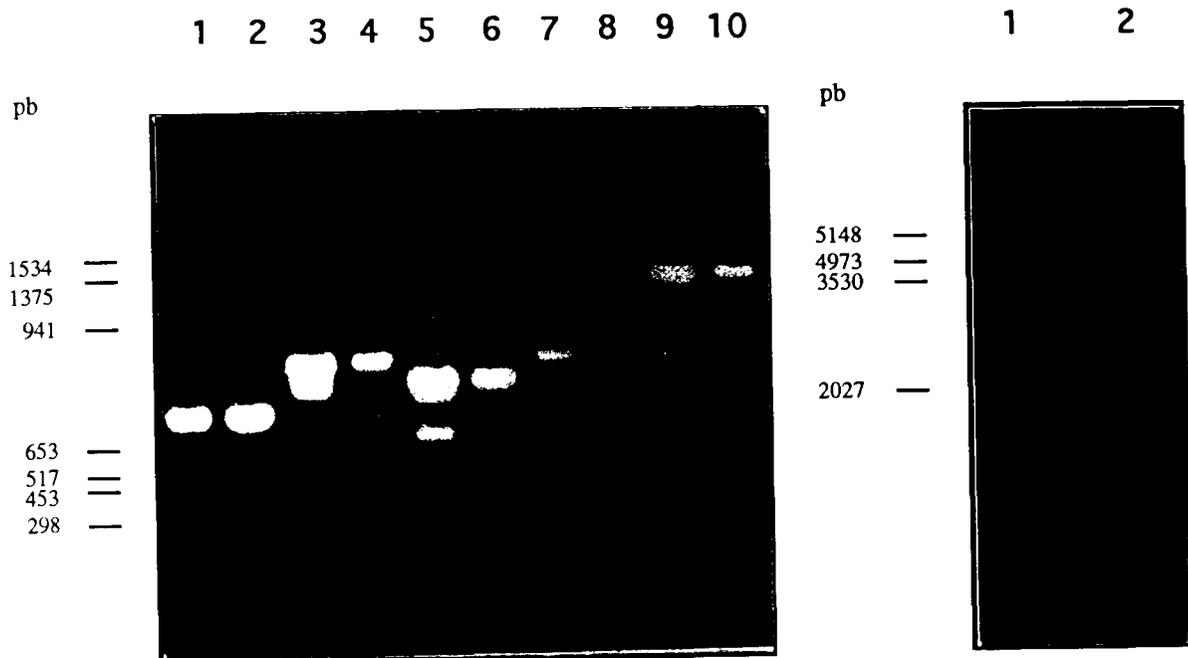


Fig.27: Résultats des réactions de PCR:

Numéros pairs: réactions réalisées sur l'ADN de phage λ (clone 10)

Numéros impairs: réactions réalisées sur l'ADN de cercaires.

1 et 2: amorces c et e

3 et 4: amorces b et e

5 et 6: amorces c et f

7 et 8: amorces b et d

9 et 10: amorces a et f.

1 et 2: amorces g et f.

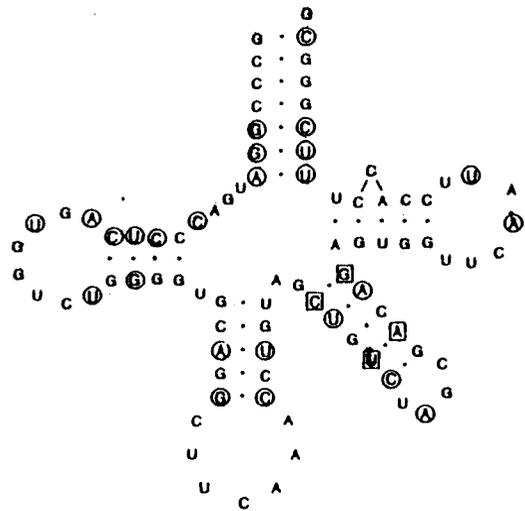
Dans la continuité de cette démarche, la localisation concertée des *loci* de différentes enzymes antioxydantes clonées dans notre laboratoire pourrait conduire à une meilleure compréhension de l'organisation du génome du schistosome.

B) La Sm(PH)GSHpx est une sélénoprotéine

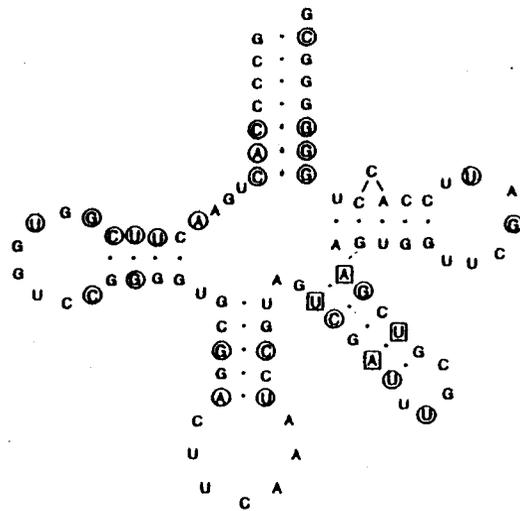
La production *in vitro* d'une protéine enzymatiquement active s'avère délicate dans un système hétérologue. Aucun résultat concernant l'expression d'une sélénoperoxydase en système procaryote ou eucaryote n'a été publié. En effet, les modalités de reconnaissance du codon "TGA-SeCys" semblent différentes suivant qu'il s'agisse d'un organisme procaryote ou eucaryote et semblent restrictives de l'espèce étudiée.

Trois facteurs essentiels interviennent dans le décryptage d'un tel codon: l'existence d'un ARNt supprimeur chargé d'une SeCys; la présence d'une conformation en "tige et boucle" de la région 3' non codante de l'ARNm présentant des séquences consensus et l'existence d'un facteur d'élongation spécifique.

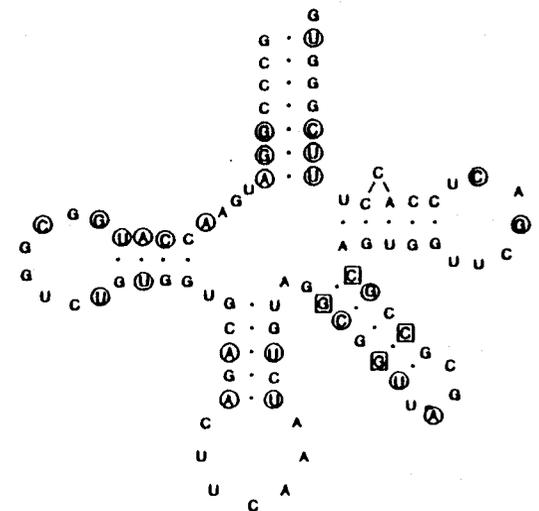
- La présence d'un ARNt supprimeur est ubiquitaire à travers le règne animal (Lee et coll., 1990) et, malgré des variations de séquence, sa structure secondaire semble être bien conservée (Fig. 28) au cours de l'évolution:



Xenopus



Drosophila



C. elegans

Fig. 28: Structure secondaire de trois ARNts déterminant l'incorporation d'une SeCys.
(d'après Lee et coll., 1990).

- La structure en "tige et boucle" de la région 3' non codante de quelques gènes de sélénoprotéines étudiées démontre quelques similarités, notamment la présence des éléments de séquence 5'AUGA3'; 5'UnAA3' et 5'UGnU3' localisés dans ou à proximité de la boucle majeure. Cependant, de sensibles différences sont observées entre les espèces étudiées au niveau des boucles secondaires.

Un seul facteur d'élongation spécifique SELB a été identifié chez la salmonelle par Forchhammer et ses collaborateurs (1989 et 1990). On peut supposer que les séquences consensus retrouvées au sein des structures 3' non codantes de diverses sélénoprotéines sont nécessaires à la fixation d'un facteur analogue à la protéine SELB. Ce serait l'adéquation entre un type de conformation en "tige et boucle" et un facteur d'élongation spécifique de cette structure qui déterminerait l'insertion correcte de la SeCys au sein du ribosome.

Ainsi, ce mécanisme de décryptage serait spécifique de l'espèce.

Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la réalisation de gènes chimériques. En effet, il serait possible d'envisager la construction d'un gène présentant la partie codante de la Sm(PH)GSHpx et la partie 3' non codante du gène de la PHGSHpx de porc. La transfection d'une lignée cellulaire de porc avec cette construction et la culture des cellules ainsi transformées en milieu enrichi en sélénium radiomarqué permettrait une première approche. Il serait également envisageable de cloner et d'analyser les structures secondaires correspondantes aux régions en aval du codon TGA au sein de GSHpxs d'espèces très voisines de schistosome afin de les comparer. Cependant, l'absence de lignée cellulaire de schistosome ne permet pas l'analyse fonctionnelle de ce mécanisme de décryptage du codon "TGA-SeCys" et la synthèse *in vitro* d'une sélénoprotéine de schistosome reste problématique.

C) Le gène étudié s'apparenterait à une phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase

La séquence du gène étudié présente 55% d'identité avec celle de la PHGSHpx de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994). De plus, l'organisation génomique avec l'alternance des exons et des introns est très similaire. Ces deux constatations ont orienté notre travail vers l'identification de l'enzyme étudiée comme une Sm(PH)GSHpx:

- La caractérisation de l'activité enzymatique et la purification d'une protéine de 20 kDa reconnue par notre sérum dirigé contre l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx s'orientent dans ce sens.

- L'établissement d'une phylogénie permet de retrouver les gènes de Sm(PH)GSHpx et PHGSHpx de porc étroitement liés.

- La synthèse de cette protéine *in vivo* s'avère spécifique de la femelle et semble restreinte à un type cellulaire: les cellules vitellines. Cette localisation spécifique dans l'appareil reproducteur de la femelle semble attribuer à la Sm(PH)GSHpx un rôle dans la fécondité du parasite plutôt qu'une fonction de protection vis à vis de xénobiotiques.

- L'exploration de la régulation de l'expression de la Sm(PH)GSHpx au cours du développement du schistosome révèle une absence de la protéine au stade de la cercaire. La régulation de l'expression semble être post-transcriptionnelle et tissu spécifique.

Différentes hypothèses peuvent être envisagées:

- a) La synthèse d'un facteur d'élongation spécifique (de type SELB), dont la régulation de l'expression dépendrait du type cellulaire. On peut envisager une régulation de la synthèse d'un tel facteur dépendante d'hormones stéroïdiennes.

En effet, il a été démontré que la synthèse de la PHGSHpx de rat serait dépendante de gonadotropines (Roveri et coll., 1992). De manière analogue, on peut envisager le contrôle de l'expression d'un facteur d'initiation de la traduction spécifique.

b) On peut également envisager la disponibilité en sélénium au sein de la cellule comme facteur limitant et spécifique du type cellulaire et du stade évolutif du schistosome. Chez les mammifères, la distribution de sélénium est particulièrement contrôlée au niveau des testicules et influence le taux d'expression de la PHGSHpx de rat (Roveri et coll., 1992).

Des expériences d'immunolocalisation après traitement des hamsters infectés (ayant subi une diète en sélénium ou traités par Tamoxifène, un antagoniste de l'oestrogène), ainsi que l'hybridation *in situ* de l'ARNm spécifique permettrait d'apporter quelques éléments de réponse. De plus, l'hybridation *in situ* permettrait d'identifier la présence constitutive de l'ARNm au sein de tous les tissus ou restreinte à un type cellulaire.

c) Une autre approche concernant la régulation de l'expression de la Sm(PH)GSHpx au cours du développement du parasite constituerait le dosage enzymatique d'extraits cytosoliques de différents stades évolutifs (en utilisant les spécificités de substrat des diverses enzymes GSHpxs). Cela permettrait de comprendre la façon dont les différentes formes enzymatiques sont co-régulées au cours du développement du schistosome. Dans le cadre de cette étude, il serait intéressant d'envisager le clonage d'autres types de GSHpxs de *S. mansoni* et d'identifier leurs localisations tissulaires.

d) Des études cinétiques et enzymologiques de la Sm(PH)GSHpx permettront d'élargir les connaissances concernant les modalités de fonctionnement de cette enzyme particulière.

e) La phylogénie obtenue a permis d'établir une dichotomie d'un gène primitif. Cependant, cette construction reste incomplète. Il serait intéressant d'envisager le dosage d'activité GSHpxs au sein d'organismes tels que l'anémone, le mollusque ou la drosophile. Une deuxième approche constituerait la réalisation de réactions de PCR spécifiques de chaque enzyme (principalement les GSHpxs-1 et PHGSHpxs) au sein d'espèces réparties le long de l'arbre de l'évolution.

Une approche différente pour établir une construction phylogénique des GSHpxs a été réalisée par Ursini et ses collaborateurs (1995). Cette approche consiste à établir une construction uniquement sur des régions très conservées des séquences protéiques. Le résultat de cette approche est présentée dans la figure 29.

On peut ici aussi constater une duplication du gène primitif, mais dans cette interprétation, les GSHpxs-1 et PHGSHpxs font partie d'une même divergence initiale. Il serait intéressant de confronter les deux approches en réalisant une élaboration phylogénique identique à celle que nous avons utilisée précédemment, mais en ne retenant que les régions très conservées des séquences protéiques retenues par Ursini et ses collaborateurs. La comparaison des valeurs de "Bootstrap" obtenues dans les deux élaborations permettrait alors une discussion intéressante concernant les deux approches utilisées.

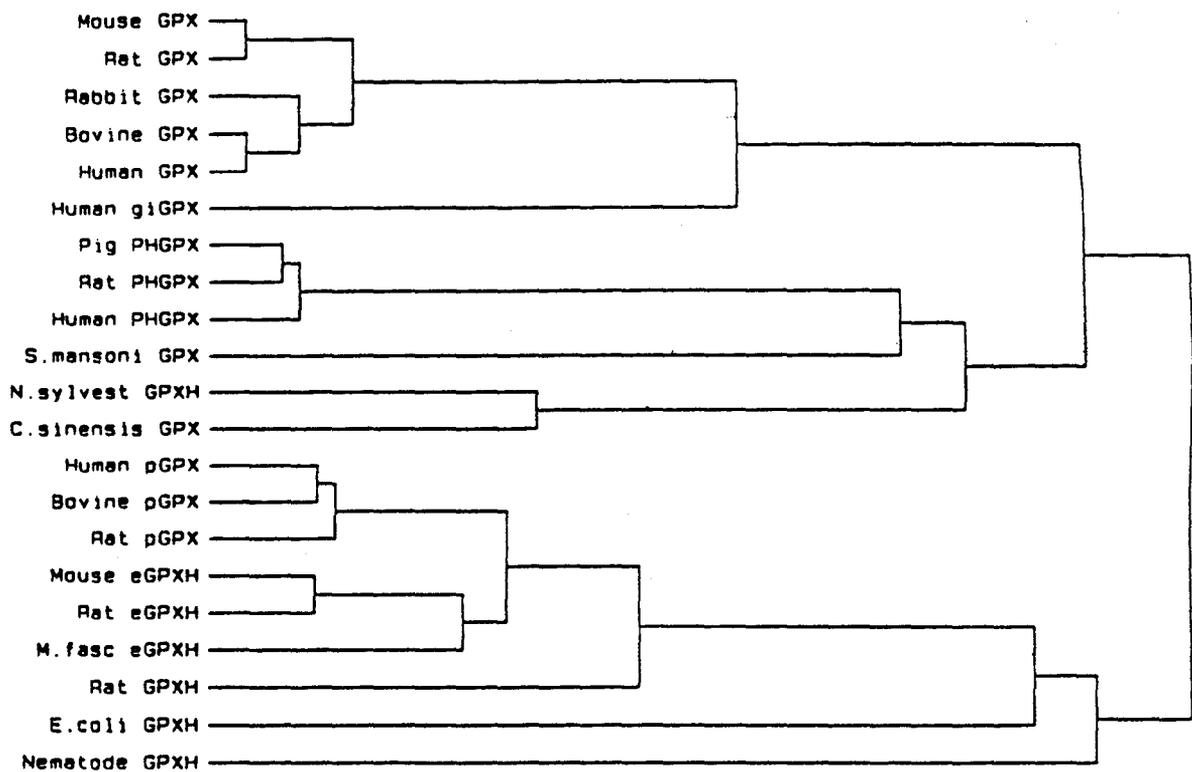


Fig. 29: Phylogénie moléculaire des GSHpxs.

(d'après Ursini et coll., 1995)

f) L'exploration de la région située en amont du gène a montré une activité promotrice en système hétérologue. Cependant, les essais d'identification de régions et de séquences indispensables à sa fonction ont échoués. Cette région correspond-t-elle effectivement à un promoteur constitutif? La présence de quelques éléments de séquence (répétition directes ou inversées; séquences monomériques correspondantes à la liaison de récepteurs nucléaire d'hormones stéroïdiennes) est-elle indicative d'une éventuelle fonction?

Dans le cadre de cette étude, seule la disponibilité d'une lignée cellulaire de schistosome permettrait d'apporter quelques éléments de réponse.

D) Le peptide correspondant à la région C-terminale de la Sm(PH)GSHpx semble être un antigène naturel de la schistosomiase

Les résultats préliminaires concernant l'évaluation du pouvoir immunogène du peptide utilisé sont encourageants puisque 57% des sérums testés présentent des anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx. Surtout si ce résultat se confirme par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons, on peut envisager de réaliser des études d'effets protecteurs d'un anticorps monoclonal dirigé contre cet antigène. De plus, il serait intéressant d'évaluer le pouvoir immunogène de ce peptide vis à vis d'autres parasitoses. En effet, ce peptide correspond-t-il à un épitope majeur de la protéine? Est-il suffisamment conservé au sein de différentes espèces de schistosome pour permettre d'envisager l'élaboration d'un vaccin dirigé contre les bilharzioses humaines et animales?

Les études réalisées sur le principal candidat vaccinal qu'est la Sm28 GST démontrent un pouvoir anti-fécondité d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette enzyme. Cet effet observé est-il direct ou indirect? Si la Sm(PH)GSHpx est effectivement impliquée dans la reproduction du parasite, comment se positionne-t-elle par rapport à la Sm28 GST dans la cascade d'événements biologiques impliqués dans la reproduction?

Toutes ces interrogations encouragent la poursuite de la caractérisation fonctionnelle de la Sm(PH)GSHpx. C'est par l'approfondissement des connaissances concernant le génome et la biologie du schistosome que l'on peut espérer vaincre les phénomènes de résistance et développer de nouveaux outils de lutte contre l'endémie mondiale que représente la bilharziose.

Annexe technique

D) Préparation de fractions cytosoliques de *S. mansoni*

Les vers adultes sont obtenus après perfusion portale des hamsters (souche Portoricaine, *Mesocricetus auratus*) 40 jours après l'infection d'épreuve (environ 5000 vers par récolte). Puis ils sont soigneusement lavés dans du tampon Hanks-Wallace à 37°C, éliminant ainsi les tissus exogènes. 2 ml de tampon Tris-HCl 0.1 M sont ensuite ajoutés à 1ml de vers décantés. Des inhibiteurs de protéases sont ensuite ajoutés (5 mM de β -mercaptoéthanol; 1 mM de PMSF) et le tout est équilibré à 4°C. La préparation parasitaire est ensuite broyée sur glace (Ultra-Turax, Janke et Kundel) puis soniquée 4 fois 10 secondes sur glace (Labsonic U, Vasse). L'homogénat est ensuite centrifugé à 50 000g pendant une heure à 4°C et le surnageant est récupéré. La concentration protéique est alors déterminée par le dosage de liaisons peptidiques à 562 nm (BCA protein assay reagent, Pierce, USA).

Tampon Hanks-Wallace:

NaCl	8.00 g
KCl	0.40 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0.25 g
MgSO ₄ , 2 H ₂ O	0.20 g
NaHPO ₄ , 12 H ₂ O	0.15 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
NaHCO ₃	0.98 g
Glucose	1.00 g
H ₂ O	qsp 1 litre

II) Chromatographie en gel d'exclusion des préparations cytosoliques de *S.mansoni* et mesure de l'activité GSHpx et GST

30 mg de fraction cytosolique de *S. mansoni* ont été déposés sur une colonne de gel d'exclusion (Superdex 75 ® 2,6 X 60 cm, Pharmacia) initialement équilibrée avec un tampon Tris-HCl 25 mM / KCl 500 mM / glycérol 10%, pH 7,5. La chromatographie a été réalisée dans le même tampon à 4°C (vitesse d'écoulement de la colonne: 1 ml/ mn). Des fractions de 5 ml ont été récoltés.

Pour mesurer l'activité peroxydase contenue dans chacune des fractions, le substrat à tester (50 µM d' H₂O₂; 50 µM de cumène ROOH (CPH) ou 16 µM de phosphatidylcholine ROOH (PCOOH)) a été ajouté à 2.5 ml d'une solution contenant: Tris-HCl 0.1M, pH 7,5 / glutathion 3 mM / EDTA 5 mM / NADPH 2 mM / glutathion réductase 2 UI /(et 1.0% de Triton 100 pour le dosage de l'activité PHGSHpx vis à vis de PCOOH). La PCOOH a été préparée et quantifiée selon Maiorino et coll., 1990. La réaction enzymatique est initiée par l'addition de 0.2 ml de chaque fraction éluée de la colonne Superdex 75 ®. La consommation de NADPH a alors été mesurée par spectrophotométrie à 340 nm. L'oxydation spontanée de NADPH en absence de toute fraction cytosolique de *S. mansoni* a été soustraite pour le calcul de l'activité enzymatique (selon Plagia et coll., 1988) en utilisant $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'activité S-transférase a été mesurée (selon Habig et coll., 1977) par spectrophotométrie sur 0,1 ml de fraction cytosolique éluée, en utilisant du 1-chloro-2.3-dinitrobenzène et du GSH comme substrats. Le calcul de l'activité enzymatique a été réalisé en utilisant $\Delta \epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III) Purification de l'activité PHGSHpx de *S. mansoni*

Afin de réaliser la purification de l'activité GSHpx de *S. mansoni*, trois étapes chromatographiques ont été utilisées:

1-chromatographie d'affinité:

colonne de bromosulphthaleine-Sepharose, (2,5 X 7 cm)

53 ml de fraction cytosolique (à 6 mg / ml de protéines totales) ont été préalablement dialysés contre un tampon d'équilibration A (10 mM KH_2PO_4 / KHPO_4 ; 2% glycérol, pH 7) puis déposés sur la colonne. Après lavages (120 ml du tampon d'équilibration A), la colonne a été rincée avec un tampon B (25 mM Tris-HCl / 50 mM KCl / 10 % glycérol / pH 7,8) et des fractions de 10 ml ont été collectées. Après une période de 80 min., un gradient linéaire est formé afin d'atteindre, en 160 min, une composition de 100% of 25 mM Tris-HCl, 1 M KCl, 10 % glycérol, pH 8.3. La colonne est éluée durant 90 min. L'activité PHGSHpx a été déterminée sur des échantillons de 0,2 ml suivant le protocole décrit plus haut. Les fractions présentant une activité PHGSHpx (260 à 290 ml) ont été concentrées (à environ 8 ml) et déposées sur une colonne de gel d'exclusion.

2-chromatographie en gel d'exclusion:

colonne Superdex 75® (Pharmacia)(2,6 X 60 cm)

La colonne a été initialement équilibrée avec le tampon C (25 mM Tris-HCl / 500 mM KCl / 10 % glycérol / pH 7,5). Les fractions présentant une activité PHGSHpx (éluées entre 210 et 230 ml) sont récoltées et le tampon C a été

remplacé par un tampon D (10 mM KH_2PO_4 / 0.8 M $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) en utilisant des cartouches Biorad Econopack 10 DG conformément aux instructions du fournisseur. Cet échantillon ainsi préparé a été déposé sur une colonne d'interaction hydrophobe.

3-chromatographie d'interaction hydrophobe:

colonne Phényl-Sépharose CL-4B (Pharmacia)(2,5 X 6,6 cm):

La colonne a été initialement équilibrée avec le tampon D. Après plusieurs lavages (150 ml de tampon D), un gradient linéaire a été appliqué, atteignant en 400 min 100% de Tris-HCl 25 mM / 50% d'éthylène glycol monoéthyl éther / pH 7,4. Les fractions de 5 ml collectées et présentant une activité PHGSHpx (éluées entre 205 et 235 ml) ont ensuite été concentrées.

IV) Exploration de l'activité promotrice

A- Transfection transitoire de cellules Jurkat

Les cellules Jurkat (lymphocytes T humains) sont maintenues en culture à 37°C dans un milieu RPMI supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) à 10% (Boeringher, USA) et en glutamate à 1% (Biochrom K.G.). Le SVF a été préalablement inactivé à 56°C pendant 30 minutes. Les cellules sont sédimentées par centrifugation à 1 500 rpm pendant 10 minutes à 4°C et sont lavées en tampon PBS. Après lavages, les cellules sont remises en suspension dans du tampon PBS (10^8 ç/ ml).

Dans une cuve à électroporation stérile, 20µg de plasmide recombinant pLuc (In Vitrogen, USA) et 10µg de plasmide pSV/ βgal (Proméga, USA) sont ajoutés à 250µl de suspension cellulaire. Après 15 minutes dans la glace, les cellules sont électroporées par un pulse électrique de 65 à 69 ms, 250V, 1200 µF et une résistance infinie. Les cellules sont ensuite remise immédiatement en suspension en milieu complet (RPMI + 10% SVF + 1 % glutamate) et incubées 48 h à 37°C.

B- Lyse des cellules avec le "Reporter Lysis Buffer" (RLB) (Proméga; USA)

Les cellules transfectées sont lavées en tampon PBS (sans Mg²⁺ et sans Ca²⁺). Puis la totalité des cellules est reprise après centrifugation (1500 tpm pendant 10 minutes à 4°C) dans 500µl de tampon de lyse RLB 1X. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les cellules ainsi lysées sont incubées 2 minutes à 4°C et centrifugées 2 minutes à 10 000 tpm à 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré et équilibré à la température ambiante.

C- Dosage de l'activité luciférase (Luciferase Assay System; Proméga; USA)

20 µl de surnageant et 100 µl de "Luciferase Assay Reagent" sont mélangés. Le comptage s'effectue dans un luminomètre (Nucleotimètre 107, Interbio) à 25°C sur une durée de 5 minutes maximum ($\Delta t = 30s$).

D- Dosage de l'activité β galactosidase (Promega; USA)

30 μ l de surnageant et 120 μ l d' H_2O sont mélangés avec 150 μ l d' "Assay Buffer" 2X. Après avoir mélangé au vortex, l'échantillon est incubé 30 minutes à 37°C. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'addition de 500 μ l d'une solution de carbonate de sodium à 1M et la lecture de la densité optique est réalisée à 420nm.

V) Exploration du pouvoir immunogène du peptide de synthèse correspondant à l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx

Une suspension du peptide (10 μ g/ml en tampon carbonate de sodium 1M, pH 9,6) a été mise en contact avec des plaques de microtitration (Immulo-3, Dynatech) à 4°C pendant une nuit. Après trois lavages des puits en tampon PBS + 1 ‰ Tween 20, les plaques ont été saturées avec une solution de gélatine à 0,5 % pendant une heure à température ambiante puis lavées trois fois en tampon PBS + 1 ‰ Tween 20. Les sérums humains à tester ont ensuite été ajoutés (dilués au 1/1000^{ème} en tampon PBS) en duplicate et incubés à 4°C durant une nuit. Après trois lavages en tampon PBS + 1 ‰ Tween 20, l'anticorps secondaire anti-IgG humain marqué à la peroxydase (Diagnostic Pasteur, France) a été ajouté (dilué au 1/ 10.000^{ème} en tampon PBS) et incubé 1 heure à 37°C. La réaction a été révélée par l'addition d'une solution d'orthophénylènediamine (Sigma) précédée de cinq lavages des plaques avec du tampon PBS + 1 ‰ Tween 20. Après une incubation de 30 minutes à 37°C et dans l'obscurité, la réaction a été arrêtée par l'addition d'une solution d'HCl à 2N. L'absorbance est lue à 492 nm.

Tampon carbonate de sodium:

250 ml de NaHCO_3 , 0.1 M

250 ml de Na_2CO_3 0.1 M

H_2O QSP 100 ml

ajuster le pH à 9,6.

Les résultats obtenus sont ensuite soumis à une analyse statistique: analyse des moyennes et études de corrélations (test de Student) (Statview 4.02, Macintosh; Apple).

Références bibliographiques

- Aisaka, K., Uwajimer, T. and Terrada, O.** (1983) Purification and properties of glutathione peroxidase from *Mucor hiemalis*. *Agr. Biol. Chem.* 47, 1107-1113.
- Akasaka, M., Mizoguch, J., Yoshimura, S. and Watanabe, K.** (1989) Nucleotide sequence of cDNA for rabbit glutathione peroxidase. *Nucl. Acids Res.* 17, 2136.
- Akasaka, M., Mizoguchi, J. and Takahashi, K.** (1990) A human cDNA sequence for a novel glutathione peroxidase-related protein. *Nucl. Acids Res.* 18, 4619.
- Ali, P. O., Simpson, A. J. G., Allen, R., Waters, A. P., Humphries, C. J., Johnston, P. A. and Rollinson, D.** (1991) Sequence of a small subunit rRNA gene of *Schistosoma mansoni* and its use in phylogenic analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 201-208.
- Amstad, P., Moret, R. and Cerutti, P.** (1994) Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu/Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J. Biol. Chem.* 269, 3, 1606-1609.
- Auriault, C., Damonville, M., Verwærde, 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.
- Avissar, N., Slemmon, J.R., Palmer, I. S. and Cohen, H.J.** (1991) Partial sequence of human plasma glutathione peroxidase and immunologic identification of milk glutathione peroxidase as the plasma enzyme. *J. Nutr.* 121, 1243-1249.
- 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 schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 105-114.
- 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.
- Baron, C., Heider, J. and Böck, A.** (1990) Mutagenesis of *sel c*, the gene for the selenocysteine-inserting tRNA-species in *E. Coli*: affects on *in vivo* function. *Nucl. Acids Res.* 18, 6761-6766.
- Baron, C., Westhof, E., Böck, A. and Giegé, R.** (1993) Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA^{Sec} from *Escherichia coli*: comparison with canonical tRNA^{Ser}. *J. Mol. Biol.* 21, 274-292.
- 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? *Parasitol. Today* 6, 160-163.
- Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H. and Elger, W.** (1988) Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 966, 12-21.

Below, S., Kampee, L. and Mueller, A. (1987) Reaction of *Rhabditis oxycerca* after long-term exposure to aldicarb and oxamyl-II enzyme changes in hematicide resistance. *Nematologica* 33, 298-309.

Berg, B. L., Li, J., Heider, J. and Stewart, V. (1991a) Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *E. coli* K-12. I- Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that opal (UGA) encodes selenocysteine. *J. Biol. Chem.* 266, 22380-22385.

Berg, B. L., Baron, C. and Stewart, V. (1991b) Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *E. coli* K-12. II- Evidence that a mRNA stem-loop structure is essential for decoding opal (UGA) as selenocysteine. *J. Biol. Chem.* 266, 22386-22391.

Bergquist, N. R. (1990) Prospects of vaccination against schistosomiasis. *Scan. J. Infect. Dis.* 76, 60-71.

Bergquist, N. R. (1995) Controlling schistosomiasis by vaccination : A realistic option? *Parasitology Today* 11, 191-194.

Berry, M. J., Banu, L., Chen, Y., Mandel, S.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W. and Reed Larsen, P. (1991) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in Type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353, 273-276.

Berry, M. J., Banu, M., Harney, J. W. and Larsen, P. R. (1993) Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which directs selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* 12, 3315-3322.

Bickle, Q. D., Taylor, M. G., Døenhoff, M. J. and Nelson, G. S. (1979) Immunization of a mice with gamma-irradiated intra-muscularly-injected schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 79, 209-222.

Blumenthal, T. and Thomas, J. (1988) *Cis* and *trans* splicing in *C. elegans*. *Trends in Genetics* 20, 305-307.

Bobek, L. A., Rekosh, D. M. and Lo Verde, P. T. (1987) Isolation and analysis of adult-female-specific genes from three species of human schistosome parasites. In : *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites* (Mac Innes, A., ed) pp 149-158, Alan R. Liss, Inc., New York.

Bobek, L. A., Rekosh, D. M. and Lo Verde, P. T. (1988) Analysis of a small gene family encoding an egg shell (chorion) protein of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3008-3016.

Bobek, L. A., Lo Verde, P. T. and Rekosh, D. M. (1989) *Schistosoma haematobium* : Analysis of egg shell protein genes and their expression. *Experimental Parasitology* 68, 17-30.

Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B. and Zinoni, F. (1991a) Selenocysteine : the 21st amino acid. *Mol. Microbiol.* 5, 3, 515-520.

- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J. and Baron, C. (1991b)** Selenoprotein synthesis : an expansion of the genetic code. *TIBS* 16, 463-467.
- Boulanger, D., Reid, G. D. F., Sturrock, R. F., 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 Sm28 GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 13, 473-490.
- Bourré, P. (1993)** Symptômes et évolution de l'infestation à *Schistosoma mansoni*. *Rev. Prat. (Paris)* 43, 424-427.
- Brophy, P. M. and Barrett, J. (1990)** Glutathione transferase in helminths. *Parasitology* 100, 345-349.
- Brigelius-Flohé, R., Klaus-Dieter, A., Blöcker, H., Gross, G., Kiess, M., Klaus-Dieter, K., Maiorino, M., Roveri, A., Schuckelt, R., Ursini, F., Wingender, E. and Flohé, L. (1994)** Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 10, 7342-7348.
- Brindley, P. J., Lewis, F. A., Mc Cutchan, T. F., Bueding, E. and Sher, A. (1989)** A genomic change associated with the development of resistance to hycanthone in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 243-252.
- Brindley, P. J. and Sher, A. (1990)** Immunological involvement in the efficacy of praziquantel. *Exp. Parasitol.* 71, 245-248.
- Brophy, P. M. (1988)** The role of glutathione S-transferase in Cestodes. Ph. D. Thesis. University College of Wales, Aberystwyth.
- Brophy, P. M. and Barrett, J. (1990)** Blocking factors and the purification of glutathione transferase from *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 100, 137-142.
- Burk, R.F. and Lawrence, R.A. (1978)** Non-selenium-dependent glutathione peroxidase. In: *Functions of glutathione in liver and kidney* (Sies, H., Wendel, A. eds.) Springer Verlag, Berlin. pp 114-119.
- Callahan, H. L., Crouch, R. K. and James, E. R. (1988)** Helminth anti-oxidant enzymes : a proteine mechanism against host oxidants? *Parasitology Today* 4, 218-225.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M. and Pestel, J. (1980)** Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. *Am. Trop. Med. Hyg.* 29, 849-857.
- Capron, A. (1993)** Un vaccin contre les bilharzioses. *Stratégies et perspectives.* *Rev. Prat. (Paris)* 43, 4, 457-460.
- Chada, S., Whitney, C. and Newburger, P. (1988)** Isolation and regulation of the human glutathion peroxidase gene. In : *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, pp 285-300. Alan R. Liss, Inc.

Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., Mc Bain, W. and Harrison, P.R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon TGA. *EMBO J.* 5,1221-1227.

Chambers, I. and Harrison, P.R. (1988) Control of mouse glutathione peroxidase gene expression. In : *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, pp 301-312. Alan R. Liss, Inc.

Charmot, G. et Amat-Roze, J. M. (1993) Les Bilharzioses. *Rev. Prat. (Paris)* 43, 4, 401-404.

Charrier-Ferrara, S., Caillol, D. and Goudot-Crozel, V. (1992) Complete sequence of the *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene encoding a major surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 339-344.

Chu, F.F., Doroshov, J.H. and Esworthy, R. S. (1993) Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSH Px GI. *J. Biol. Chem.* 268, 4, 2571-2576.

Chu, F.F., Doroshov, J.H. and Esworthy, R. S. (1994) Tissue specific expression of members of the selenium-dependant glutathione peroxidase gene family. In: *New Strategies in Prevention and Therapy: Biological oxidants and antioxidants* (L. Packer, E. Cadenas, eds.) Hyppokrates Verlag., Stuttgart, pp 153-168.

Cookson, E., Blaxer, M.L. and Selkvik, M.E. (1992) Identification of a major soluble cuticular protein of lymphatic filariæ nematode parasite as a secretory homolog of glutathion peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5837-5841.

Cookson, E., Liang, T. and Murray, E. S. (1993) Conservation of primary sequence of gp 29, the major soluble cuticular glycoprotein in the three species of lymphatic filariæ. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 155-160.

Cordeiro da Silva, A., Le Presle, 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.

Craig, S.P., Muralidhar, M. G., Mc Kerrow, J. H. and Wang, C. C. (1989) Evidence for a class of very small introns in the gene of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase in *Schistosoma mansoni*. *Nucl. Acids Res.* 17, 1635-1647.

Damonville, M., Auriault, C., Verwærde, 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.

Damonville, M., Auriault, C., Thonel, T., Verwærde, 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.

Davis, A. H. (1993) Resistance to antischistosomal drugs. In : Human Schistosomiasis (Jordan, P., Webbe, G., Sturrok, R.F., eds), pp 394-395, Cab. International, Wallingford, U.K.

Davis, R. E., Davis, A. H., Carroll, S. M., Rajkovic, A. and Rottman, F. M. (1988) Tandemly repeated exons encode 81 base repeats in multiple, developmentally regulated *Schistosoma mansoni* transcripts. Mol. Cell. Biol. 8, 4745-4755.

Deelder, A., Miller and De Jonge, N. (1990) Detection of *Schistosoma* antigen in mummies. Lancet 335, 724-725.

Desprès, L., Imbert-Establet, D., Combes, E., Bonhomme, F. and Monnerot, M. (1991) Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 47, 139-142.

Desprès, L., Imbert-Establet, D. and Monnerot, M. (1993) Molecular characterization of a mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. Mol. Biochem. Parasitol. 60, 221-230.

Dessein, A., Rihet, P., Demevre, C., Cuissinier, P., Bacellar, O., Carvalho, E. M., Kohlstaedt, S., Dessein, H., Souza, A., Patra, A., Goudot, V., Bourgeois, A. et Abel, L. (1992) Facteurs génétiques et immunologiques déterminant la résistance à la bilharziose en région d'endémie. Méd. Sci. 8, 108-118.

Diamond, A., Cruz, R., Bencsics, C. and Hatfield, D. (1992) A pseudogene for human glutathione peroxidase. Gene 122, 377-380.

Dissous, C., Gryzch, J. M. and Capron, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with fresh water and marine snails. Nature, 443-445.

Do Campo, R. and Moreno, S. N. T. (1986) Free radical metabolism of antiparasitic agents. Fed. Proc. 45, 2471-2476.

Dœnhoff, M. K., Sabah, A. A., Fletcher, C., Webbe, G. and Bain, J. (1987) Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 947-951.

Douch, P. G. and Buchanan, L.L. (1978) Glutathione conjugation of some xenobiotics by *Ascaris sum* and *Moniezia expansa*. Xenobiotica 8, 171-176.

Dunn, D. K., Howells, D. D., Richardson, J. P. and Goldfarb, P. S. (1989) A human cDNA sequence for a novel glutathione peroxidase-related selenopeptide, GPRP. Nucl. Acids Res. 17, 6390.

Duvaux-Miret, O., Baratte, B., Dissous, C. and Capron, A. (1991) Molecular cloning and sequencing of the α -tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 49, 337-340.

El Sherbeini, M., Ramadan, W., Bostian, K. A. and Knopf, P. M. (1991) Cloning and sequence analysis of the *Schistosoma mansoni* membrane glycoprotein antigen GPZZ. Mol. Biochem. Parasitol. 49, 83-98.

- Epp, O., Ladenstein, R. and Wendel, A.** (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase. *FEBS Lett.* 133, 51-69.
- Erasmus, D. A.** (1987) The Adult Schistosome : Structure and reproductive biology. In : *The biology of schistosome.* (Rollinson, D., Simpson, A.J.K., eds.), pp 51-82, Academic Press, New York.
- Esworthy, R. S., Doan, K., Doroshov, J. H. and Chu, F.F.** (1994) Cloning and sequencing of the cDNA encoding human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene* 144, 317-318.
- Fallon, P. G., Cooper, R. O., Probert, A. J. and Døenhoff, M. J.** (1992) Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology* 105, 41-48.
- Fallon, P. G. and Døenhoff, M. J.** (1994) Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 83-88.
- Farooq, M.** (1973) In : *Epidemiology and control of schistosomiasis.* (Kager, Basel and University Park Press eds.), Baltimore, pp1-16.
- 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. Invest.* 83, 1010-1014.
- Felsenstein, J.** (1985) Confidence limits on phylogenis: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Flohé, L., Günzler, W. A. and Schock, H. H.** (1973) Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132-134.
- Flohé, L.** (1989) The selenoprotein glutathione peroxidase. In : *Glutathione: Chemical, Biomedical and Medical Aspects. Part A* (Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O., eds.), pp 643-731. Wiley and Sons, New York.
- Forchhammer, K., Leinfelder, W. and Böck, A.** (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* 342, 453-456.
- Forchhammer, K., Rücknagel, K. P. and Böck, A.** (1990) Purification and biochemical characterization of SELB, a translation factor involved in selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 265, 9346-9350.
- Friedrich, M. J., De Veaux, L. C. and Kadner, R. J.** (1986) Nucleotide sequence of the *btuCED* genes involved in vitamin B12 transport in *Escherichia coli* and homology with components of periplasmic-binding-protein-dependant transport system. *J. Bacteriol.* 167, 928-934.
- Ghyselinck, N. B., Rigaudière et Dufaure, J. P.,** (1991) Une protéine androgéno-dépendante sécrétée par la tête de l'épididyme de souris présente des homologies élevées avec différentes glutathion peroxydases. *C. R. Acad. Sci. Paris* 313, série III, 1-6.

Ghyselinck, N. B., Dufaure, I., Lareyre, J. J., Rigaudière, N., Mattei, M. G. and Dufaure, J. P. (1993) Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependant GSHpx-like proteine specific to the mouse epididymosis. *Mol. Endocrinol.* 7, 258-272.

Gianninni, A. L. M., Caride, E. C., Martin-Bragan, V. M. and Rumjanek, F. D. (1995) F-10 nuclear binding proteins os *Schistosoma mansoni* : structural and functional features. *Parasitology* 110, 155-161.

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., 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. M. (1987) Aprotective carbohydrate epitope of major immunogen is expressed in Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). *J. Exp. Med.* 165, 865-878.

Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jacoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem* 249, 7130-7139.

Hamburger, J., Turetski, T., Kapeller, I. and Deresiewicz, R. (1991) Highly repeat short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 73-80.

Harris, E. D. (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB Journal* 6, 2675-2683.

Hazdai, R. T., Levi-Schaffer, F., Breuner, A., Horowitz, S., Eschar, Z. and Arnon, R. (1985) Protective monoclonal antibody against *Schistosoma mansoni*: antigen isolation, characterization and suitability for active immunization. *J. Immunol.* 135, 2772-2779.

Heider, J., Baron, C. and Böck, A. (1992) Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.* 11, 3759-3766.

Henkle, K. J., Cook, G. A., Foster, L. A., Engman, D. M., Bobek, L. A., Cain, G. D. and Donelson, J. E. (1990) The gene family encoding eggshell proteins of *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 69-82.

Henkle, K. J., Lieban, E. and Walter, R. (1993) Characterization of *O. volvulus* superoxide dismutase gene and mRNA processing. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 173-176.

Ho, Y. S. and Howard, A. J. (1992) Cloning and characterization of the rat glutathione peroxidase gene. *FEBS* 301, 1, 5-9.

Holland, D., Faltin, Z., Perl, A., Ben-Hayyim, G. and Eshdat, Y. (1994) A novel plant glutathione peroxidase-like protein provides tolerance to oxygen radicals generated by paraquat in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 337, 52-55.

- Howell, M. J., Board, P. G. and Boray, J. C. (1988)** Glutathione *S*-transferases in *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74, 715-718.
- Hughes, A. L. (1993)** Rates of amino-acid evolution in the 26- and 28-kDa glutathione *S*-transferases of *Schistosoma*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 43-52.
- Jaffe, J. J. and Lambert R. A. (1986)** Glutathione *S*-transferase in adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 199-206.
- Jamieson, D. (1989)** Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free. Rad. Biol. Med.* 7, 87-108.
- Joseph, M., Tonnel, A.B., Capron, A. and Voisin, C. (1980)** Enzyme released and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. *Clin. exp. Immunol.* 40, 416-422.
- Kawalek, J. C., Rew, R. S. and 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.
- Khalife, J., Godin, C. and Capron, A. (1995)** Involvement of an anti-oxidant response element in transcriptional regulation of *Schistosoma mansoni* calreticulin role of AP-1. *Parasitology* (sous presse).
- 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.
- Knight, M., Simpson, A. J. G., Payares, G., Chaudri, M. and Smithers, S. R. (1984)** Cell free synthesis of *Schistosoma mansoni* surface antigens : stage specificity of their expression. *EMBO J.* 3, 213-219.
- Lee, B. J., Kang, S. G. and Hatfield, D. (1989)** Transcription of *Xenopus* selenocysteine tRNA^{SE} (formerly designated opal suppressor phosphoserine tRNA) gene is directed by multiple 5'-extragenic regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 264, 9696-9702.
- Lee, B. J., Rajagopalan, M., Kim, Y.S., Jacobson, K.B. and Hatfield, D. (1990)** Selenocysteine tRNA^{(Ser)Sec} gene is ubiquitous within the animal kingdom. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1940-1949.
- Lee, P. T., Shababy, A., Medhat, A. M., Shi, H., Yang, Q., Karimquel, A. M. and Lo Verde, P. T. (1995)** *Schistosoma mansoni*: Characterization of the gene encoding Sm23, an integral membrane protein. *Exp. Parasitol.* 80, 155-158.
- Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A. and Böck, A. (1988a)** Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* 331, 723-725.
- Leinfelder, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrand-Berthelot, M. A. and Böck, A. (1988b)** *E. coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. *J. Bacteriol.* 170, 540-546.

- Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein, E. and Böck, A.** (1990) *In vitro* synthesis of selenocysteinyl-tRNA_{UCA} from seryl-tRNA_{UCA}: Involvement and characterization of the *selD* gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 543-547.
- Mc Nair, A. T., Dissous, C., Miret-Duvaux O. and Capron, A.** (1993) Cloning and characterization of the gene encoding the 28 kDa glutathione *S*-transferase of *Schistosoma mansoni*. Gene 124, 245-249.
- Mc Tigue, M. A., Williams, D. R. and Tainer, J. A.** (1995) Crystal structures of schistosomal drug and vaccine target: Glutathione *S*-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. J. Mol. Biol. 246, 21-27.
- Maiorino, M., Gregolin, C. and Ursini, F.** (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 186, 448-457.
- Maiorino, M., Chu, F. F., Ursini, F., Davies, K. J. A., Doroshon, J. H. and Esworthy, R. S.** (1991) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18 kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. J. Biol. Chem. 266, 12, 7728-7732.
- Maiorino, M., Roveri, A., Gregolin, C. and Ursini, F.** (1995) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: more than an antioxidant enzyme? In: Biothiols in health and disease (Parker, L. and Cadenas, E., eds.) Marcel Dekker Inc. New York, pp265-286.
- Maiorino, M., Aumann, K.D., Brigélius-Flohé, R., Doria, D., van Del Heuvel, J., Mc Carty, J., Roveri, A., Ursini, F. and Flohé, L.** (1995b) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGSHpx). (Soumis).
- Mannervik, B.** (1985) Glutathione Peroxidase. Methods in Enzymology 113, 490-495.
- Martin-Alonson, J. M., Ghosh, S. and Coca-Prados, M.** (1993) Cloning of the bovine plasma Se-dependant glutathione peroxidase cDNA from the ocular ciliary epithelium. Expression of the plasma and cellular forms within the mammalian eye. J. Biochem. 114, 284-291.
- Maser, R. L., Magenheimer, B. S. and Calvet, J. P.** (1994) Mouse plasma glutathione peroxidase : cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. J. Biol. Chem. 269, 27066-27073.
- Mei, H. and Lo Verde, P. T.** (1995) *Schistosoma mansoni*: cloning the gene encoding glutathione peroxidase. Exp. Parasitol. 80, 319-322.
- Meister, A.** (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. J. Biol. Chem. 263, 33, 17205-17208.
- Mills, G. C.** (1957) Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Biol. Chem. 229, 189-197.

- Minard, P. I., Dean, D. P., Jacobson, R. H., Vannier, W. E. and Murrell (1978)** Immunization of a mice with cobalt-60-irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 76-86.
- Minchella, D. J., Lewis, F. A., Sollenberger, K. M. and Williams, J. A. (1994)** Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* : quantifying stain heterogeneity using a polymorphic DNA element. *Mol. Biochem. Parasitol.* 68, 307-313.
- Mirault, M. E., Tremblay, A., Beauchain, N. and Tremblay, M. (1991)** Overexpression of seleno-glutathione peroxidase by gene transfer enhances the resistance of T47D human breast cells to clastogenic oxidants. *J. Biol. Chem.* 266, 31, 20752-20760.
- Mitchell, G. F. (1989)** Glutathione-S-transferases: Potential components of anti-schistosome vaccine? *Parasitol. Today* 5, 34-37.
- Mkoji, G.M., Smith, J. M. and Prichard, R. K. (1988a)** Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni* : correlation between succceptibility 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. and 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.
- 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.
- Morello, A., Repetto, Y. and Atias, A. (1982)** Characterization of glutathione-S- transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72, 449-452.
- Moscow, A. J., Morrow, C. S., He, R., Mullenbach, G. T. and Cowan, K. H. (1992)** Structure and function of the 5'-flanking sequence of the human cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene (hgp1). *J. Biol. Chem.* 267, 9, 5949-5958.
- Mostafa, M. H., Badawi, A. F. and O'Connor, P. J. (1995)** Bladder cancer associated with schistosomiasis. *Parasitol. Today* 11, 87-.
- Mullenbach, G. T., Tabrizi, A., Irvine, B. D., Bell, G. I., Tainer, J. A. and Hallewell, R. A. (1988)** cDNAs of three glutathione peroxidases: selenocysteine incorporation. In : *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, pp 313-326, Alan R. Liss, Inc.
- Musto, H., Rodriguez-Maseda, H., Alvarez, F. and Tort, J. (1994)** Possible implications of CpG avoidance in the flatworm *Schistosoma mansoni*. *J. Mol. Evol.* 38, 36-40.
- Nara, T., Iwamura, Y., Tanaka, M., Irie, Y. and Yasuraoka, K. (1990)** Dynamic changes of DNA sequences in *Schistosoma mansoni* in the course of development. *Parasitology* 100, 241-245.

- 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.
- Neumann, S., Ziu, E., Lanten, F. and Schechter, I.** (1992) Cloning and sequencing an hsp 70 gene of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 357-360.
- 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.
- O'Leary, K. and Tracy, J. W.** (1988) Purification of three cytosolic glutathione-S-transferases from adult *Schistosoma mansoni*. *Arch. Biochem. Biophys.* 264, 1-12.
- O'Leary, K. and Tracy, J. W.** (1991) *Schistosoma mansoni* : glutathion S-transferase catalysed detoxification of dichlorvos. *Exp. Parasitol.* 72, 355-361.
- O'Prey, J., Ramsay, S., Chambers, I. and Harrison, P. R.** (1993) Transcriptional up regulation of the mouse cytosolic glutathione peroxidase gene in erythroïd cells is due to a tissue-specific 3'enhancer containing functionally important CACC/GT motifs and binding sites for GATA and Ets transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 13, 10, 6290-6303.
- Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S. and Sharpp, P. A.** (1986) Splicing of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1119-1150.
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N.** (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med* 70, 158-169.
- 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.
- Pearce, E. J., James, S. L., Hierry, S., Lanar, D. and 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. (USA)* 85, 5678-5682.
- Pemberton, K. D. and Barrett, J.** (1989) The detoxification of Xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda : Filarioïdea). *Int. J. Parasitol.* 72, 401-409.
- Perry, A. C. F., Jones, R., Niang, L. S. P., Jackson, R. M. and Hall, L.** (1992) Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contains a selenocysteine codon. *Biochem. J.* 285, 863-870.
- Philippe, H.** (1993) MUST, a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nucl. Acids Res.* 21, 5264-5272.

- Picot, H.** (1993) La lutte contre les schistosomiasis. Rev. Prat. (Paris) 43, 4, 462-465.
- Pierce, R. J., Auriault, C., Balloul, J. M., Boulanger, D., Capron, M., Grzych, J. M., Velge-Roussel, F., Verwærde, 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 der Pløeg, L., Cantor, C. R., Vogel, H. J., eds), pp105-122, P and S Biomedical Sciences Symposia, Academic Press, San Diego, CA.
- Pierce, R. J. and Capron, A.** (1994) Development of a recombinant vaccine against schistosomiasis. In: Modern Vaccinology (Kurstak, E., ed.) pp357-380, Plenum Medical, New York.
- Prohaska, J.R.** (1980) The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases. Biochim. Biophys. Acta 611, 87-98
- Rajkovic, A., Davis, R. E., Simonsen, J. N. and Rottman, F. M.** (1990) A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8879-8883.
- Reis, M. G., Davis, R. E., Singh, H., Skelly, P. J. and Shoemaker, C. B.** (1993) Characterization of the *Schistosoma mansoni* gene encoding the glycolytic enzyme, triose phosphate isomerase. Mol. Biochem. Parasitol. 59, 235-242.
- Roche, C., Williams, D. L., Khalife, J., Le Presle, T., Capron, A. and Pierce, R. J.** (1994) Cloning and characterization of gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase. Gene 138, 149-152.
- Roche, C., Liu, J. L., Lepresle, T., Capron, A. and Pierce, R. J.** (1995) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*: production using baculovirus, localization and stage-specific expression. Mol. Biochem. Parasitol. (soumis).
- Rocher, C., Lalanne, J.L. and Chaudière, J.** (1992) Purification and properties of a recombinant sulfur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. Eur. J. Biochem. 205, 955-960.
- Rollinson, D. and Southgate, V. R.** (1987) The genus schistosoma : a taxonomic appraisal. In : The Biology of Schistosomes. (Rollinson, D., Simpson, A. J. G., eds.), pp1-49, Academic Press, New York.
- Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P., Calligar and Ursini, F.** (1992) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis : gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. The J. Biol. Chem. 267, 9, 6142-6146.
- Roveri, A., Maiorino, M. and Ursini, F.** (1994) Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane bound PHGPX. Methods in Enzymology 233, 202-212.
- Sandstrom, P. A., Tebby, P. W., Cleave, S. V. and Buttke T. M.** (1994) Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. J. Biol. Chem. 269, 2, 798-801.

- Shen, Q., Chu, F.F. and Newburger, P.E.** (1993) Sequences in the 3' untranslated region of the human cellular glutathione peroxidase gene are necessary and sufficient for the selenocysteine incorporation at the UGA codon. *J. Biol. Chem.* 268, 11463-11469.
- Shichi, H. and Demar, J. C.** (1990) Non selenium glutathione peroxidase without glutathione S-transferase activity from bovine ciliary body. *Exp. Eye. Res.* 50, 513-520.
- Shoemaker, C. B., Ramachandran, H., Landa, A., Dos Reis, M. G. and Stein, L. D.** (1992) Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53, 17-32.
- Shoemaker, C. B.** (1994) The *Schistosoma mansoni* phosphogen kinase gene contains two closely apposed transcription initiation sites and arose from a fused gene duplication. *Mol. Biochem. Parasitol.* 68, 319-322.
- Simpson, A. J. G., Sher, A. and Mc Cutchan, T. F.** (1982) The genome of *Schistosoma mansoni* : isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 125-137.
- Simpson, A. J. G. and Knight, M.** (1986) Cloning of a major developmentally regulated gene expressed in mature females of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22, 169-176.
- Simurda, M. C., Vankeulen, H., Rekosh, D. M. and Lo Verde, P. T.** (1988) *Schistosoma mansoni* : identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Exp. Parasitol.* 67, 73-84.
- Singer, M. and Berg, G.** (1992b) In : Gènes et génomes. pp 557-557, Ed. Vigot, Paris.
- Smith, D. B., Davern, K. M., Board, P. G., Thiu, W. V., Garcia, E. G. and Mitchell, G. E.** (1986) Mr 26 aa antigen of *Schistosoma japonicum* recognised by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 8703-8707.
- Smith, M. A. and Clegg, J. A.** (1985) Vaccination against *Schistosoma mansoni* with purified surface antigens. *Science* 227, 535-537.
- Spotila, L. D., Hirai, H., Rekosh, D. M. and Lo Verde, P. T.** (1989) A retroposon like short repetitive DNA element in the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Chromosoma* 97, 421-428.
- Spotila, L. D., Rekosh, D. M. and Lo Verde, P. T.** (1991) Polymorphic repeated DNA element in the genome of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48, 117-120.
- Stein, L. D. and David J. R.** (1986) Cloning of a developmentally tegument antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 253-264.
- Stadman, T. C.** (1991) Biosynthesis and function of selenocysteine containing enzymes. *J. Biol. Chem.* 266, 25, 16257-16260.

- Sunde, R. A. and Evenson, J. K. (1987)** Serine incorporation into selenocysteine moiety of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 262, 933-937.
- Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J. and Cohen, H. J. (1987)** Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 667-686.
- Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J. and Koyama, J. (1990)** Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J. Biol. Chem.* 108, 145-148.
- Talla, I., Kengs, A. and Verlé, P. (1992)** Preliminary study of the prevalence of human schistosomiasis in Richard-Toll. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86-182.
- Tanaka, M., Hirai, H., Lo Verde, P. T., Nagafuchi, S., Franco, G. R., Simpson, A. J. G. and Pena, S. D. J. (1995)** Yeast artificial chromosome (YAC) based genome mapping of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biol. Chem. Parasitol.* 69, 41-51.
- Taylor, M. G. (1975)** Towards the development of a live vaccine for schistosomiasis. In : Nuclear techniques in helminthology research. pp 165-173, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Taylor, M. G. and Bickle, Q. D. (1986)** Towards a schistosomiasis vaccine : irradiated schistosomes vaccines. *Parasitology today* 2, 132-134.
- Taylor, J. B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D. J., Roitsch, C., Balloul, J. M., Southan, C., Soudermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J. P., Capron, A. and Kelter, 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.
- Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A.W. (1990a)** Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation: *in situ* reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 265, 454-461.
- Thomas, J.P., Geiger, P.G., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A.W. (1990b)** Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteines. *Biochim. Biophys. Acta* 1045, 252-260.
- 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.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L. and Gregolin, C. (1982)** Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochem. Biophys. Acta* 710, 197-211.
- Ursini, F., Maiorino, M., and Gregolin, C. (1985)** The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 839, 62-70.

- Ursini, F., Maiorino, M., Brigélius-Flohé, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D. and Flohé, L. (1995) Diversity of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 252, 38-53.
- Vande Waa, E. A., Campbell, C. K., O' Leary, K. A. and Tracy, J. W. (1993) Induction of *Schistosoma mansoni* glutathione *S*-transferase by xenobiotics. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 15-21.
- Velge-Roussel, F., Verwærde, 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.
- Verwærde, 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.
- Weitzel, F., Ursini, F. and Wendel, A. (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathion peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim. Biophys. Acta* 1036, 88-94.
- Weston, K., Yochem, J. and Greewald, I. (1989) A *Cænorhabditis elegans* cDNA that encodes a product resembling the rat glutathione *S*-transferase P subunit. *Nucl. Acids. Res.* 17, 2138.
- Williams, D. L., Pierce, R. J., Cookson, E. and Capron, A. (1992) Molecular cloning and sequencing of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem. Parasitol.* 52, 127-130.
- Wolowczuk, I., Kimani, G., Boulanger, D., Butterworth, A. E., Gras-Masse, H., Tartar, A., Ouma, J. H., Tarara, R., Reid, G. D. F., Kœch, D., Auriault, C. and Capron, A. (1993) A study of the human and primate lymphocyte responses to synthetic peptides of the Sm28 GST protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *J. Clin. Microbiol.* in press.
- Xu, C. B., Verwærtde, 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.
- Yamamoto, Y. and Takahashi, K. (1993) Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 541-545.
- Yoshimura, S., Takekoshi, S., Watanabe, K., Fujii-Kuriya, V. (1988) Determination of nucleotide sequence of cDNA coding rat glutathione peroxidase and diminished expression of mRNA in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 1024-1028.
- Yoshimura, S., Watanabe, K., Suemizu, H., Onozana, T., Mizoguchi, J., Tsuda, K., Hatta, H. and Moriuchi, T. (1991) Tissue specific expression of the plasma GSHpx gene in rat kidney. *J. Biochem.* 109, 918-923.

Yoshimura, S., Suemizu, H., Taniguchi, Y., Arimori, K., Kawabe, N. and Moriuchi, T. (1994) The human plasma glutathion peroxidase-encoding gene : organization sequence and localisation to chromosome 5q32. *Gene* 145, 293-297.

Zemzoumi, K., Dissous, C., Cochu, A., Trolet, J., Capron, A. and Mc Nair, A. (1995) *Schistosoma mansoni* : interaction of nuclear extracts with the CCAAT-binding site revealed by the gel shift assay. *Exp. Parasitol.* 80, 149-154.

Zinoni, F., Birkmann, A., Stadman, T. and Böck, A. (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4650-4654.

Zinoni, F., Birkmann, A., Leinfelder, W. and Böck, A. (1987) Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia Coli* directed by a UGA codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84,3156-3160.

Zvelbil, M. J. J. M., Tang, L., Cookson, E., Selkirk, M. E. and Thornton, J. M. (1993) Molecular modelling and epitope prediction of Gp29 from lymphatic filariæ. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 145-153.

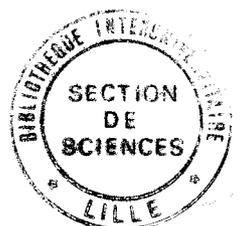


Table des matières

Introduction	p12
Le schistosome et la schistosomiase	p19
A) Place dans le règne animal et taxonomie	p20
B) Cycle évolutif	
C) Biologie du Schistosome	p24
D) Génétique du Schistosome	p27
E) Pathologie	p32
F) Diagnostic	p33
G) Lutte contre les schistosomiasés	
1- Traitement de masse et traitements ciblés	
2- Education sanitaire et assainissement	p35
3- La lutte contre les mollusques	
4- Prophylaxie médicale	p36
Mécanismes de détoxification chez les helminthes	p40
A) Origine des radicaux oxydants	p41
B) Les enzymes anti-oxydantes	p42
1) La superoxyde dismutase	
2) La catalase	p44
3) La cytochrome C peroxydase	
4) Les glutathion <i>S</i> -transférases	
a) Détoxification des xénobiotiques	p45
b) Détoxification des peroxydes lipidiques	p47
c) Fonction de liaison	
5) Les glutathion peroxydases	p48
6) Les glutathion réductases	p49
C) Régulation de l'activité anti-oxydante au cours du développement	



Les glutathion peroxydases	p51
I) Généralités	p52
A) Réaction enzymatique	p53
B) Mécanisme cinétique	
C) Principe de dosage de l'activité GSHpx	p55
D) Rôle biologique	
II) Les différents types d'enzymes GSHpx	p56
1) La GSHpx "classique" GSHpx-1	
2) La GSHpx gastro-intestinale (GSHpx GI)	p57
3) La GSHpx plasmatique	p58
4) La phospholipide hydroperoxyde GSHpx	p59
5) Les enzymes analogues aux GSHpxs	p61
a) La gp 29	
b) Autres GSHpxs décrites	
III) Régulation de l'expression des GSHpxs	p63
IV) Glutathion peroxydases et sélénocystéine	p65
A) Le sélénium	p66
1) Historique	
2) La Sélénocystéine	p67
3) Rôle du Sélénium	
B) Mécanisme d'incorporation de la SeCys	p69
1) Le codon TGA	
2) L'ARNt supprimeur	
3) Modalités de reconnaissance du codon TGA	p72
a) Les sélénoprotéines procaryotes:	
Modèle de la formate deshydrogénase H d'E. coli (Berg et coll.,	
1991a et b)	

b) Les sélénoprotéines eucaryotes:	
Modèle de la type I iodothyronine 5' déiodinase (Berry et coll., 1991)	p74
Résultats - Discussion	p79
A) Etude du gène de la glutathion peroxydase de <i>Schistosoma mansoni</i>	p80
Article n°1, paru dans Gene	p81
Article N°2, en préparation	p92
B) Purification et caractérisation enzymatique de la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase de <i>S. mansoni</i>	p93
1°) Caractérisation d'une activité GSHpx au sein d'une préparation cytosolique de vers adultes	p95
2°) Purification de la protéine native Sm PHGSHpx	p101
C) Etude de l'expression de la SmGSHpx <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .	p105
Article n°3, accepté dans Molecular and Biochemical Parasitology	p107
Approche dans l'analyse fonctionnelle de la région promotrice du gène de la Sm(PH)GSHpx	p142
D) Elaboration d'une construction phylogénique des GSHpx	p148
E) Exploration du pouvoir immunogène de la SmGSHpx	p152
Discussion- Perspectives	p156
A) Organisation et séquence du gène de la Sm(PH)GSHpx	p158
B) La Sm(PH)GSHpx est une sélénoprotéine	p164
C) Le gène étudié s'apparenterait à une phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase	p167
D) Le peptide correspondant à la région C-terminale de la Sm(PH)GSHpx semble être un antigène naturel de la schistosomiase	p171
Annexe technique	p173
I) Préparation de fractions cytosoliques de <i>S. mansoni</i>	p174

II) Chromatographie en gel d'exclusion des préparations cytosoliques de <i>S. mansoni</i> et mesure de l'activité GSHpx et GST	p175
III) Purification de l'activité PHGSHpx de <i>S. mansoni</i>	p176
IV) Exploration de l'activité promotrice	p177
V) Exploration du pouvoir immunogène du peptide de synthèse correspondant à l'extrémité C-terminale de la Sm(PH)GSHpx	p179
Références bibliographiques	p181