

OUWE MISSI OUKEM-BOYER Odile

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE I  
en Sciences de la Vie et de la Santé

RECHERCHE ET CARACTÉRISATION D'UNE MOLÉCULE  
IMMUNOLOGIQUEMENT APPARENTÉE AU TNF $\alpha$   
CHEZ LE MOLLUSQUE *BIOMPHALARIA GLABRATA*,  
HOTE INTERMÉDIAIRE DU PARASITE *SCHISTOSOMA MANSONI* :  
INTÉRÊT DANS LA RELATION HOTE-PARASITE



Soutenu le 7 Novembre 1995

CENTRE D'IMMUNOLOGIE ET DE BIOLOGIE PARASITAIRE  
INSERM U 167  
INSTITUT PASTEUR DE LILLE

Président  
Rapporteurs  
Examineurs

Pr. A. DHAINAUT  
Dr. J. JOURDANE  
Dr. J. PESTEL  
Pr. A. CAPRON  
Dr. C. DISSOUS



*A la mémoire de mes grands-parents  
A mes parents  
A toute ma famille et belle-famille  
A tous mes amis*

*A mon époux, René  
A ma fille, Marie-Sarah  
A l'enfant qui grandit en moi*

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité INSERM 167, au sein de l'Institut Pasteur de Lille, dirigé par Monsieur le professeur A. Capron, et plus particulièrement, dans le groupe de recherche étudiant les "bases moléculaires de la relation hôte-parasite" dans le modèle de la schistosomiase. Ce groupe est animé par Madame le Docteur C. DISSOUS.

Le Conseil Régional du Nord/Pas de Calais et l'Institut Pasteur de Lille ont participé au financement de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier:

Monsieur le Professeur A. CAPRON.

Je vous ai rencontré pour la première fois en Octobre 1989 à l'Institut Pasteur de Paris lors du Congrès Pasteur-Weissman et lorsque je vous ai demandé de faire le stage pratique de mon DEA parisien dans votre laboratoire, vous avez immédiatement accepté. Le sujet de cette thèse n'était pas simple, mais il vous tenait beaucoup à coeur. J'en étais consciente et malgré les difficultés, j'ai toujours essayé de me montrer digne de la confiance que vous avez eue en moi. Que ce mémoire soit le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur C. DISSOUS.

Vous avez accepté de m'accueillir au sein du groupe de recherche que vous animez. Vous m'avez fait profiter de vos connaissances sur le parasite *S. mansoni* et son hôte intermédiaire, le mollusque *B. glabrata*. Pendant ces années, j'ai beaucoup appris grâce à vos excellentes compétences techniques. Enfin, vous m'avez aidée par vos conseils et vos critiques dans la rédaction de notre article et de ce manuscrit. Qu'il me soit permis de vous remercier pour avoir guidé l'ensemble de ces travaux.

Monsieur le Professeur A. DHAINAUT

Mes études m'ont donné l'occasion de fréquenter les facultés de Marseille-Luminy et de Paris VII ainsi que l'Institut Pasteur de Paris et celui de Lille. Bien que je n'ai pas vraiment fréquenté les bancs de la faculté de Lille I, j'y suis néanmoins très attachée puisque c'est ici que va s'achever mon parcours étudiant. Je suis donc très heureuse de soutenir cette thèse au sein de cette université et c'est un grand honneur que vous en ayez accepté la présidence. Soyez-en vivement remercié.

Monsieur le Docteur J. JOURDANE

Vous avez volontiers accepté de lire ce mémoire et de le juger, et vous n'avez pas hésité à traverser la France pour faire partie de ce jury. Etant originaire de Marseille, j'y suis d'autant plus sensible. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur J. PESTEL

Au delà de vos conseils, de vos critiques et de nos fructueuses discussions, vous avez accepté non seulement de faire partie de ce jury mais aussi de juger ce travail. Soyez assuré de ma gratitude et de ma profonde considération.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à tout le personnel du CIBP de l'Institut Pasteur de Lille, pour m'avoir accompagnée, aidée, soutenue, encouragée au cours de ces années de DEA et de Thèse.

Je pense tout d'abord aux membres qui font ou qui ont fait partie du groupe "Bases moléculaires de la relation hôte-parasite", Monsieur le Docteur Mustapha Chamekh pour son amitié, ses conseils et sa constante bonne humeur, Monsieur le Docteur Alan Mc Nair pour sa gentillesse, son humour et ses critiques, Monsieur Jacques Trolet pour sa disponibilité et son aide précieuse pour la réalisation de ce travail, Madame le Docteur Odile Duvaux pour son enthousiasme et son dynamisme, Mademoiselle le Docteur Blandine Baratte pour sa fidèle amitié et sa gentillesse, Monsieur le Docteur Khalid Zemzoumi pour nos discussions et notre complicité quotidiennes, mais aussi Pascal Duclermortier et Vinca Lardans pour la lecture de certaines parties de ce manuscrit et Esteban Serra pour sa disponibilité et ses discussions enrichissantes.

Je tiens à remercier d'autre part Monique Leroux et Suzanne Vanwingene pour la production de mollusques, Jacques Trolet pour l'apprentissage de nombreuses techniques de biologie moléculaire, Marc Loyens pour sa disponibilité et ses conseils techniques, Jean-Loup Neyrinck pour ses connaissances informatiques et statistiques, Han Vorng pour son aide et sa disponibilité, Christian Drolez pour la réalisation des documents photographiques, Arnaud pour la couverture de ce mémoire et enfin José Milleville pour tous ses menus services qui facilitent notre travail quotidien et les femmes de la laverie qui savent nous rendre service aussi gentilleme nt qu'efficacement .

Mes pensées vont aussi aux personnes qui ont des fonctions plus administratives mais non moins précieuses, et tout particulièrement Sylvie Anne Lafdal du secrétariat de direction, Claudine Colson, Nadine Vantouroux et Gisèle Lemarchand

du secrétariat scientifique, Maria Delehouze et Jean-Michel Goudercourt du secrétariat de gestion, Jackeline Deryck et Chantal Kizonzolo de la bibliothèque, ainsi que tout le personnel de la bibliothèque centrale.

Je n'oublie pas non plus toutes les personnes qui m'ont conseillée et encouragée tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Ali OuaiSSI qui n'a cessé de s'intéresser à l'avancement de mes travaux, qui a su me conseiller, me critiquer et m'encourager chaque fois que cela était nécessaire, et qui a accepté malgré ses nombreuses responsabilités de lire ce manuscrit. Sans lui, ce mémoire n'aurait probablement pas vu le jour.

Je remercie également Eliane Porchet pour sa précieuse contribution à notre article et sa gentillesse, Joël Pestel pour son écoute attentive et ses conseils et ses encouragements, Claudie Verwaerde, Jamal Khalife, Marie-France Cesbron-Delauw (Institut Pasteur de Lille), Michel Descamps (Faculté de Villeneuve d'Ascq), Geneviève Millon (Institut Pasteur de Paris) et tous ceux ou celles qui m'ont aidé scientifiquement pendant ces années.

Un grand merci à Karine Lambin et à son père pour les photocopies couleurs incluses dans ce manuscrit.

Enfin, je ne saurais terminer sans citer les noms de tous ceux et celles que j'ai eu la chance de connaître et apprécier, et qui au sein du laboratoire sont devenus petit à petit des amis : je pense notamment à Nathalie Ivanoff, Isabelle Wolowczuk, Monique Marguerite, Hector Escriva, Ali Taibi, Bilel Yahiaoui, Ralf Schöneck, Rodolfo Fernandez-Gomez, Angel Guevara-Espinosa et Bouchaïb Lamkhioed.

A tous ceux que j'aurais omis de remercier ici, je les prie de bien vouloir m'en excuser très sincèrement.

Les résultats de nos travaux ont fait l'objet d'une publication et de deux posters:

#### Publication

Ouwe Missi Oukem-Boyer, O.; Porchet, E.; Capron, A.; Dissous, C. Characterization of immunoreactive TNF $\alpha$  molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. Dev. Comp. Immunol. 18 (3):211-218; 1994.

#### Posters

Boyer, O.; Porchet, E.; Duclermortier, P.; Trolet, J.; Capron, A.; Dissous, C. Molécules cytokine-like chez l'hôte invertébré de *S. mansoni*, le mollusque *Biomphalaria glabrata*. Réunion de printemps de la Société Française d'Immunologie, Paris, 27-28 Mai 1993.

Boyer, O.; Porchet, E.; Trolet, J.; Lardans, V.; Capron, A.; Dissous, C. Invertebrate cytokines: identification of TNF $\alpha$  immunoreactive molecules in *Biomphalaria glabrata*. Spring meeting of the British Society of Parasitology, University of Bath, 6-8 April 1994.



# SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS.....	10
RÉSUME.....	13
INTRODUCTION.....	15
- I Introduction au parasitisme et à la relation hôte-parasite.....	16
- II La schistosomiase.....	18
- III Les modèles mollusques-trématodes.....	43
- IV Le couple <i>B.glabrata-S.mansoni</i> .....	60
- V Les cytokines d'invertébrés.....	78
BUT DU TRAVAIL.....	87
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	89
DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	130
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	142
- Première partie : Biologie et Biochimie.....	143
- Deuxième partie : Biologie moléculaire.....	153
BIBLIOGRAPHIE.....	176
TABLE DES MATIERES.....	206

## ABREVIATIONS

ACTH : hormone adrénocorticotrope  
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
 $\alpha$ -MSH : hormone mélanotrope  
ARN : acide ribonucléique  
 $\beta$ -end : beta endorphine  
BET : bromure d'éthidium  
*Bg* : *Biomphalaria glabrata*  
BSA : sérum albumine bovine  
CD : " cluster" de différenciation  
CMH : complexe majeur d'histo-compatibilité  
CSF : colony stimulating factor  
DEPC : diéthylpyrocarbonate  
DNase : désoxyribonucléase  
dNTP : désoxyribonucléotide-triphosphate  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
D.O. : densité optique  
EDTA : Acide Ethylène Phényl Diamine Tétracétique  
ES : produits d'Excrétion-Sécrétion  
EGF : epidermal growth factor  
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
FGF : fibroblast growth factor  
FITC : fluoroisothicyanate  
HCA : Hydrophobic Cluster Analysis  
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography  
Ig : immunoglobuline  
IL : interleukine  
INF : interféron  
IPTG : isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
KLH : keyhole limpet hemocyanin : glycane de l'hémocyanine de lamproie  
LGCs : Light Green Cells : cellules nerveuses du mollusque *Lymnaea stagnalis*  
LPS : lipopolysaccharide  
MEM : Minimal Eagle Essential Medium  
MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide

NGF : nerve growth factor  
NK : natural killer  
p : probabilité  
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
pb : paire de bases  
PBS : phosphate buffered saline : tampon phosphate  
PCR : réaction de polymérase en chaîne  
PDGF : platelet derived growth factor  
PEG : polyéthylène glycol  
pI : point isoélectrique  
PMSF : Fluorure de Méthyle Phényle Sulfonyle  
PPO : 2,5-Diphényloxazole  
RIA : radioimmunoassay  
RNase : ribonucléase  
SDS : sodium dodécylsulfate  
*Sm* : *Schistosoma mansoni*  
TCA : acide trichloroacétique  
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
TGF : transforming growth factor  
UV : ultra-violets  
3-D : tridimensionnel

*“We live in evolutionary competition with microbes, bacteria and viruses. There is no guarantee that we will be the survivors”.*

Joshua Lederberg

## RÉSUMÉ

Ces dernières années, plusieurs études ont démontré l'existence de molécules apparentées aux cytokines chez les invertébrés, en particulier chez les Urochordés, les Echinodermes, les Annélides et les Mollusques, suggérant ainsi que les cytokines pourraient avoir été conservées tout au long de l'évolution.

Au cours de ce travail, nous avons confirmé la présence d'une molécule apparentée au TNF $\alpha$  chez le mollusque gastéropode pulmoné *Biomphalaria glabrata*, hôte intermédiaire du parasite trématode *Schistosoma mansoni*.

Des analyses immunocytochimiques ont montré la fixation d'anticorps anti-TNF $\alpha$  au niveau des granules des hémocytes adhérents et non adhérents. Ces anticorps reconnaissent dans des extraits d'hémocytes, d'hémolymphe, de glande digestive et de mollusques entiers, un seul composant de 53 kDa. La taille de cette molécule mise en évidence par western blot est trois fois plus importante que celle du TNF $\alpha$  humain (17 kDa), mais ne semble pas correspondre à la forme trimérique de celui-ci. Cependant des molécules apparentées au TNF $\alpha$  ayant une taille d'environ 50 kDa ont déjà été décrites chez les vertébrés.

Pour quantifier l'immunoréactivité détectée vis-à-vis du TNF $\alpha$  dans les différents tissus du mollusque, des dosages en ELISA ont été réalisés. Dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe, la quantité de matériel immunoréactif vis-à-vis du TNF $\alpha$  a été évaluée à 61,5 pg/ml, résultat compatible avec celui rapporté chez la moule (128 pg/ml). Dans les extraits d'hémocytes, de glande digestive et de mollusques entiers, des quantités plus faibles -mais néanmoins significatives- de composants TNF $\alpha$  immunoréactifs ont été détectées. Lors de l'infection de *B. glabrata* par *S. mansoni*, leur expression apparaît modulée. Dans l'hémolymphe en particulier, une analyse cinétique indique que la quantité de ces molécules diminue fortement (30-50%) et irréversiblement, dès la pénétration des miracidies dans les mollusques.

Ce travail a été poursuivi par la recherche de séquences nucléotidiques homologues à celles du TNF $\alpha$ . Le criblage d'une banque d'expression de *B. glabrata* avec les anticorps anti-TNF $\alpha$  reconnaissant la molécule de 53 kDa en western blot a permis d'obtenir deux clones différents : OB5 et OB14. Leurs séquences de 270 et 327 pb respectivement, correspondent chacune à un cadre de lecture ouvert sans interruption, soit 90 AA pour OB5 et 109 AA pour OB14. Les protéines recombinantes OB5 et OB14 ont été produites et sont reconnues spécifiquement par le sérum de criblage anti-TNF $\alpha$ .

Les comparaisons des séquences en acides aminés de ces protéines avec les banques de données n'ont révélé aucune homologie particulière. Cependant, des zones d'homologies avec le TNF $\alpha$  peuvent être décelées. Les scores d'homologie (60-80%) et d'identité obtenus (20-40%) sont du même ordre que ceux rapportés pour d'autres "cytokines-like" d'invertébrés.

L'ensemble de ces observations sont discutées dans le cadre de la relation que le parasite entretient avec son hôte intermédiaire, le mollusque *B. glabrata*.

# INTRODUCTION

I

INTRODUCTION AU PARASITISME  
ET À LA RELATION HÔTE-PARASITE



La nature abrite depuis toujours de nombreuses espèces dont les interactions sont relativement variées. Les relations entre un organisme vivant et un individu d'une autre espèce peuvent être bénéfiques, néfastes ou indifférentes pour les deux partenaires, mais il arrive souvent qu'elles soient plus ou moins déséquilibrées, aboutissant au net avantage ou au détriment d'un individu sur l'autre.

Le parasitisme est un exemple d'association hétérosécifique où la survie d'un individu (parasite) se fait aux dépens de l'autre (hôte). Il concerne tous les êtres vivants (Price, 1980) soit en tant qu'hôtes, soit en tant que parasites.

Les parasites, organismes qui envahissent toutes les formes de vie, qu'elles soient végétales ou animales (vertébrées ou invertébrées), créent lors de ces associations des relations intimes avec l'espèce dont ils dépendent.

Initialement, la rencontre entre certains parasites et leur hôte a pu se produire accidentellement par ingestion ou pénétration cutanée, donnant naissance aux endoparasites, organismes s'installant à l'intérieur de leur hôte pour accéder facilement aux ressources dont ils ont besoin. Ces parasites ont cependant dû développer des stratégies d'échappement vis-à-vis des réactions de défense de l'hôte, générant ainsi de fascinantes interactions entre les deux partenaires.

La coévolution des hôtes et des parasites ainsi que leur adaptation mutuelle a été guidée par une sélection naturelle visant à favoriser l'émergence de parasites moins virulents et d'hôtes plus résistants. En effet, des parasites trop virulents compromettraient rapidement leur survie, en induisant indirectement leur propre suicide.

La relation hôte-parasite (terme introduit par Théobald Smith en 1934) se traduit donc par un équilibre dynamique, complexe et extraordinairement raffiné entre les deux espèces, où chaque couple évolue vers une mutuelle adaptation. Elle permet ainsi au parasite de survivre et de se multiplier tout en assurant la pérennité de son hôte.

II

LA SCHISTOSOMIASE

## I. Généralités

La schistosomiase, encore appelée bilharziose, est une affection parasitaire très ancienne puisque les hommes étaient déjà atteints par ce fléau dans l'Ancienne Egypte. En effet, le premier document décrivant cette maladie est le célèbre papyrus médical d'Ebers daté de 1500 ans avant Jésus-Christ, où la présence de sang dans l'urine était d'ores et déjà reliée à un ver parasite (Figure 1). De plus, des calcifications bilharziennes ont été retrouvées dans la vessie d'une momie de la XX<sup>e</sup> dynastie (règne des Ramessides, vers 1200 avant Jésus-Christ).

Seconde endémie mondiale après le paludisme, la bilharziose représente d'un point de vue socio-économique une très lourde charge pour les soixante-quatorze pays et territoires concernés. Sur les 3 milliards d'habitants vivant dans ces pays en voie de développement, environ 600 millions sont exposés au risque d'infestation et 200 à 300 millions d'individus sont infectés (Capron, 1993-a). L'estimation de la population mondiale touchée par la schistosomiase n'a pas évolué depuis 1984, et cela en dépit du succès des programmes de lutte (OMS, 1993). La raison essentielle de cette situation tient à la poursuite de la croissance démographique de ces pays en développement où la schistosomiase est endémique. De par sa prévalence, sa large distribution, son importance dans la morbidité et l'inconfort physique et moral qu'elle suscite, elle reste de nos jours l'un des plus grands fléaux de santé publique à l'échelle planétaire. On estime en effet à cinq cent mille le nombre d'individus qui meurent chaque année des suites de l'infection.

Certaines espèces de schistosomes sont pathogènes pour l'homme et engendrent 2 formes principales de bilharzioses: la forme urinaire provoquée par des vers adultes de l'espèce *S. haematobium* (découvert par Bilharz en 1852), et la forme intestinale due aux espèces *S. mansoni* (Manson, 1902/ Sambon, 1907), *S. japonicum* (Katsurada, 1904) ou *S. mekongi* (Voge et coll.,1978).

Représentation du plus vieux document parasitologique  
 connu donnant une description de la schistosomiase  
 (Papyrus d'Ebers datant de plus de 3500 ans)



D'après J. Joosse, K. Bakker et H.M. van Emden (eds.)  
 Parasieten : ongenode gasten. Biologische Raad, Amsterdam, 1990.

Figure 1

Une autre forme à localisation rectale et génitale est engendrée par l'espèce *S. intercalatum* (Fisher, 1934).

A côté de ces espèces anthropophiles, existent des espèces zoophiles -notamment *S. bovis* (Sonsino, 1876)- infectant le bétail, ce qui constitue à la fois un problème économique et vétérinaire pour les pays tropicaux exportateurs de viande.

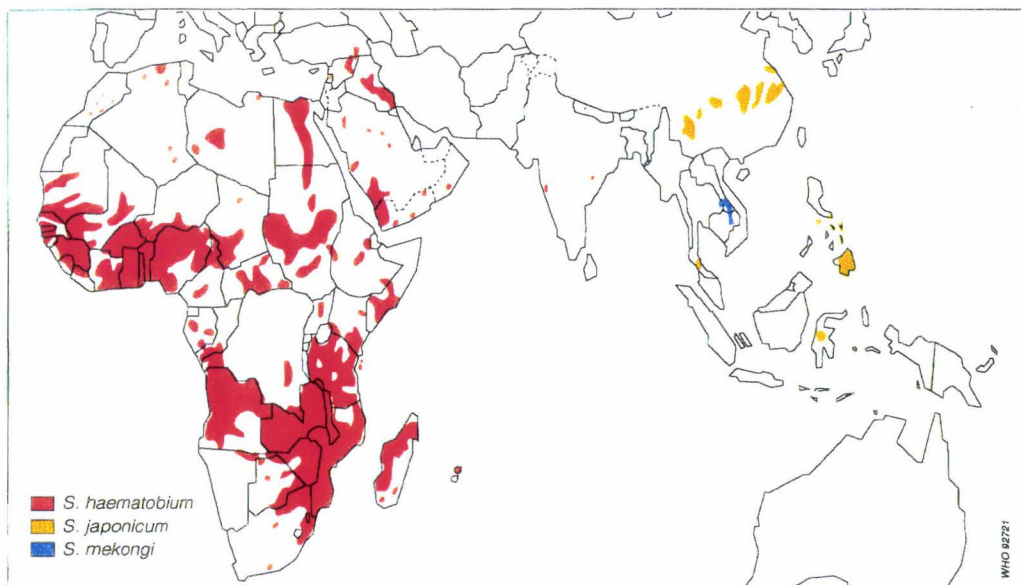
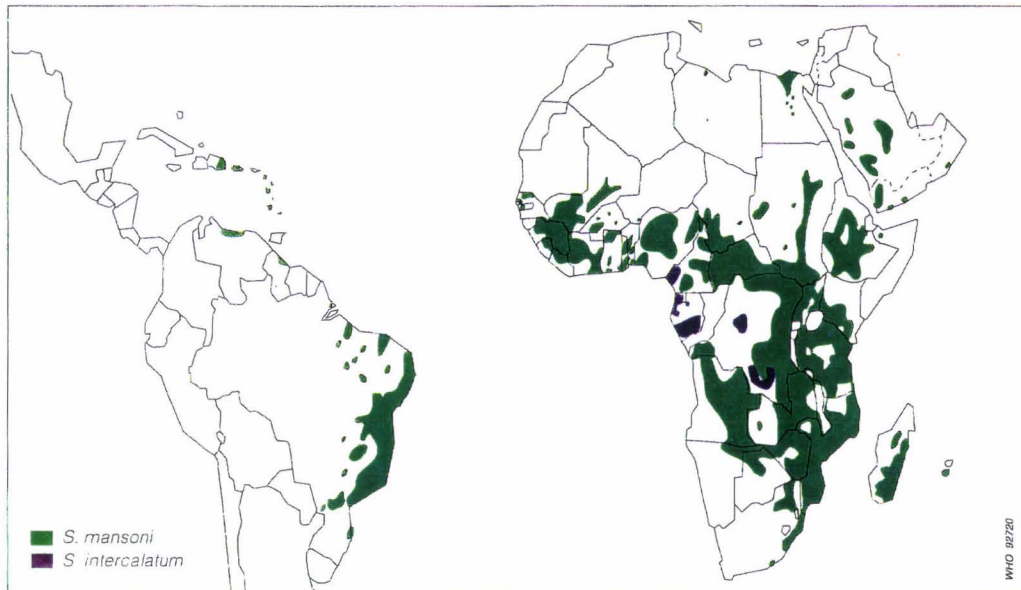
## II. Répartition géographique des schistosomiasis humaines

*S. haematobium* est endémique dans 54 pays. Il sévit presque exclusivement sur le continent africain et atteint environ 100 millions d'habitants. Principalement installé le long de la vallée du Nil et en Afrique intertropicale, il contamine cependant le Moyen-Orient (Yemen, Iran, Irak, Arabie Saoudite, Syrie), et quelques foyers subsistent encore au Maghreb, à Madagascar et à l'île Maurice. Récemment, de nouveaux foyers ont été décelés en Inde (Figure 2).

*S. mansoni*, endémique dans 52 pays et territoires, affecte plus de 60 millions d'individus. En Amérique du Sud, il est particulièrement présent au Brésil, mais on le retrouve aussi au Venezuela, à Porto Rico (vraisemblablement depuis l'importation d'esclaves africains) aux Caraïbes et dans les quelques foyers subsistant aux Antilles. Sur le continent africain, il s'étend dans la plupart des pays d'Afrique intertropicale, mais aussi dans le delta du Nil, au Yémen, et en Arabie Saoudite. Par contre, les pays du Maghreb et certains pays sahéliens ne sont que peu ou pas touchés par cette espèce.

*S. haematobium* et *S. mansoni* s'observent simultanément dans 41 pays d'Afrique et de la Méditerranée orientale, aussi dans ces pays, une même personne peut être contaminée par ces deux schistosomes.

Répartition géographique des différentes bilharzioses  
d'après l'Organisation Mondiale de la Santé



(OMS, Série de rapports techniques n° 830, Genève, 1993)

Figure 2

*S. intercalatum* est principalement retrouvé dans une dizaine de pays d'Afrique tels que le Cameroun, le Gabon, le Zaïre, et la Guinée Equatoriale, où il sévit conjointement à *S. haematobium* et/ou à *S. mansoni*. Cette espèce semble cependant en extension puisque des cas ont été récemment signalés au Congo au Mali, au Nigéria, au Tchad et en République Centrafricaine.

Contrairement aux autres espèces, l'aire de répartition de *S. japonicum* est assez restreinte. Une dizaine de pays d'Extrême-Orient est touchée par cette espèce; notamment la Chine, l'Indonésie et les Philippines, tandis que quelques foyers localisés au Japon, en Malaisie ou en Thaïlande sont signalés.

L'espèce cousine de *S. japonicum*, *S. mekongi* n'aurait été identifiée que dans le delta du Mékong (Chine), au Laos et au Cambodge.

A l'intérieur d'un pays donné, la schistosomiase peut avoir une distribution fort inégale (Doumenge et coll., 1987), mais dans certains pays, comme en Egypte par exemple, où la production vivrière provient presque entièrement des terres irriguées avec l'eau du Nil, la quasi-totalité de la population est exposée. D'autre part, la distribution des schistosomes est différente pour chaque espèce et évolue sans cesse. L'extension du tourisme a en effet permis aux schistosomiasés de s'étendre au delà des frontières des pays d'endémie. Cependant l'absence de mollusques vecteurs et/ou de conditions climatiques adaptées empêchent toute épidémie dans les pays tempérés (Amérique du Nord). Par contre, la mise en place de programmes d'irrigation et d'aménagement des cours d'eau dans certains pays tropicaux a entraîné des migrations de populations et une apparition de nouveaux foyers. C'est ainsi qu'une épidémie gravissime de bilharziose à *S. mansoni* se développe actuellement dans la région de Saint-Louis, au Sénégal, alors que cette zone n'avait jamais été touchée par la schistosomiase (Capron, 1992-b).

### III. Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni*

Les schistosomes sont des vers plats non segmentés, connus sous le nom de douves. Ils appartiennent à l'embranchement des Plathelminthes et à la classe des Trématodes qui comporte entre 5000 et 10000 espèces différentes (Figure 3). Ils ont un cycle biologique complexe, comptant plusieurs phases larvaires libres et parasites. Leur rattachement à la sous-classe des Digènes indique qu'ils ont un cycle évolutif indirect, impliquant le passage des stades larvaires dans un hôte intermédiaire, puis leur existence sous forme adulte dans un hôte définitif.

La famille *Schistosomatidae*, quoique très diversifiée, utilise toujours pour hôte intermédiaire un mollusque aquatique, et pour hôte définitif, un vertébré. *Schistosoma mansoni*, une des dix-neuf espèces du genre *Schistosoma*, est un schistosome qui infeste l'homme (hôte définitif) et qui utilise spécifiquement le gastéropode pulmoné *Biomphalaria glabrata* comme hôte intermédiaire (Figure 4).

Le miracidium est une larve ciliée qui nage rapidement (2 mm/sec.) dans l'eau jusqu'à ce qu'elle rencontre son hôte mollusque d'eau douce (*B. glabrata*), dans lequel elle pourra poursuivre son développement. Il nage sans répit, afin de trouver un hôte dans les heures qui suivent sa naissance. En effet, le miracidium, guidé par divers stimuli d'ordre chimique ou sensoriel ne survivra pas dans l'eau au delà de 8 à 12 heures (Chernin et Dunavan, 1962/Prah et James, 1977). D'après Chernin (1970), les mollusques sont capables d'émettre un mélange complexe de substances hydrosolubles appelé "miraxone". Celui-ci, constitué notamment d'acides aminés, acides gras, ammoniacque et amines (sérotonine et dopamine) est sécrété par le pied du mollusque et exerce un effet attractif sur le miracidium (revue Jourdan et Théron, 1987). La pénétration du tégument au niveau du pied ou des tentacules du mollusque déclenche -outre un gonflement- la métamorphose du miracidium en sporocyste, dont la première manifestation est la perte des cellules épidermiques (ou plaques) ciliées.



Représentation des Schistosomes parmi les Plathelminthes

Phylum	Classe	Sous-classe	Famille	Sous-famille	Genres	Nombre d'espèces	Exemples
<u>Plathelminthes</u>	<u>Turbellaria</u>						
	<u>Trematoda</u>	<u>Monogenea</u>					
			<u>Digenea</u>	<u>Fasciolidae</u>			
				<u>Dicrocoeliidae</u>			
				<u>Opisthorchiidae</u>			
				<u>Echinostomatidae</u>		<u>Echinostoma</u>	<i>E. liei</i> <i>E. parensei</i> <i>E. lindoense</i>
				<u>Heterophyidae</u>			
				<u>Troglorematidae</u>			
				<u>Schistosomatidae</u>	<u>Schistosomatinae</u>	<u>Schistosomatium</u>	1
			(= <u>Schistosomidae</u> )	(= <u>Schistosominae</u> )	<u>Bivitellobilharzia</u>		2
					<u>Heterobilharzia</u>		1
					<u>Austroilharzia</u>		6
					<u>Orientobilharzia</u>		4
					<u>Macroilharzia</u>		2
					<u>Ornithobilharzia</u>		4
					<u>Schistosoma</u>		19
							<i>S. haematobium</i> <i>S. intercalatum</i> <u><i>S. mansoni</i></u> <i>S. bovis</i> <i>S. japonicum</i> <i>S. mekongi</i>
				<u>Bilharziellinae</u>	<u>Trichobilharzia</u>		28
					<u>Bilharziella</u>		2
				<u>Gigantobilharziinae</u>	<u>Gigantobilharzia</u>		12
					<u>Dendrotilharzia</u>		4
			<u>Gryphobilharziinae</u>	<u>Gryphobilharzia</u>		1	
			<u>Brachylemidae</u>				
	<u>Cestoda</u>						
	<u>Gnathostomula</u>						

(Source principale : Rollinson et Southgate, 1987)

Figure 3

Cycle biologique de *Schistosoma mansoni*

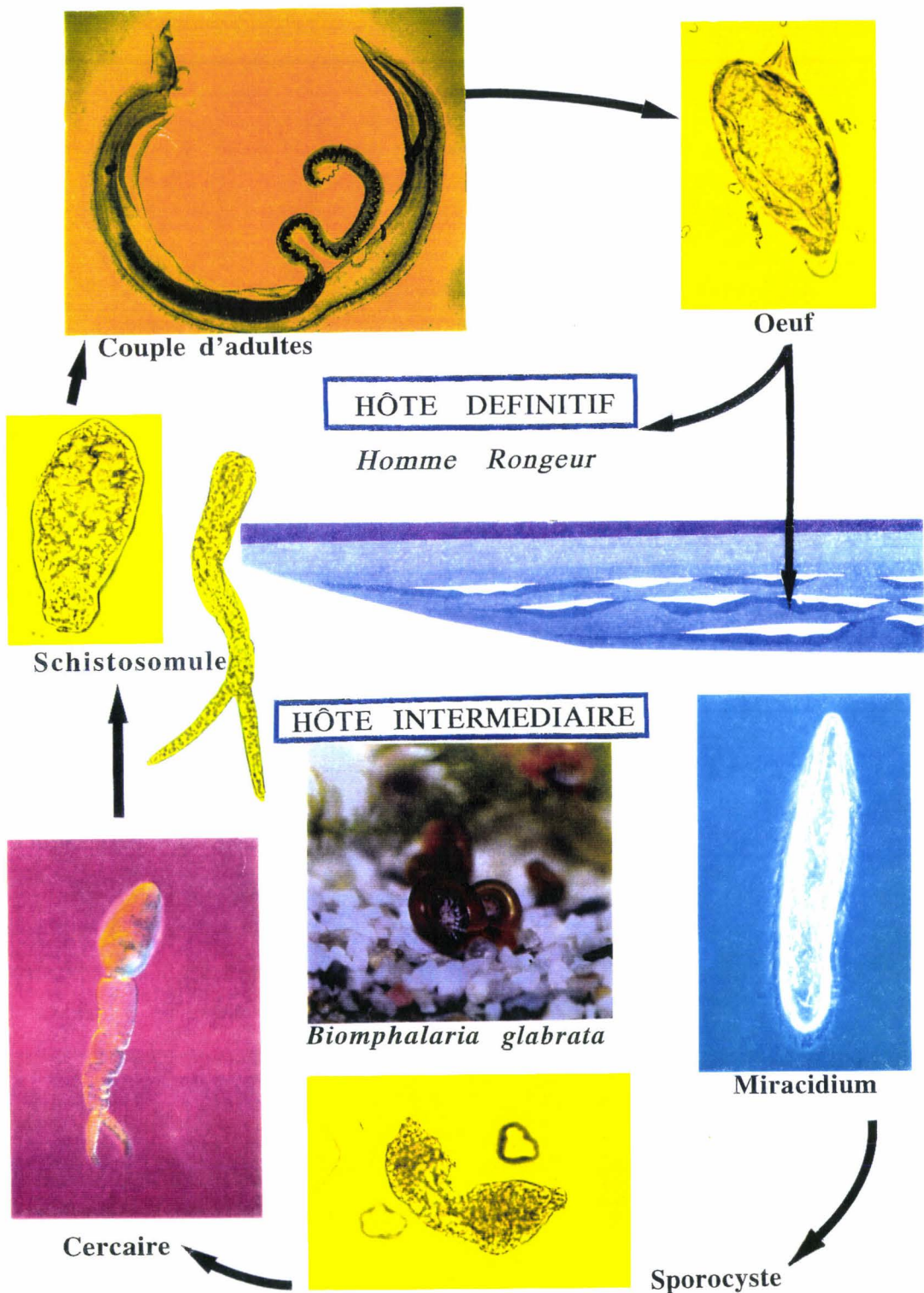
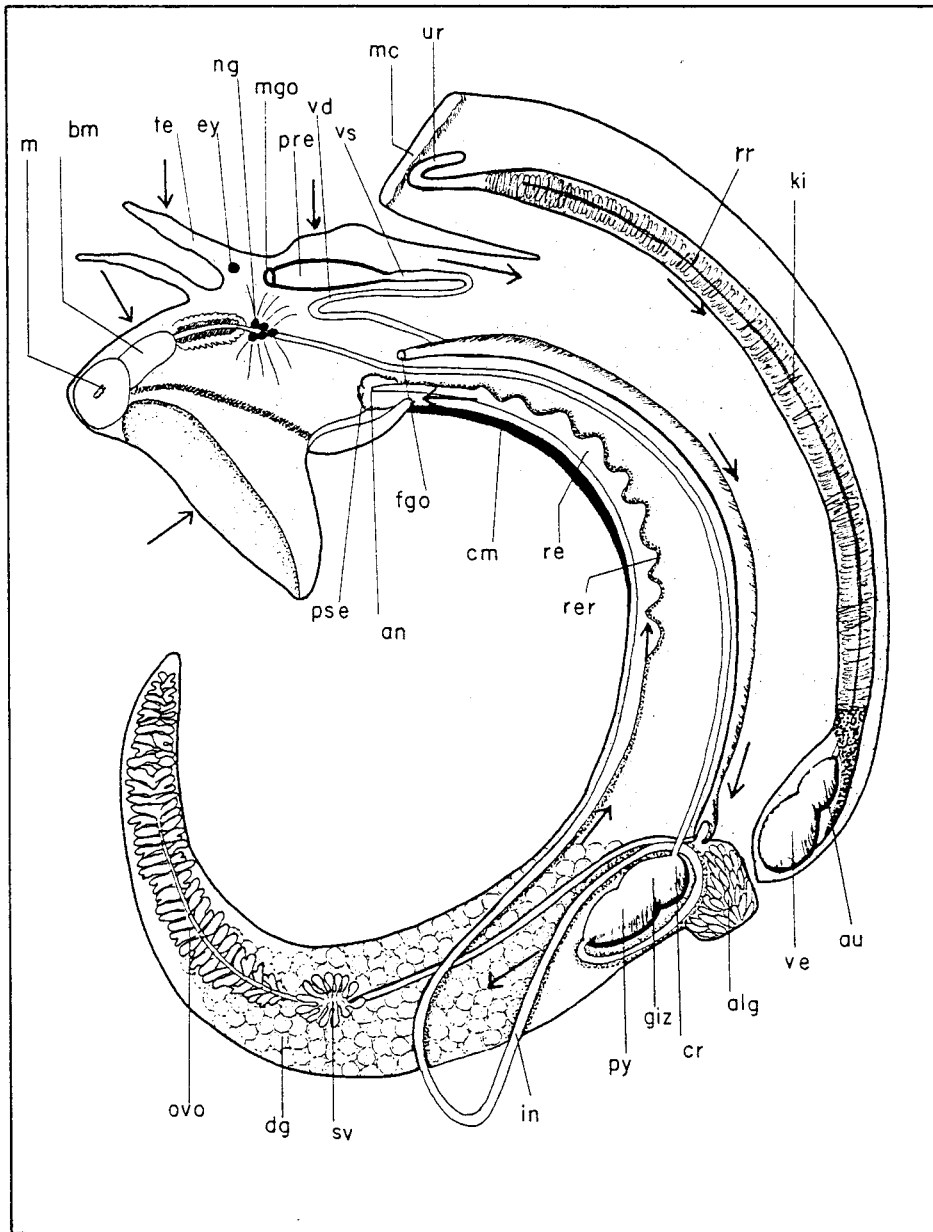


Figure 4

Dans l'hôte intermédiaire où le cycle est asexué, le miracidium donnera naissance par bourgeonnements à une première génération de sporocystes. Ceux-ci envahissent les divers viscères du mollusque (en particulier l'hépatopancréas -ou glande digestive-, les gonades...) et deviennent en quelques semaines des cercaires qui vivent dans les sinus veineux avant d'être libérées dans le milieu extérieur. La Figure 5, représentant un mollusque *Biomphalaria glabrata* disséqué, permet de voir l'organisation interne des Gastropodes Pulmonés (Ordre des Basommatophores c'est-à-dire dont l'oeil est situé à la base des tentacules, Famille des Planorbis), mais également les sites de pénétration des miracidies, les voies de migration des sporocystes et le point d'émergence des cercaires mûres. La multiplication intense du parasite chez *B. glabrata* aboutit à partir d'un seul miracidium, à la formation de milliers de cercaires, environ trois semaines après le jour de l'infestation. Favorables à la chaleur et à la lumière vive, elles émergent du mollusque aux heures chaudes de la journée, en général entre 10 et 16 heures en pays tropical (Pitchford et coll., 1969/Nojima et Sato, 1982).

La cercaire est donc l'autre stade libre de *S. mansoni*. Elle est constituée d'une tête et d'une queue qui la propulse. Dans la tête se trouvent des glandes riches en enzymes protéolytiques qui favorisent non seulement l'expulsion du mollusque, mais également la pénétration transcutanée chez l'hôte définitif. Extrêmement mobiles grâce à leur appendice caudal fourchu, les (furco)cercaires vont rechercher leur hôte définitif, sous l'influence de signaux encore mal connus. Généralement elles viennent à la surface de l'eau et y flottent, suspendues par la queue. La durée de vie cercarienne est limitée (24 heures maximum), car le glycogène, principale réserve d'énergie contenue dans la queue et le corps, diminue de façon exponentielle après la libération de la cercaire dans l'eau (Lawson et Wilson, 1980). L'homme s'infeste en séjournant dans une eau où nagent des mollusques infestés par *S. mansoni*. En général, moins de 5% des mollusques sont contaminés et la concentration des cercaires est de l'ordre de 1/litre dans les foyers d'endémie (Capron, 1993-a).

Représentation schématique d'un mollusque *Biomphalaria glabrata* disséqué  
(Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora, Planorbidae)



(Source : Malek, 1980)

alg: glande de l'albumen an: anus au/ve: coeur bm: masse buccale cm: muscle columelle  
cr/giz/py: estomac dg: glande digestive ey: oeil fgo: orifice génital femelle in: intestin ki:  
reins m: bouche mc: manteau mgo: orifice génital mâle ng: ganglions nerveux ovo: gonades  
pre: prépuce pse: pseudobranchies re: rectum rer: crête rectale rr: anneaux rénaux sv:  
glandes séminales te: tentacules ur: urètre vd: canal déférent vs: réceptacle séminal

Les flèches représentées sur le schéma indiquent les sites de pénétration des miracidies de *S.mansoni* (et d'autres espèces de trématodes), les voies de migration des sporocystes filles vers la glande digestive et les gonades, les voies de migration des cercaires en sens opposé et leur émergence dans l'environnement extérieur par passage à travers une fine couche épithéliale située à proximité du manteau.

Figure 5

Ainsi, la coexistence dans l'espace et dans le temps de la larve et de l'hôte définitif (principalement l'homme) représente le facteur déterminant de la transmission de la maladie. Les principaux sujets à risque sont les femmes qui lavent le linge au bord de la rivière et les enfants qui y jouent ou se baignent quotidiennement. Les cercaires se fixent sur l'épiderme ou les muqueuses buccale ou oesophagienne grâce à leur ventouse antérieure munie d'épines. La pénétration cutanée a été décrite par Haas et Schmidt (1982-a/b). Elle fait intervenir non seulement des phénomènes mécaniques mais aussi des phénomènes chimiques. La production d'enzymes kératolytiques par les glandes acétabulaires situées dans la tête de la cercaire, permet à la larve de traverser activement les couches supérieures de la peau (Landsperger et coll., 1982). La pénétration, qui se fait totalement en une dizaine de minutes, entraîne d'une part des modifications morphologiques (perte de l'appendice caudal) et d'autre part des modifications structurales et biochimiques aboutissant à la transformation de la cercaire en schistosomule. A ce niveau, le parasite fait preuve d'une capacité d'adaptation particulièrement rapide et efficace puisque d'organisme adapté à la vie en eau douce, il devient capable de survivre dans un milieu où l'osmolarité est augmentée (110 mOsM en eau douce, 160 mOsM dans le mollusque, et 340 mOsM dans l'hôte vertébré). Les travaux de Miller et coll. (1986) ont permis de montrer le rôle des oligosaccharides de surface dans l'adaptation de microorganismes (bactéries) à des variations de pressions osmotiques. Chez *S. mansoni*, des expériences réalisées dans notre laboratoire (Dissous et coll., 1986-b/Grzych et coll., 1987) ont abouti à l'identification d'une structure glycanique commune au parasite, à son hôte intermédiaire *B. glabrata* et à un mollusque marin primitif *Megathura crenulata*. Selon Capron et Dessaint (1986), "les raisons de cette co-expression restent pour l'instant mystérieuses mais reposent peut-être sur le rôle particulièrement important que pourraient jouer les oligosaccharides membranaires dans la régulation de la pression osmotique des invertébrés".

Le schistosomule néoformé pénètre ensuite dans un petit vaisseau lymphatique ou une veinule et atteint en quatre jours les poumons par transport lymphatique ou veineux. Puis il entreprend une phase migratoire qui dure dix à vingt jours et qui lui permet d'atteindre par voie circulatoire, les veinules portes intrahépatiques. Seuls les schistosomules qui gagnent les veines portes intrahépatiques poursuivront leur différenciation jusqu'à maturation sexuelle, en trois semaines environ; ceux qui se perdent dans d'autres organes resteront immatures. La maturation des parasites implique un profond remaniement morphologique, physiologique, immunologique et structural, notamment au niveau du tégument avec perte du manteau et acquisition d'un complexe membranaire heptalaminé (Stirewalt, 1974, Torpier et coll., 1977).

Les vers adultes devenus mâles ou femelles vivent en accouplement continu pendant de longues périodes pouvant aller de 2 à 20 ans, parfois même 30 ans (Vermund et coll., 1983). Le mâle transporte la femelle à l'intérieur de son canal gynécophore et les vers ainsi appariés se déplacent à contre-courant grâce à leurs ventouses jusqu'aux lieux de ponte. Dans le cas de *S. mansoni*, le couple de vers adultes rejoint la veine porte, la veine mésentérique inférieure puis la veine hémorroïdale supérieure et le plexus hémorroïdal. Arrivé dans les capillaires pariétaux de l'intestin, le couple arrête sa migration et la ponte peut être initiée.

La destinée des 300 oeufs pondus quotidiennement par les femelles est double. Certains seront éliminés dans la lumière de l'intestin et excrétés dans le milieu extérieur par les fèces, d'autres seront entraînés par le courant sanguin jusqu'aux organes susceptibles de bloquer leur migration. Les oeufs non excrétés induisent la formation de granulomes au niveau intestinal, et sont à l'origine de la plupart des lésions bilharziennes. Les oeufs de schistosomes excrétés dans le milieu extérieur assurent la continuité du cycle. En effet, lorsqu'ils atteignent l'eau, ils peuvent éclore et libérer un miracidium. Les conditions d'éclosion sont une température adéquate (entre 25 et 30°C), une forte luminosité et une pression osmotique de l'ordre de celle de l'eau douce (environ 110 mOsm).

L'hypotonicité semble être le facteur principal de l'induction de cette éclosion. Celle-ci répond à des lois purement physiques. En effet, l'eau pénètre dans les vacuoles par osmose, créant un phénomène de turgescence qui va faire éclater l'enveloppe. Ainsi, l'éclosion peut avoir lieu même quand le miracidium est déjà mort.

#### IV. Transmission

##### IV.1. Adaptation des schistosomes aux habitudes comportementales des hôtes définitifs

Les bilharzioses sont avant tout des maladies à transmission focale. L'existence d'un hôte intermédiaire aquatique impose, en effet, la présence de l'hôte définitif vertébré autour des points d'eau pour que le cycle puisse se poursuivre. Cette coexistence dans l'espace et dans le temps a nécessité au cours de l'évolution une extraordinaire adaptation des schistosomes à leur hôte définitif.

Un très bel exemple en est fourni par la chronobiologie d'émission cercarienne qui se déroule en des périodes bien précises de la journée, adaptées aux habitudes comportementales de l'hôte définitif. En effet, les espèces infestant le bétail présentent un pic d'émission précoce vers 8-9 heures du matin, à l'heure où les ruminants vont s'abreuver, alors que les espèces infestant l'homme émettent préférentiellement en fin de matinée, entre 11 et 13 heures, lorsque les travailleurs sont au champ (Mouahid et coll., 1990). De plus des études épidémiologiques réalisées au Nigéria montrent que l'émission de cercaires par les mollusques infestés, maximale au mois de juin, coïncide avec une augmentation des contacts aquatiques de la population locale (Ebele, 1990).

## IV.2. Facteurs écologiques impliqués dans la transmission

(a) De nombreux facteurs écologiques liés au mollusque lui-même jouent un rôle important dans la transmission de la maladie.

\* Les préférences climatiques et écologiques du mollusque conditionnent bien souvent la prévalence et l'intensité de l'infection rencontrée chez l'homme. *Biomphalaria glabrata* est sensible aux variations de température. Peu importantes dans les régions tropicales, elles sont plus marquées dans les zones sahéniennes; c'est ainsi que *S. haematobium* prend le pas sur *S. mansoni* dans les pays sahéniens car les gastéropodes pulmonés du genre *Bulinus* (hôtes intermédiaires des *S. haematobium*) sont plus résistants aux périodes de sécheresse que ceux du genre *Biomphalaria*.

\* Certaines conditions de vie des mollusques affectent leur répartition. S'ils supportent de grandes variations de pH, pouvant aller de pH4 à pH9, ils n'apprécient guère les eaux saumâtres ou trop riches en minéraux (magnésium). Ils préfèrent les eaux stagnantes capables de leur offrir comme source de nourriture, une végétation abondante. D'autre part, la pluviométrie joue un rôle essentiel dans la régulation de leurs populations. Ainsi, des précipitations insuffisantes les obligent à rentrer en vie ralentie ou à disparaître, tandis que des pluies excessives les entraînent loin de leur biotope d'origine.

(b) D'autre part, l'infection du mollusque par le *miracidium* est l'une des étapes majeures qui détermine la transmission de la bilharziose.

\* De manière générale, la meilleure température pour le développement des sporocystes est la température maximale supportée par le mollusque. Pour *Biomphalaria*, les températures optimales se situent entre 25 et 28°C. Aussi, entre 25 et 10°C l'infection sera beaucoup moins efficace, et elle ne se produira pas en dessous de 10°C.

\* L'âge des mollusques n'est probablement pas d'une importance capitale, mais il semble que les adultes (10/14 semaines) soient plus souvent infestés que les



jeunes venant d'éclore. D'autre part, leur taille semble conditionner l'intensité de l'infection. En effet, les "gros" mollusques (1 cm minimum) sont plus parasités que ceux de petite taille (Kendall, 1964).

\* La nutrition de l'hôte invertébré doit être également considérée, puisqu'on associe généralement état de malnutrition et prédisposition à l'infection. Réciproquement, lorsqu'une relation s'est établie entre l'hôte et le parasite pendant une longue période, la bonne santé de l'un dépend vraisemblablement de la bonne santé de l'autre (Kendall, 1964).

\* La spécificité trématode/mollusque est très stricte; ainsi une espèce de schistosome est généralement spécifique d'un seul genre de gastéropode. Nous aurons l'occasion de revenir plus en détail sur cette notion de spécificité.

\* Selon le degré de compatibilité entre le parasite et son hôte, la densité miracidiale des eaux peut conditionner la transmission de la maladie. S'il est élevé, un seul miracidium peut suffire à entretenir le cycle, par contre s'il est faible, une concentration suffisante en larves infestantes est nécessaire. Rappelons que dans les zones d'endémie à *S. mansoni*, seulement 5% des mollusques sont contaminés, ce qui signifie que quelques miracidies suffisent à propager l'infection.

#### IV.3. Facteurs humains impliqués dans la transmission

La transmission de la schistosomiase dépend aussi de l'hôte définitif, l'homme en l'occurrence.

\* Le mode de vie, le comportement et la densité des populations humaines autour des sites de transmission déterminent l'importance et la distribution de la population parasitaire dans les communautés humaines. En effet, par manque d'éducation sanitaire, les individus polluent le biotope aquatique par des excréments contaminés, ce qui entretient à la fois la richesse des eaux en miracidies et la probabilité d'infestation cercarienne. De plus, les migrations humaines, volontaires (nomades, saisonniers) ou non (réfugiés) risquent d'accroître l'extension des endémies.

\* L'intensité et la prévalence de l'infestation bilharzienne dépendent aussi de l'âge des individus, les jeunes (5-15 ans) étant plus gravement atteints que les adultes (Arap Siongok et coll., 1976/ OMS, 1993).

\* Enfin, la mise en place de programmes d'irrigation et d'aménagement des cours d'eau dans certains pays tropicaux ont été parfois dramatiques. Selon la commission internationale des grands barrages, le nombre de retenues d'eau de grandes dimensions construites chaque année est passé de 209 à 357 entre 1951 et 1986. Ce développement intéresse en grande partie le continent africain. D'aussi nombreuses constructions font peser une menace accrue sur la santé, du fait de l'extension des maladies à transmission hydriques. Dans ces régions, le risque de maladies est encore augmenté par suite des mouvements migratoires de populations que nous venons d'aborder ci-dessus. Dans la région de St Louis du Sénégal par exemple, la remontée assez profonde des eaux marines entraînant des degrés de salinité peu compatibles avec les cultures, a suscité la construction d'un grand barrage. Des populations et leur bétail se sont alors déplacés, et des mollusques vecteurs transportés sous les sabots des animaux ont été introduits dans cette région du fleuve qui ne comportait alors aucun foyer actif de bilharziose. Depuis 1989, on assiste à l'émergence d'une spectaculaire épidémie de bilharziose hépato-intestinale touchant une population non immune et ayant pour conséquence une haute incidence morbide (Capron, 1992-b).

Ailleurs, comme au Mali par exemple, la prévalence des schistosomiasés urinaires ou intestinales s'est révélée cinq fois plus élevée dans les villages équipés d'un petit barrage que dans les villages de la zone de savane (OMS, 1993).

Tous ces facteurs favorisent d'une manière ou d'une autre le maintien du cycle. Actuellement, diverses mesures prophylactiques sont envisagées afin d'interrompre le cycle.

## V. Prophylaxie

Comme nous pouvons le voir dans la Figure 6, il apparaît théoriquement possible de contrôler les bilharzioses en interrompant le cycle en l'un de ses points (revue Butterworth, 1988/OMS, 1993).

Les moyens de lutte peuvent être rassemblés en 3 groupes;

Proxylaxie médicale,

Prophylaxie sanitaire

Lutte antivectorielle

### V.1. La prophylaxie médicale

Elle comprend à la fois la chimiothérapie et la stratégie vaccinale.

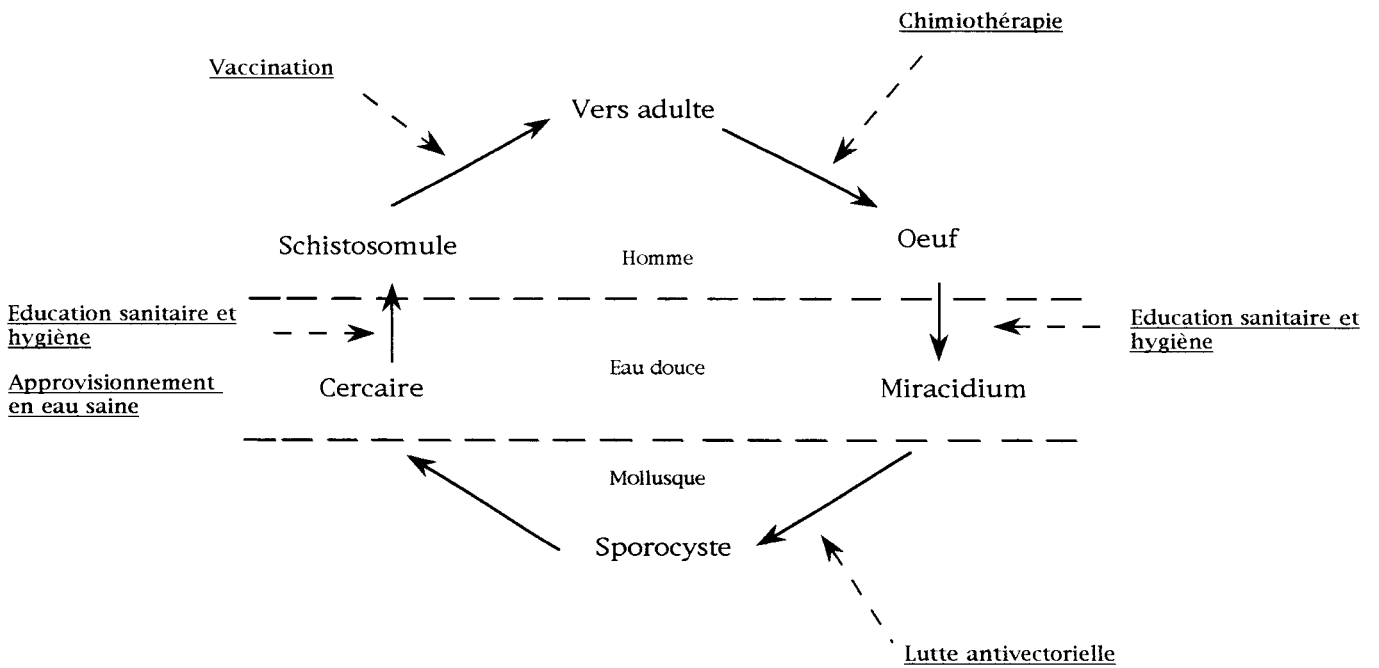
#### V.1.1. La chimiothérapie

Elle a pour but de diminuer le nombre d'oeufs viables éliminés par les malades et de prévenir la maladie chez les sujets déjà infestés mais pas encore cliniquement atteints. En général elle s'intéresse à tout individu reconnu infesté après examen coprologique, mais souvent pour des raisons économiques, on ne traite que les enfants âgés de 7 à 14 ans, c'est à dire les plus contaminés dans les zones à forte endémicité.

Cette méthode a été testée il y a 20 ans, dans une île des Caraïbes appelée l'île de Ste Lucie. Jugée très efficace et peu onéreuse par rapport à l'éducation sanitaire ou à l'utilisation de molluscicides, elle est rapidement devenue la stratégie favorite de lutte contre les schistosomiasés.

De nombreuses molécules à activité schistosomicide, c'est à dire entraînant la mort des vers adultes et une réduction qualitative et quantitative des oeufs pondus, sont alors apparues. Citons par exemple, l'oxamniquine (Vansil<sup>R</sup>, Mansil<sup>R</sup>), le métrifonate (Bilarcil<sup>R</sup>) et l'oltipraz (35972 R.P).

Représentation schématique du cycle de *Schistosoma mansoni*  
et points d'intervention et de contrôle possibles



D'après Butterworth, Control of Schistosomiasis in Man, (*The Biology of Parasitism*), 1988

Figure 6

Cependant, à cause de la lourdeur des protocoles thérapeutiques et de la présence d'effets secondaires indésirables, ces substances ont été progressivement remplacées par le praziquantel (Biltricide<sup>R</sup>), molécule mise au point dans les années 70. Ce médicament, sans parenté structurale avec les autres antihelminthiques, a l'avantage d'être efficace contre toutes les espèces de schistosomes. C'est dire son intérêt en présence d'une infestation mixte ou d'un cas réfractaire aux autres médicaments. Néanmoins, si l'emploi du praziquantel induit dans certains cas une nette diminution de la prévalence et de l'incidence de la maladie, nous n'avons pas encore assez de recul pour juger de l'efficacité à long terme de cette "nouvelle" molécule. De plus, bien qu'elle fasse partie de la nouvelle génération de médicaments disponibles, elle est extrêmement coûteuse. D'autre part, comme ce fut le cas pour l'oxamniquine, il est probable que des souches résistantes aux nouvelles drogues apparaissent à plus ou moins long terme. Cette éventualité a permis de prendre conscience que les autres stratégies de lutte contre la maladie pouvaient jouer un rôle très important. C'est ainsi que la possibilité de développer un vaccin contre les schistosomes a été envisagée dans les années 70.

### V.1.2. La stratégie vaccinale

Dans notre laboratoire, une stratégie vaccinale anti-bilharzienne a été mise en place il y a 20 ans. De nombreuses recherches ont permis l'identification et la caractérisation moléculaire d'antigènes potentiellement protecteurs contre la bilharziose. Parmi ces molécules, la glutathion S-transférase de *S. mansoni* appelée Sm28GST apparaît comme un candidat vaccinal très prometteur (Capron, 1993-b). Grâce aux énormes progrès scientifiques et techniques réalisés ces 15 dernières années, il est probable qu'un vaccin anti-bilharzique soit mis au point pour le XXI<sup>e</sup> siècle.

Complémentaires de la chimiothérapie, les futurs vaccins n'ont pas la prétention de faire disparaître la maladie, mais de la limiter. D'autre part, la stratégie vaccinale a l'avantage sur la chimiothérapie d'être préventive plutôt que

curative. Pourtant, une action fondée uniquement sur la vaccination n'aurait que des conséquences modestes si son application n'était pas intégrée à une stratégie globale de santé publique et d'assainissement (Capron, 1993-a).

## V.2. La prophylaxie sanitaire

Ayant pour but d'interrompre le cycle parasitaire, elle a été pendant longtemps la seule méthode pratique de lutte contre les schistosomiasés.

La prophylaxie sanitaire consiste à la fois à réduire la contamination du biotope aquatique par les excréments humains et également à limiter sinon éviter les contacts des populations avec les points d'eau infestés. Ce programme d'éducation sanitaire des populations, bien qu'indispensable, doit cependant s'intégrer dans un projet beaucoup plus vaste de développement économique des pays du tiers monde, pour aboutir à un réel succès.

D'un autre côté, toutes les démarches d'assainissement qui permettront de contrôler l'évacuation des excréments et de mettre en place des équipements collectifs (latrines, lavoirs), auront un impact sur les potentialités de transmission de la bilharziose.

Une stratégie globale, incluant à la politique d'assainissement, d'une part une stratégie de dépistage et de traitement des populations infectées et d'autre part une éducation sanitaire des populations à risque, a déjà prouvé son efficacité à Porto Rico et en Arabie saoudite. Pourtant, en raison des coûts de cette stratégie et des moyens considérables devant être mis en oeuvre lorsque des millions de personnes sont concernées, elle n'a pu s'étendre à tous les pays concernés par la schistosomiase (Capron, 1993-a).

Une autre façon d'interrompre le cycle parasitaire est d'agir soit au niveau des formes libres infestantes, soit au niveau de l'hôte intermédiaire. Ainsi la lutte vis-à-vis des mollusques vecteurs a été particulièrement étudiée.

### V.3. La lutte antivectorielle

#### V.3.1. Procédés chimiques: les molluscicides

L'emploi de molluscicides a été l'une des premières méthodes employées pour lutter contre les mollusques vecteurs. Dès le début du siècle, de nombreux composés chimiques ont été utilisés tels que le sulfate de cuivre ou d'ammonium, l'oxyde de calcium ou encore l'arsenate ou le phosphate de calcium. Après la seconde guerre mondiale, plusieurs molécules se sont avérées efficaces: le pentachlorophénol (PCP), le pentachlorophénate de sodium (NaPCP), le dinex (dinitro-o-cyclohexylbutanol) (Webbe, 1987) ou encore le B-2 (2,5-dichloro-4-bromophénol sodique) (OMS, 1993). Plus récemment, deux autres substances, le niclosamide (bayluscide ou mollutox) et le frescon (N-tritylmorpholine) ont également été testées (Combes et coll., 1992/ OMS, 1993).

Utilisés à grande échelle dans différents pays comme l'Égypte (Abdel-Wahab, 1982) ou le Venezuela, mais aussi parfois de façon plus restreinte comme à l'île Ste Lucie (Prentice et coll., 1981), les molluscicides ont permis de réduire progressivement le nombre de mollusques et de diminuer la prévalence de l'infection. Il s'agit cependant d'un procédé peu spécifique, qui doit être renouvelé fréquemment pour empêcher une éventuelle recolonisation des sites par les mollusques. Cette stratégie, par son coût extrêmement élevé et par les risques écologiques qu'elle suscite, est en réalité difficilement envisageable même pour une application très focalisée. Actuellement des études se poursuivent pour que l'emploi de ces produits puisse se faire à grande échelle et sans entraîner aucun risque écologique (Capron, 1993-a).

De nombreux travaux de recherche ont été également consacrés aux molluscicides végétaux (revues Malek, 1980/ Abdel-Wahab, 1982). Dans les années 80, *Balanites aegyptica*, *Sapindus saponaria* et *Swartzia madagascarensis* faisaient partie des espèces les plus prometteuses. Le fruit de ces plantes contient des saponines (glucosides) qui peuvent former une suspension colloïdale et engendrer de la mousse à la surface de l'eau. D'autre part, les racines de *Derris elliptica* sont

molluscicides, de même que les feuilles, les fleurs, les bourgeons et la tige de *Tephrosia vogelii*. Le composant actif de ces deux plantes est la roténone. L'espèce *Ambrosia maritima* (appelée Damsis) découverte en moyenne Egypte dans les années 50, possède des feuilles et des fleurs aux propriétés molluscicides, mais l'extraction et l'isolement des constituants actifs se sont révélés trop coûteux. D'autres plantes ont été découvertes sur différentes parties du globe, telles *Jatropha* spp (Soudan), *Phytolacca dodecandra* (appelée "Endod", Ethiopie), *Schima argenta* (Brésil) ou encore *Sapindacia*, *Thea opeosa*, *Croton tiglium*... Cependant, aucun produit de ce type n'a été utilisé à grande échelle dans un pays d'endémie, et il semble, d'après le dernier rapport du comité d'experts de l'OMS (1993), qu'on n'a guère essayé systématiquement d'approvisionner les laboratoires en composés méritant une étude (par exemple des extraits de *Phytolacca dodecandra*, d'*Ambrosia maritima* et de *Swartzia madagascarensis*).

Cependant, conscientes des limites de ces différentes méthodes et de la probable émergence de souches de mollusques résistants aux molluscicides chimiques, certaines équipes ont tenté de développer de nouveaux moyens de lutte contre ces mollusques vecteurs.

### V.3.2. Procédés physiques: les grands travaux

Localement, certaines actions ont été entreprises pour modifier le biotope naturel des mollusques (vase). Ainsi, la construction de canaux d'irrigation cimentés, l'assèchement de marécages et l'élimination de la végétation des plans d'eau ont entraîné une diminution de leur nombre. En Chine par exemple, où sévit *S. japonicum*, d'énormes travaux de drainage réalisés périodiquement ont permis -par destruction des mollusques- de réduire les foyers de bilharziose dans plusieurs régions (Butterworth, 1988).



### V.3.3. Procédés biologiques: les prédateurs et les compétiteurs

Outre les moyens chimiques ou physiques, des méthodes biologiques ont été également envisagées. Il existe par exemple de nombreux prédateurs de mollusques aquatiques ou terrestres. Les insectes, les crustacés, les poissons ou encore les oiseaux jouent en effet un rôle important dans la régulation des populations de mollusques. Ils ont parfois permis de lutter efficacement contre les bulins ou les lymnées; cependant, leur utilisation dans certains foyers a été catastrophique, provoquant une élimination de nombreuses espèces sans avoir aucun effet sur celle désirée (Combes et coll., 1992).

D'autre part, des compétiteurs biologiques tels que des mollusques non vecteurs ont été expérimentalement introduits dans certains foyers. A Porto Rico par exemple, la lutte biologique contre *Biomphalaria glabrata* s'est avérée efficace grâce à l'introduction d'un mollusque concurrent: *Marisa cornuarietis* (Ruiz-Tiben et coll., 1969). Dans l'île Ste Lucie, en Martinique et en Guadeloupe, l'introduction de *Melanoides tuberculata* a non seulement réduit le nombre de mollusques vecteurs mais aussi stoppé la transmission de la maladie (Prentice, 1983/ Pointier et Guyard, 1992). En Guadeloupe, *Ampullaria glauca* et *Marisa cornuarietis* sont responsables de l'éradication d'un foyer de schistosomiase (Pointier et coll., 1991). Néanmoins ces essais encourageants ne constituent que des succès locaux, car ces mollusques, inefficaces dans certains écosystèmes, n'ont pas pu être introduits dans tous les foyers où sévit *Biomphalaria glabrata*. Les gastéropodes *Thiara granifera* et *Helisoma duryi* sont également très étudiés. L'effet de ce dernier a notamment été démontré sur *Biomphalaria pfeifferi* en Tanzanie (Rasmussen, 1974).

L'utilisation de parasites, notamment de trématodes capables d'avoir un effet stérilisant sur les mollusques vecteurs a déjà été envisagée. Si l'exemple du trématode aviaire *Ribeiroia marini* sur une population naturelle de *B. glabrata* en Guadeloupe, constitue d'ores et déjà un résultat encourageant, la recherche d'autres parasites (échinostomes en particulier) pouvant agir de façon similaire est en cours (Nassi et coll., 1979).

Dans son rapport d'experts (1993), l'OMS considère cependant que l'introduction de nouvelles espèces de gastéropodes ou le recours à toute autre méthode de lutte biologique ne sont recommandés dans aucune région.

#### V.3.4. Bilan et perspectives de la lutte antivectorielle

Après avoir fait état de toutes les stratégies chimiques, physiques ou biologiques pour contrôler les populations de mollusques, force est de constater qu'aucune ne paraît à elle seule satisfaisante. Actuellement, de nombreuses équipes sont convaincues que les espoirs les plus prometteurs de rupture du cycle parasitaire au niveau du mollusque se situent dans les recherches sur la manipulation génétique de la résistance des mollusques vecteurs.

Dans le cadre d'une collaboration Franco-Américaine, plusieurs équipes dont la nôtre envisagent à plus ou moins long terme de développer des mollusques transgéniques. En effet, l'introduction dans les foyers endémiques de mollusques recombinants, c'est-à-dire capables d'exprimer et de perpétuer les gènes de résistance permettra certainement d'interrompre la transmission de la bilharziose. Cependant, le développement de recherches sur les stratégies de transgénose imposent une connaissance non seulement des mécanismes de résistance mais aussi des gènes impliqués. Il est donc tout d'abord essentiel de mieux connaître le système de défense des mollusques ainsi que les mécanismes immunitaires intervenant dans la relation mollusque-trématode.

III

LES MODÈLES MOLLUSQUES-TRÉMATODES

## I. Généralités

Les Gastéropodes, représentent 75% des 110 000 espèces décrites dans le phylum des mollusques, et bien que leur répartition s'étende des fonds océaniques aux habitats terrestres humides en passant par les étangs & les rivières, les espèces parasitées ne sont qu'aquatiques (eau douce) ou éventuellement amphibies.

L'infection de mollusques par des trématodes a été étudiée de manière approfondie par de multiples équipes, mais les modèles utilisés sont assez restreints et concernent essentiellement 2 familles de Trématodes (*Schistosomatidae* & *Echinostomatidae*) et 2 familles de Gastéropodes pulmonés (*Planorbidae* & *Lymnaeidae*) (Figure 7).

Les modèles les plus étudiés sont d'une part le couple *Lymnaea stagnalis*-*Trichobilharzia ocellata* et d'autre part l'interaction de *Biomphalaria glabrata* avec *Schistosoma mansoni* et/ou *Echinostoma paraensei*. Par les travaux des différentes équipes s'intéressant à ces associations mollusque-trématode mais également par des études purement malacologiques, d'énormes progrès ont pu être réalisés dans la connaissance du système de défense interne des mollusques.

## II. Le système de défense interne des mollusques

S'il est incontestable à l'heure actuelle que les mollusques se protègent de l'invasion d'organismes étrangers par un système de défense interne, celui-ci n'a été presque exclusivement étudié que chez les bivalves et les gastéropodes. (Sminia et Van der Knaap, 1987-b)

Le système immunitaire des mollusques comprend d'une part de nombreuses cellules permettant à l'organisme de se défendre vis-à-vis de puissants agents pathogènes exogènes, et d'autre part divers facteurs humoraux présents dans l'hémolymphe.

## Représentation des Gastéropodes parmi les Mollusques

<u>Phylum</u>	<u>Classe</u>	<u>Sous-classe</u>	<u>Famille</u>	<u>Genres</u>	<u>Groupes</u>	<u>Espèces (exemples)</u>
<u>Mollusca</u> (110 000)	<u>Amphineura</u>	<u>Aplacophora</u>		<u>Neomenia</u> <u>Chaetoderma</u>		
		<u>Polyplacophora</u>		<u>Chiton</u> <u>Cryptochiton</u> <u>Tonicella</u>		
	<u>Monoplacophora</u>			<u>Neopilina</u>		
	<u>Gastropoda</u> (80 000)	<u>Prosobranchia</u> (20 000)	<u>Viviparidae</u>	<u>Viviparus</u>		<u>V. ater</u>
		<u>Pomatiopsidae</u> ( <u>Hydrobiidae</u> )	<u>Oncomelania</u> <u>Tricula</u> <u>Robertsia</u>		<u>O. hupensis</u> <u>T. aparta</u> , <u>T. humida</u> <u>R. kaporensis</u>	
		<u>Pilidae</u> ( <u>Ampullaridae</u> )	<u>Marisa</u> <u>Ampullaria</u>		<u>M. cornuarietis</u> <u>A. glauca</u>	
		<u>Thiaridae</u>	<u>Melanoides</u> <u>Thiara</u>		<u>M. tuberculata</u> <u>T. granifera</u>	
	<u>Opisthobranchia</u>			<u>Aplysia</u>		
		<u>Pulmonata</u> (50 000)	<u>*Planorbidae</u>	<u>Helisoma</u>  <u>Planorbarius</u>  <u>Biomphalaria</u>		<u>H. aspersa</u> , <u>H. duryi</u>  <u>P. corneus</u> , <u>P. metidjensis</u>  <u>B. glabrata</u>

					(= <i>Australorbis</i> = <i>Tropicorbis</i> ) <i>B. tenagophila</i> , <i>B. straminea</i> , <i>B. pfeifeiri</i>
			<i>Bulinus</i>	<i>B. truncatus-tropicus</i> <i>B. africanus</i> (= <i>Physopsis</i> ) <i>B. forskalii</i> <i>B. reticulatus</i>	<i>B. truncatus</i> , <i>B. rohlfsi</i> <i>B. africanus</i> , <i>B. globosus</i> <i>B. camerunensis</i> , <i>B. senegalensis</i> <i>B. reticulatus</i>
			<i>Indoplanorbis</i>		<i>I. exustus</i>
		* <i>Lymnaeidae</i>	<i>Lymnaea</i>		<i>L. stagnalis</i> , <i>L. truncatula</i>
			<i>Radix</i>		<i>R. auricularia rubiginosa</i>
		* <i>Physidae</i>	<i>Physa</i> <i>Aplexa</i>		<i>P. fontinalis</i> , <i>P. acuta</i>
		* <i>Ancylidae</i>	<i>Ferrissia</i>		
		@ <i>Helicidae</i>	<i>Helix</i>		<i>H. pomatia</i>
		@ <i>Succineidae</i>	<i>Succinea</i>		
<i>Scaphopoda</i>			<i>Dentallium</i> <i>Siphonodentalium</i>		
<i>Bivalvia</i> ( <i>Pelecypoda</i> )	<i>Protobranchiata</i> <i>Pteriomorphia</i>	<i>Mytilidae</i> <i>Ostreidae</i>	<i>Mytilus</i> <i>Ostrea</i>		<i>M. edulis</i> <i>O. virginica</i>
<i>Cephalopoda</i>			<i>Nautilus</i> <i>Octopus</i>		

\*= ordre Basommatophora @= ordre Stylommatophora  
Les chiffres indiqués entre parenthèses représentent le nombre d'espèces

(Sources principales: Malek, 1980/Brown, 1991)

Figure 7

## II.1. Les cellules de défense

On distingue au moins quatre types cellulaires participant au système de défense interne (Figure 8).

-Le premier type de cellules correspond aux cellules endothéliales qui tapissent la paroi des vaisseaux sanguins et dont le rôle consiste à empêcher la pénétration des agents infestants ou à les piéger lorsqu'ils ont réussi à s'introduire dans l'organisme. Ces cellules ont aussi la capacité de présenter les particules piégées à des cellules phagocytaires mobiles (hémocytes circulants).

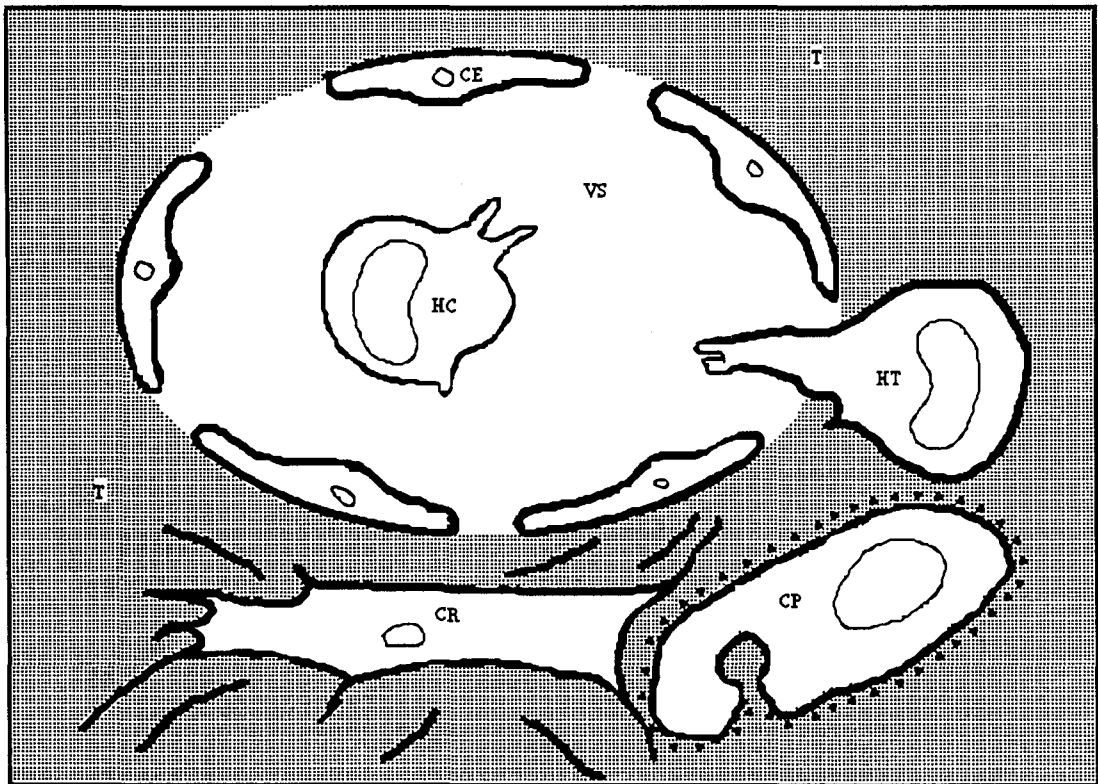
Il existe aussi des cellules à fonction phagocytaire au niveau des tissus : les cellules à réticulum et les cellules-pore.

-Ancrées dans les tissus grâce à de multiples fibrilles extracellulaires, les cellules à réticulum sont de véritables cellules phagocytaires car elles sont capables d'ingérer de multiples substances étrangères. Comme leur nom l'indique elles possèdent non seulement un réticulum endoplasmique rugueux abondant, mais aussi un appareil de Golgi très développé. Bien qu'elles aient fondamentalement la même fonction de phagocytose que les hémocytes circulants et résidents, leur mode d'action est différent car elles sont dépourvues de la peroxidase lysosomiale que possèdent les hémocytes.

-Contrairement aux cellules à réticulum, les cellules-pore ne sont pas dotées d'un matériel enzymatique approprié pour l'ingestion de particules étrangères. Spécialisées dans l'endocytose sélective de protéines endogènes, elles participent au renouvellement des protéines de l'hémolymphe.

-Les hémocytes des gastéropodes peuvent indifféremment circuler librement dans l'hémolymphe (hémocytes circulants) ou s'établir au niveau des tissus adjacents (hémocytes résidents ou tissulaires), et ce de manière complètement réversible.

Représentation schématique des cellules effectrices  
dans le système interne de défense des mollusques



CE: cellule endothéliale, HC: hémocyte circulant, HT: hémocyte tissulaire  
CR: cellule à réticulum, CP: cellule pore, T: tissus, VS: vaisseau sanguin.

D'après W.P.W. Van der Knaap et E.S. Loker, *Parasitology Today*, 1990.

Figure 8



Ces deux types d'hémocytes, quoiqu'ayant des morphologies différentes, possèdent un système lysosomal largement développé et semblent assurer les mêmes fonctions de phagocytose et d'encapsulation d'agents exogènes.

Des études plus approfondies sur les hémocytes circulants ont révélé que ces cellules constituaient une population hétérogène tant d'un point de vue morphologique que fonctionnel.

Morphologiquement, on peut distinguer d'une part des cellules rondes ayant un rapport nucléoplasmique élevé, d'autre part des cellules adhérentes capables d'émettre des pseudopodes et comportant dans leur cytoplasme de nombreuses structures lysosomiales, mais également des cellules ayant une morphologie intermédiaire entre les cellules rondes et les cellules adhérentes (Figure 8).

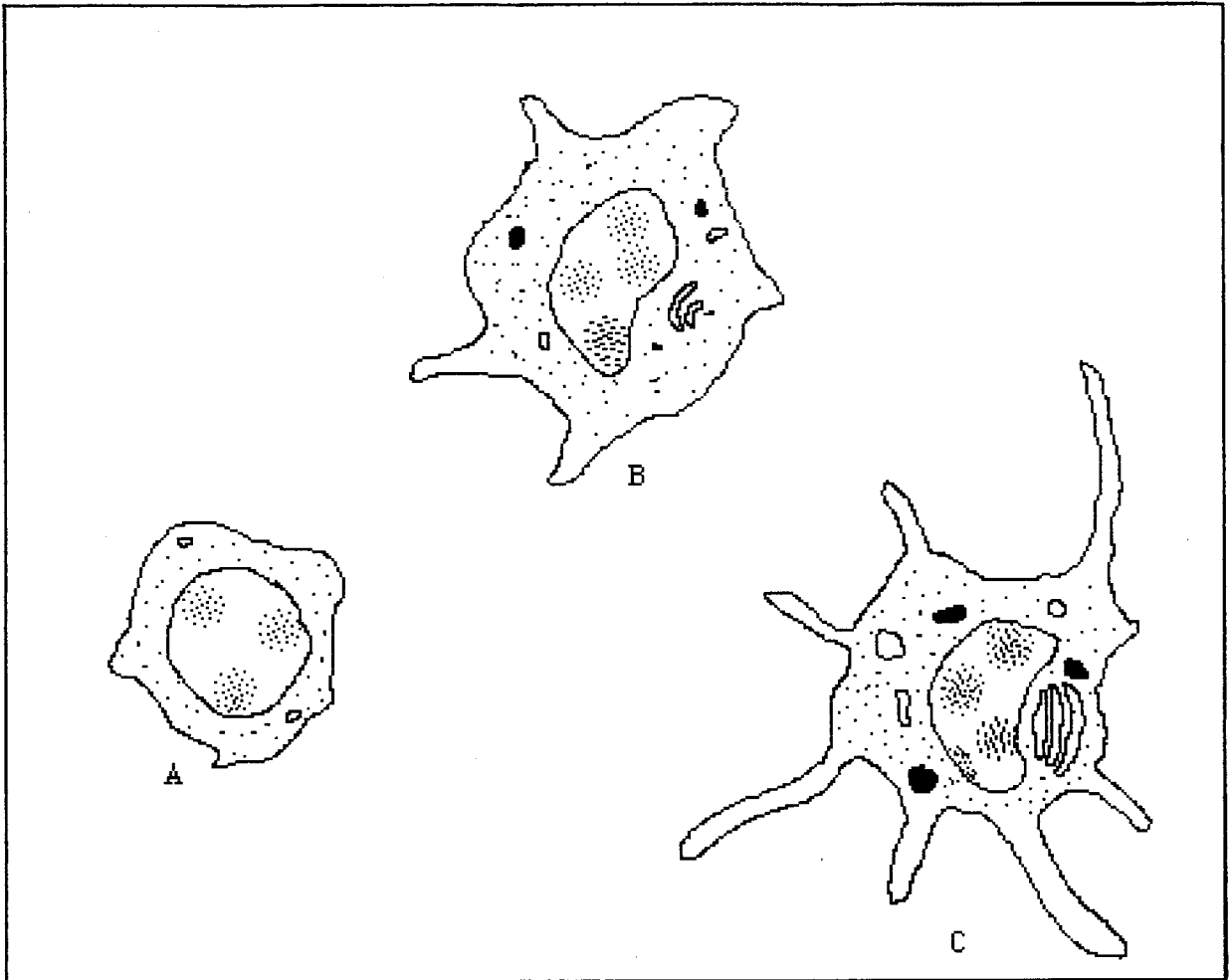
D'un point de vue fonctionnel, outre leurs activités de phagocytose et d'encapsulation permettant une épuration de l'hémolymphe et des tissus vis-à-vis des corps étrangers, les hémocytes semblent capables de réparer certaines lésions tissulaires et de synthétiser des facteurs de défense humoraux (revue Sminia et Van der Knaap, 1986).

Certains auteurs revendiquent l'existence de deux types d'hémocytes : les cellules rondes (ou hyalinocytes) d'une part et cellules adhérentes (ou granulocytes) d'autre part (Cheng, 1975 chez *Biomphalaria glabrata* / Ottaviani, 1983 chez *Planorbarius corneus* / Monteil et Matricon-Gondran, 1993 chez *Lymnaea truncatula*).

Cependant cette dichotomie ne fait pas l'unanimité et d'autres groupes pensent qu'il ne s'agit que de différents stades de maturation d'une même lignée, les cellules rondes étant moins différenciées que les cellules adhérentes (Van der Knaap et coll., 1993 chez *Lymnaea stagnalis*).

D'autre part, selon Yoshino il y aurait plutôt une seule population essentiellement granulocytaire mais, néanmoins hétérogène.

Représentation schématique de l'hétérogénéité morphologique  
de la population d'hémocytes circulants des gastéropodes



- A: cellule ronde, ayant un rapport nucléoplasmique élevé  
B: cellule à morphologie intermédiaire  
C: cellule adhérente capable d'émettre des pseudopodes  
et comportant dans son cytoplasme de nombreuses structures lysosomiales

Figure 9

En effet, des études de marqueurs de surface d'hémocytes de *B. glabrata* entreprises à l'aide de lectines ou d'anticorps monoclonaux (l'un d'entre eux étant en particulier dirigé vis-à-vis d'un épitope de surface appelé BGH<sub>1</sub>), ont permis de mettre en évidence des sous-populations d'hémocytes antigéniquement distinctes (Yoshino et Granath, 1983/ Yoshino et Granath, 1985).

A l'heure actuelle, le débat lancé depuis plus d'un quart de siècle (Georges, 1950) sur l'origine de la diversité des hémocytes n'est toujours pas résolu et il n'est pas surprenant que face à de telles divergences d'opinions, certains groupes qui s'intéressent à la caractérisation morphologique d'hémocytes de gastéropodes, ne sachent pas comment interpréter leurs observations (Barracco et coll., 1993 chez *Biomphalaria tenagophila*)

## II.2. Les facteurs humoraux

Le système immunitaire des invertébrés ne possède probablement pas d'immunoglobulines mais il est cependant constitué d'un certain nombre de facteurs humoraux naturels et inductibles assurant une fonction défensive.

Les lectines sont des molécules largement répandues puisqu'elles ont été décrites dans tous les types d'organismes (virus, bactéries, levures, plantes, invertébrés et vertébrés). Chez les Gastéropodes, elles ont été particulièrement bien étudiées car elles sont présentes dans toutes les espèces et semblent jouer un rôle majeur dans leur défense interne. Ce sont généralement des glycoprotéines de poids moléculaire variable; en effet, elles sont composées de sous-unités de 15 à 20 kDa dont le nombre diffère selon les espèces. L'hétérogénéité de ces molécules a été particulièrement rapportée chez *Helix aspersa* (Fountain et Campbell, 1984) et *Biomphalaria glabrata* (Bretting et coll., 1983). Il a été suggéré que la diversité des lectines pouvait résulter soit de la synthèse de nombreuses molécules différentes, soit de la combinaison de plusieurs sous-unités afin de générer -à moindre coût- des molécules à structures variables (Olafsen, 1986). Quoiqu'il en soit, il apparaît que les

lectines forment un groupe hétérogène de protéines n'ayant que peu ou pas de communautés structurales entre elles.

Synthétisées par les hémocytes puis libérées dans le plasma (Van der Knaap et Loker, 1990/ Van der Knaap et coll., 1993), elles possèdent au moins deux sites de liaison qui leur permettent de se fixer spécifiquement et réversiblement à des résidus sucrés présents sur des glycoprotéines ou des glycolipides. Ces molécules, récemment désignées sous le terme de "Carbohydrate Binding plasma Proteins" ou CBP (Monroy et coll., 1992), présentent des affinités variées pour divers sucres et assurent ainsi au sein de chaque individu, une diversité de reconnaissance.

Le rôle des lectines plasmatiques consiste à immobiliser -en présence de calcium- des particules étrangères par un phénomène d'agglutination (d'où le terme d'agglutinines). Elles réalisent un "pontage" des particules étrangères grâce à leur aptitude à se fixer aux résidus carbohydrates et facilitent ainsi l'action des cellules de défense (hémocytes) (Sminia et Van der Knaap, 1986). Le mode de fonctionnement de ces agglutinines visant à faciliter la phagocytose par les hémocytes s'apparente en fait à celui des opsonines. En effet, le terme d'opsonine est utilisé pour tout facteur sérique capable d'aider les hémocytes à ingérer des particules étrangères. Cet autre rôle des lectines a été observé chez certains mollusques, notamment *Helix aspersa* (Prowse et Tait, 1969) *Lymnaea stagnalis* (Sminia et coll., 1979) et *Biomphalaria glabrata* (Fryer et Bayne, 1989).

Outre les lectines plasmatiques, des techniques immunocytochimiques ont permis de révéler l'existence de lectines à la surface des hémocytes (revue Sminia et Van der Knaap, 1987-a). De la même manière qu'elles se lient aux particules étrangères, ces molécules pourraient se fixer aux hémocytes. Cette association lectine-hémocyte ferait intervenir des récepteurs spécifiques, mais leur nature chimique reste encore mal connue. On peut alors se demander pourquoi les lectines plasmatiques ne s'associent pas constamment aux hémocytes. En fait, de récentes observations suggèrent que les lectines circulantes ne peuvent se lier à la surface des hémocytes qu'après avoir subi des modifications enzymatiques engendrées par

leur fixation aux particules étrangères. Cette stratégie rapportée par Van der Knaap et Loker (1990) a permis à ces auteurs d'envisager diverses possibilités de reconnaissance des trématodes par les hémocytes de gastropodes en présence de lectines.

Ainsi, par leur double localisation les lectines jouent le rôle non seulement de molécules de reconnaissance au niveau du plasma mais aussi de récepteurs de surface pour le non-soi. Il est également intéressant de noter que l'existence à la surface des hémocytes de sites spécifiques pour les lectines favorise le concept de coopération entre éléments cellulaires et humoraux pour la reconnaissance et la destruction du non-soi chez les invertébrés.

Les enzymes lysosomiales (le lysosyme, les phosphatases acides et alcalines, certaines estérases, l'aminopeptidase et la lipase) sont d'autres facteurs de défense des hémocytes. Stockées dans des granules cytoplasmiques appelés lysosomes, ces enzymes sont activement synthétisées dès que les hémocytes rencontrent un agent pathogène. Si certaines études permettent de penser qu'elles agiraient à l'intérieur des hémocytes, dans les phagosomes où le pH acide est compatible avec leur activité (Moore et Gelder, 1985), d'autres travaux ont plutôt tendance à montrer une libération des enzymes lysosomiales dans le milieu extracellulaire (Cheng et coll., 1977/ Cheng et coll., 1978-a/ Cheng et Mohandas, 1985). En effet, plusieurs de ces enzymes ont été identifiées dans l'hémolymphe de Gastéropodes (Cheng et Yoshino, 1976/ Cheng et coll., 1977/Cheng et coll., 1978-b/Kassim et Richards, 1978). Il est possible en réalité que ces enzymes aient un rôle à la fois intracellulaire et extracellulaire mais les différentes observations rapportées jusqu'à présent ne démontrent pas précisément leur mode d'action.

Parmi les autres facteurs plasmatiques identifiés, certains ont un rôle spécifiquement anti-parasitaire : citons à titre d'exemples la substance découverte dans l'hémolymphe d'*Helix aspersa*, capable d'inhiber la croissance des nématodes

(Ratanarat-Brockelman, 1977), l'inhibiteur de trypsine retrouvé chez *Helix pomatia* infectée (Renwrautz, 1979) ou encore le facteur immobilisant les miracidies de trématodes n'apparaissant que chez *B. glabrata* infecté (Lie et coll., 1980).

Ces autres facteurs de défense n'ont pas reçu autant d'attention que les lectines ou les enzymes lysosomiales et par conséquent leur lieu de synthèse, leur nature moléculaire ainsi que leur mode d'action restent encore très mal connus à l'heure actuelle (Sminia et van der Knaap, 1987-a).

Malgré son aspect primitif lorsqu'on le compare à celui des vertébrés, le système de défense interne des mollusques est donc capable de détecter l'entrée de tout agent infestant dans l'organisme et de s'en défendre grâce à la conjugaison de facteurs cellulaires et humoraux. Pourtant, dans le cadre de l'infection des mollusques par les trématodes, on n'assiste pas toujours à une élimination des parasites. On peut alors se demander comment se fait la sollicitation du système interne des mollusques lors de ces interactions.

### III. Les interactions mollusques-trématodes

#### III.1. Introduction

Si les mollusques peuvent être résistants ou sensibles à l'infection par certains trématodes, leur degré de compatibilité avec le parasite n'apparaît qu'après la métamorphose du miracidium en sporocyste. Cette transformation survient dès la pénétration du miracidium chez un mollusque et se caractérise par la perte des plaques ciliées qui, libérées dans l'hémolymphe, seront phagocytées par les hémocytes (revue Meuleman et coll., 1987).

En fonction de ce degré de compatibilité entre le parasite et son hôte, différentes réponses seront observées, allant de l'indifférence des mollusques susceptibles (interactions compatibles) à l'intolérance des mollusques résistants

entraînant plus ou moins rapidement le rejet du parasite (interactions incompatibles).

### III.2. Interactions mollusques-trématodes incompatibles

Quels que soient les modèles mollusques-trématodes incompatibles, les réactions de défense de l'hôte sont toujours à peu près semblables. Les hémocytes, en réponse à l'infection, s'accumulent autour des sporocystes, probablement par effet chimiotactique. Après l'étape de contact qui varie d'une souche de parasite à l'autre, les sporocystes sont encapsulés par les hémocytes en quelques heures. Au bout de 24 heures, le tégument parasitaire est phagocyté, et 48 heures après l'infection, il ne reste plus que quelques résidus dispersés de sporocystes. Il faut cependant noter que la destruction des larves de trématodes peut avoir lieu plus ou moins rapidement en fonction de la capacité d'échappement du parasite face à la réponse immune de l'hôte d'une part, et du degré de résistance de l'hôte d'autre part (revues Meuleman et coll., 1987/Loker et Bayne, 1986).

Les mécanismes de reconnaissance et de cytotoxicité impliqués dans ces interactions ont été le plus souvent étudiés à l'aide de souches de *B. glabrata* de laboratoire résistantes à *S. mansoni*. Les observations de Bayne et coll. réalisées *in vitro* il y a une dizaine d'années, ont montré d'une part que les hémocytes étaient responsables de cette cytotoxicité et d'autre part qu'un ou des facteurs plasmatiques facilitaient leur action (Bayne et coll., 1980-a-b/Loker et Bayne, 1982). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés *in vivo* par Granath et Yoshino quelques années plus tard (1984).

De nombreuses études visant à comparer les hémocytes de mollusque sain ou infecté, à l'aide de lectines ou d'anticorps polyclonaux n'ont pourtant pas permis d'expliquer l'activité cytotoxique des hémocytes. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a néanmoins permis de mettre en évidence un épitope spécifique majoritairement représenté à la surface des hémocytes chez les mollusques susceptibles (Yoshino, résultat non publié). Dans les mollusques résistants, la faible

proportion de ces cellules a permis aux chercheurs de corréler les activités de phagocytose intense et certaines activités enzymatiques (phosphatase acide) à l'absence de cet épitope particulier. Cependant, l'existence ou l'absence de cette structure ne suffit probablement pas à expliquer l'ensemble des mécanismes de reconnaissance et de cytotoxicité impliqués dans les interactions mollusque-trématode incompatibles. Plus récemment, d'autres travaux suggèrent que les hémocytes de mollusques résistants peuvent non seulement agir chimiquement par libération de substances oxydatives (péroxydase, superoxyde, peroxyde d'hydrogène), mais aussi mécaniquement par agression du tégument parasite grâce à leurs pseudopodes (Van der Knaap et Loker, 1990).

D'autre part, le ou les facteurs plasmatiques facilitant l'action cytotoxique des hémocytes, n'ont -à notre connaissance- pas encore été identifiés. En effet, bien que certaines observations mettent en évidence uniquement chez les mollusques résistants, l'existence d'opsonines capables d'augmenter le taux de phagocytose de levures (Fryer et Bayne, 1989), la relevance de ces observations vis-à-vis des sporocystes reste encore à démontrer. Des études biochimiques détaillées visant à comparer les facteurs humoraux de mollusques susceptibles et résistants ont été entreprises (Spray et Granath, 1988/Spray et Granath, 1989) et devraient faciliter l'identification et la caractérisation du ou des facteurs impliqués dans l'action cytotoxique des hémocytes.

### III.3. Notions de compatibilité et de spécificité

Bien qu'il arrive que les miracidies pénètrent chez des mollusques incapables d'assurer leur développement -voire même chez des organismes autres que des mollusques comme par exemple des têtards d'amphibiens (Barbosa et Carneiro, 1965/ Upatham, 1972)-, ce phénomène appelé effet "leurre" ou effet "decoy" (Moné et Combes, 1986) entraîne une réduction de l'efficacité de la transmission du parasite. Aussi, pour assurer sa survie, celui-ci a donc intérêt à s'installer chez un hôte compatible. De nombreuses études visant à analyser le



comportement des miracidies ont permis de prouver que l'interaction mollusque-trématode, pour être durable, devait être spécifique. Lors d'expériences mettant en contact une espèce de trématode avec différents mollusques, il a été montré que sur la base de signaux chimiotactiques, un seul mollusque était choisi préférentiellement par les miracidies. Ainsi le développement de *S. mansoni* se fait chez *Biomphalaria*, et *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* et *S. bovis* évoluent respectivement chez *Bulinus*, *Oncomelania*, *Physopsis* et *Planorbarius/Bulinus*.

Sur le terrain, les miracidies répondraient à deux types de signaux: des stimuli physiques provenant de l'environnement, comme le phototactisme ou la température de l'eau, et des stimuli chimiques que nous avons déjà mentionné et qui proviennent des mollusques hôtes potentiels. Des corrélations ont pu être établies entre le comportement des miracidies et le mode de vie des différents genres de mollusques. C'est ainsi que pour rencontrer *Biomphalaria glabrata* vivant sur les berges ou accroché à une végétation flottante, les miracidies à *S. mansoni* nagent en surface. De même, les larves de *S. japonicum* cotoient les espaces amphibies (surface de l'eau, trous d'eau sur les berges) où vit *Oncomelania*. Enfin, par un phototactisme négatif exercé sur *S. haematobium*, les miracidies rejoignent les fonds vaseux ou les berges ombragées, fréquentant ainsi les mêmes sites que leur hôte *Bulinus*. Ces exemples nous montrent clairement que chaque espèce de schistosome est spécifique d'un genre de gastéropode.

En réalité, la spécificité mollusque-trématode est bien plus subtile qu'on ne pourrait le croire à la suite de ces exemples. Tout d'abord, la quantité d'hôtes intermédiaires compatibles pour le développement d'une espèce de schistosome est bien plus restreinte que celle des hôtes définitifs. Ainsi, *S. japonicum* qui est capable d'infecter divers types d'hôtes vertébrés (rats, souris, lapins, chiens, cochons, bétail, homme), ne peut se développer que dans quelques sous-espèces d'*Oncomelania hupensis* (Basch, 1991). D'un autre côté, cet exemple permet de comprendre qu'en général le parasite est compatible non pas avec un genre de

mollusque (ex. *Oncomelania*) mais plutôt avec une espèce (ex. *Oncomelania hupensis*). C'est ce que Combes (1982) définit comme l'angle d'exigence de développement, qui comme nous venons de le voir, est plus restreint que l'angle d'exigence de pénétration. Cette compatibilité restreinte entre espèces de schistosomes et de mollusques, représentée dans la Figure 10, se limite même parfois à une souche géographique très localisée. Ainsi, *S. mansoni* de Porto Rico qui est capable de se développer chez 95% des *B. glabrata* de Porto Rico, ne peut absolument pas (0%) infecter les *B. glabrata* du Brésil (Newton, 1953). Les travaux de Paperna (1968) renforcent davantage cette notion de spécificité puisque ce chercheur observe notamment au Ghana, que les différentes espèces de mollusques du genre *Bulinus* d'une région ne peuvent pas toutes servir d'hôte intermédiaire pour les schistosomes (*S. haematobium*) présents dans cette région. Réciproquement, l'origine géographique de l'espèce de schistosome limite également la compatibilité mollusque-trématode. Les travaux de Files et Cram (1949) montrent par exemple qu'un *B. glabrata* du Brésil, très sensible à l'infection par *S. mansoni* local, est réfractaire au même parasite issu d'un des pays voisins du Brésil, le Venezuela.

Sans être exhaustifs, ces exemples permettent de comprendre à quel point le degré de spécificité mollusque-trématode est élevé. Selon Bayne et Yoshino (1989), la nature favorise la sélection de mollusques résistants vis-à-vis des parasites, particulièrement vis-à-vis de ceux qui peuvent avoir un impact négatif sur les populations en causant une morbidité et mortalité importantes. D'ailleurs, l'existence de petits foyers ou de zones endémiques relativement restreintes par rapport à la vaste distribution des mollusques potentiellement vecteurs, prouve bien que la compatibilité mollusque-trématode est un phénomène plutôt rare, voire exceptionnel.

## Spécificité Mollusques/Trématodes dans les différentes schistosomiases

Schistosomes	Mollusques	
Espèce	Genre	Espèce
<u>Groupe <i>S. haematobium</i></u>		
<i>S. haematobium</i> *	BULINUS	<i>B. truncatus</i> (g) <i>B. africanus</i> (g) <i>B. forskalii</i> (g) ( <i>B. reticulatus</i> ) (g)
<i>S. intercalatum</i> *	FERRISSIA BULINUS/PHYSOPSIS	<i>F. tenuis</i> <i>B. africanus</i> (g) <i>B. forskalii</i>
<i>S. mattheei</i> *	BULINUS	<i>B. africanus</i> (g)
<i>S. bovis</i>	BULINUS	<i>B. truncatus/tropicus</i> (g) <i>B. africanus</i> (g) <i>B. forskalii</i> (g)
<i>S. curassoni</i>	PLANORBARIUS BULINUS	<i>P. metidjensis</i> <i>B. umbilicatus</i> <i>B. senegalensis</i>
<i>S. margrebowiei</i>	BULINUS	<i>B. forskalii</i> <i>B. scalaris</i>
<i>S. leiperi</i>	BULINUS	<i>B. tropicus</i> <i>B. africanus</i> (g) <i>B. reticulatus</i> (g)
<u>Groupe <i>S. mansoni</i></u>		
<i>S. mansoni</i> *	BIOMPHALARIA	<i>B. glabrata</i> <i>B. straminea</i> <i>B. tenagophila</i> <i>B. amazonica</i> @ <i>B. peregrina</i> @ <i>B. pfeifferi</i> <i>B. alexandrina</i>
<i>S. rodhaini</i>	BIOMPHALARIA	<i>B. pfeifferi</i> <i>B. sudanica</i> <i>B. salinarum</i> @ <i>B. arabica</i> @
<i>S. edwardiense</i> <i>S. hippopotami</i>	BIOMPHALARIA ? ?	<i>B. salinarum</i> @ ?
<u>Groupe <i>S. indicum</i></u>		
<i>S. indicum</i>	INDOPLANORBIS	<i>I. exustus</i>
<i>S. spindale</i>	INDOPLANORBIS	<i>I. exustus</i>
<i>S. nasale</i>	INDOPLANORBIS	<i>I. exustus</i>
<i>S. incognitum</i>	LYMNAEA RADIX	<i>I. luteola</i> <i>R. auricularia rubiginosa</i>
<u>Groupe <i>S. japonicum</i></u>		
<i>S. japonicum</i> *	ONCOMELANIA	<i>O. hupensis</i> (6 ss espèces)
<i>S. mekongi</i> *	TRICULA	<i>T. aperta</i> <i>T. bollingi</i> <i>T. humida</i>
<i>S. sinensium</i>	TRICULA	<i>T. gregarina</i> <i>T. bollingi</i> <i>T. aperta</i>
<i>S. malayensis</i> * (ou <i>S. japonicum</i> -like)	ROBERTSIELLA TRICULA	<i>R. kaporensis</i> <i>T. aperta</i>

\* espèces infestant l'homme. ? incertain. (g) groupe incluant plusieurs espèces  
@ compatibilité observée uniquement en laboratoire

Principales sources: Malek, 1980/Rollinson et Southgate, 1987

Figure 10

#### III.4. Interactions mollusques-trématodes compatibles

Dans les interactions compatibles, l'infection d'un mollusque par un trématode semble -au premier abord- n'engendrer aucune réponse immune. Pourtant, le mollusque susceptible est un hôte tout-à-fait immunocompétent, et s'il est incapable de tuer le parasite qui l'infecte, il pourrait néanmoins répondre à l'infection. A priori tous les stades de développement du parasite à l'intérieur du mollusque pourraient engendrer une réponse de la part de l'hôte susceptible. Par conséquent, les trématodes ont dû mettre au point -au cours de l'évolution- diverses stratégies pour échapper aux activités de défense de l'hôte ou pour les supprimer.

Parmi les différents modèles mollusques-trématodes compatibles, le couple *B. glabrata*-*S. mansoni* a été le plus étudié. En effet, la prise de conscience collective de la gravité des schistosomiasis humaines a suscité dans les pays en développement et les pays industrialisés une volonté d'accroître non seulement les programmes de lutte, mais aussi les moyens de recherche. Depuis une vingtaine d'années, de formidables efforts scientifiques en laboratoire mais aussi sur le terrain ont permis de progresser considérablement tant dans la lutte contre la schistosomiose que dans la connaissance fondamentale de la maladie elle-même.

Consciente de l'importance de la spécificité trématode-mollusque pour la survie du parasite et convaincue que la transmission de la maladie peut être stoppée en intervenant à cette étape du cycle, notre équipe comme plusieurs autres s'est intéressée aux mécanismes qui permettent au schistosome de se développer chez le mollusque, à travers le modèle *B. glabrata*-*S. mansoni*.

IV

LE COUPLE  
*B. GLABRATA-S. MANSONI*

## I. Bases génétiques de l'interaction *B. glabrata*-*S. mansoni*

En 1946, Stunkard observait que les mollusques d'une même espèce et d'une même région étaient plus ou moins sensibles à l'infection par un schistosome. Quelques années plus tard, Newton démontrait que ces différences de susceptibilité étaient génétiquement déterminées. En effet, en réalisant des croisements entre deux souches de *B. glabrata*, l'une permissive à 95% et l'autre totalement réfractaire à *S. mansoni*, il obtint -en génération F2- des mollusques avec des sensibilités intermédiaires (de 0% à 82%) (Newton, 1952-1953-1954/revue Basch, 1976). Richards a repris et approfondi les travaux de Newton, et grâce à la capacité d'autofécondation des mollusques (hermaphrodisme), il a pu obtenir en laboratoire des lignées de *B. glabrata* avec une susceptibilité allant de 0% à 100% (Richards, 1970/Richards et Merritt, 1972). En se basant sur les différences de susceptibilité d'une population de *B. glabrata* face à l'infection par une souche particulière de *S. mansoni* (PR-1), Richards et coll. ont décrit quatre catégories de mollusques: (1) mollusques réfractaires à l'infection, (2) mollusques susceptibles, (3) jeunes susceptibles devenant réfractaires à l'âge adulte, et (4) jeunes susceptibles avec une modification variable de la susceptibilité à l'âge adulte (Richards, 1977/Richards, 1984) démontrant ainsi que la susceptibilité est conditionnée par l'âge des mollusques. Actuellement, ces auteurs suggèrent que la susceptibilité des mollusques juvéniles est déterminée par plusieurs gènes (au moins quatre) tandis que la susceptibilité/résistance à maturité ne serait gouvernée que par un seul (Richards et coll., 1992).

Le déterminisme génétique du caractère "infectivité" du parasite a été également mis en évidence chez plusieurs espèces de schistosomes (Wright, 1974/Jourdane, 1980). Un vaste polymorphisme de résistance (côté mollusque) semble donc faire face à un vaste polymorphisme de virulence (côté parasite), mais on ne sait toujours pas si les interactions génétiques entre le mollusque et le parasite sont du type "gène pour gène", c'est-à-dire où chaque gène de résistance

s'opposerait à un gène de virulence, comme cela a été récemment décrit dans les systèmes plantes-pathogènes (Franck, 1992). Les résultats acquis jusqu'ici dans l'étude de la variabilité génétique de la compatibilité mollusque-trématode ne permettent pas d'attribuer un rôle prééminent au mollusque ou au parasite dans l'établissement de la relation de compatibilité entre eux. Cependant, des équipes françaises et américaines se proposent -dans le cadre d'une étroite collaboration- de faire porter leurs efforts sur la composante mollusque du système.

Plusieurs approches pourront être envisagées pour caractériser les gènes de résistance grâce à des techniques de biologie moléculaire. Une nouvelle technique de marquage du génome (RAPD pour Random Amplified Polymorphic DNA) ayant déjà permis de mettre en évidence chez les plantes, des marqueurs liés aux gènes de résistance aux champignons (Paran et coll., 1991), et aux micro-organismes (Martin et coll., 1990), pourrait être appliquée aux mollusques. D'autres méthodes d'analyse du polymorphisme génétique (RFLP, DNA fingerprinting, mini ou microsattellites) pourront être également utilisées. Par ailleurs, la construction de banques soustractives de cDNA à partir d'hémocytes provenant de mollusques sensibles et résistants devrait permettre de déceler les différences génétiques entre mollusques sensibles et résistants et d'identifier les gènes impliqués dans la résistance (ou la susceptibilité). Une fois caractérisés, ces gènes pourraient être utilisés pour obtenir par transgénose des mollusques résistants qui seraient compétitifs par rapport aux souches sensibles et qui diffuseraient héréditairement les gènes de résistance dans les populations naturelles. L'obtention de tels mollusques représenterait un espoir considérable dans la lutte contre les schistosomiasés à moyen et à long terme.

Si malgré les nombreux travaux de Richards, l'analyse du déterminisme génétique de la compatibilité *B. glabrata-S. mansoni* n'en est qu'à ses balbutiements, de plus amples recherches ont d'ores et déjà été consacrées aux aspects physiologiques et immunologiques de cette compatibilité.

## II. Aspects physiologiques de l'interaction *B. glabrata*-*S. mansoni*

D'un point de vue physiologique, l'étude de la compatibilité *B. glabrata*-*S. mansoni* a été jusqu'ici essentiellement descriptive, relatant des modifications de la reproduction, de la croissance, ou du métabolisme de l'hôte intermédiaire.

### II.1. Modifications de la reproduction

Un effet négatif sur la reproduction de l'hôte a été abondamment décrit dans différents systèmes parasites-hôtes invertébrés, et particulièrement dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle dans les associations mollusques-trématodes. Mc Crady (1874) fut le premier à observer un tel phénomène chez un mollusque, i.e. *Crassostrea virginica* (Bivalvia), infecté par le plathelminthe *Bucephalus cuculus*. Par la suite, de nombreux travaux sont apparus à ce sujet.

Dans le modèle *B. glabrata*-*S. mansoni*, les études de Pan (1965) décrivent une suppression de la ponte des oeufs de mollusques corrélée à l'émergence des cercaires. La reproduction de l'hôte est donc bien modifiée puisqu'on assiste à une stérilité des mollusques juvéniles ou adultes. En réalité, il semble que les mollusques réagissent différemment en fonction de l'état de leur maturité sexuelle au moment de l'infection. Lorsque l'infection touche des mollusques juvéniles, ceux-ci deviennent stériles (Meier et Meier-Brook, 1981). Quand des spécimens de *B. glabrata* sont infectés par *S. mansoni* juste avant l'âge adulte (proches de la maturité sexuelle, mais ne pondant pas encore d'oeufs), on observe une nette augmentation de la fécondité dans les premières semaines qui suivent l'infection (Sturrock et Sturrock, 1970), celle-ci diminuant très fortement par la suite (Thornhill et coll., 1986). La même observation a été rapportée par Minchella et Loverde (1981) chez *B. glabrata* adulte, contrairement à une étude plus récente de Crews et Yoshino (1989) qui indique une baisse immédiate de la fécondité lorsque les mollusques sont infectés à maturité. Selon Etges et Gresso (1965), ce phénomène



serait même réversible, puisque certains spécimens recommenceraient à pondre bien qu'étant toujours infectés.

Le terme de "castration parasitaire" initialement employé par Giard au début du siècle (1911) pour décrire ce phénomène est en fait mal approprié puisqu'en réalité une véritable castration correspond à une destruction irréversible du tissu reproducteur. Noble et Noble (1971) ont redéfini ce terme comme étant une "destruction ou une altération des gonades par le parasite" et Malek et Cheng (1974) comme une inhibition partielle ou totale de la formation des gamètes chez l'hôte, causée par le parasite. Ce phénomène de "castration parasitaire" peut être mécanique, par destruction des gonades, ou chimique, par émission de molécules agissant directement ou indirectement sur la fécondité de l'hôte (revue Hurd, 1990). Dans ce deuxième cas, la fécondité des mollusques est atteinte sans que les organes sexuels ne soient endommagés et l'on utilise alors parfois le terme de castration physiologique (Schallig, 1991).

Le groupe de Joosse a pu élucider une grande part des mécanismes moléculaires sous-jacents à cet hypogonadisme induit, dans le modèle *Lymnaea stagnalis-Trichobilharzia ocellata*. Dans cet exemple, la castration parasitaire est due à l'émission par le système neuroendocrine du mollusque, d'un peptide de 79 acides aminés (8729 Da) (Hordijk et coll., 1991) de séquence connue, appelée schistosomine. Les mécanismes moléculaires de la castration parasitaire dans le modèle *B. glabrata-S. mansoni* n'ont -à notre connaissance- pas été encore abordés. Cependant, la récente découverte de la schistosomine dans l'hémolymphe des mollusques impliqués dans la transmission de la schistosomiase humaine, constitue une première étape très encourageante (De Jong Brink et coll., 1991).

## II.2. Modifications de la croissance

Parallèlement à une altération des fonctions de reproduction, on assiste généralement à une modification de la croissance de l'hôte. Dans de nombreux modèles, les mollusques infectés par des trématodes grandissent plus rapidement

que les mollusques contrôles. Par exemple, l'infection de *L. stagnalis* juvénile par *T. ocellata* se traduit par un gigantisme qui correspond essentiellement à une augmentation de la quantité d'hémolymphe, le poids sec de l'animal n'étant pas modifié (revue De Jong Brink, 1992-b). Wilson & Denison (1980) observent également une étroite corrélation entre castration parasitaire et gigantisme de l'hôte dans le modèle *L. truncatula*-*F. hepatica*, où la croissance des mollusques est appréciée en terme de taille de coquille et de poids sec de l'animal (c'est-à-dire coquille, tissus et parasites).

L'infection de *B. pfeifferi* par *S. mansoni* se traduirait également par un gigantisme de l'hôte (Meuleman, 1972); pourtant l'effet de *S. mansoni* sur *B. glabrata* serait plutôt inverse: Pan (1965) et Sturrock et Sturrock (1970) constatent initialement une accélération de croissance au niveau de la coquille, mais celle-ci n'est pas maintenue tout au long de l'infection, et un retard de croissance est finalement souvent observé par rapport aux mollusques contrôles. Cet effet hostile à la croissance de l'hôte a également été décrit par Théron & Moné (1984) qui détectent un ralentissement de croissance des mollusques associé aux cycles de production cercarienne.

### II.3. Autres modifications

Les infections parasitaires affectent aussi le métabolisme de l'hôte (Thompson, 1990). Ceci n'est pas surprenant puisque les parasites se procurent par leur hôte, la nourriture dont ils ont besoin pour survivre, se développer, se différencier et se reproduire. Williams et Gilbertson (1983) observent que les *B. glabrata* infectés consomment plus de nourriture que les mollusques contrôles. Les parasites induiraient en effet une diminution des concentrations de glycogène, protéines, acides aminés et lipides dans l'hémolymphe du mollusque hôte. Schnell et coll. (1985) ont réalisé des études détaillées sur les concentrations d'acides aminés libres dans l'hémolymphe de *B. glabrata*. A 33 jours après infection, la quantité d'acides aminés présente dans l'hémolymphe serait considérablement réduite,

essentiellement à cause d'une diminution en sérine et en glutamine. La concentration protéique de l'hémolymphe semblerait aussi plus faible chez *B. glabrata* infecté que chez les mollusques sains.

Le métabolisme de l'hôte serait aussi influencé par l'excrétion parasitaire de produits intermédiaires ou finaux du métabolisme. On sait que certains schistosomes libèrent des acides aminés (proline, par exemple) au sein de leur hôte (Köhler et Voigt, 1988), cependant, le rôle de ces acides aminés ou des produits du métabolisme éventuellement excrétés ou sécrétés par les schistosomes n'est pas connu à l'heure actuelle.

Pour certains hôtes invertébrés, l'infection parasitaire engendre également des modifications de comportement ou d'apparence. En effet, pour de nombreux parasites, l'association avec un hôte invertébré ne représente qu'une étape d'un cycle complexe, pouvant inclure des stades libres ou des associations avec d'autres hôtes intermédiaires ou définitifs. Le cycle de vie de ces organismes pose donc le problème de la transmission du parasite d'un hôte à un autre, plus particulièrement encore lorsqu'en absence de stade libre, les deux hôtes successifs doivent entrer en contact direct. C'est donc dans l'optique de favoriser la probabilité de ces contacts (ingestion, inoculation, contact de surface) que des modifications de comportement ou d'apparence de l'hôte sont nécessairement apparues. Certaines infections atteignent notamment le système nerveux de l'hôte, et le désorientent, entraînant parfois l'hôte vers le territoire de son prédateur, ou le rendant tout au moins plus facilement repérable (revue Hurd, 1990). Il existe d'autre part de nombreux exemples (revue Holmes et Brethel, 1972) d'hôtes invertébrés dont l'apparence change considérablement lorsqu'ils sont infectés. Un exemple souvent cité est celui décrit par Ulmer (1971) à propos des mollusques du genre *Succinea* infestés par *Leucochloridium paradoxum*. Dans ce cas, les parasites, qui se développent dans les escargots, envahissent leurs yeux pédonculés. Les tentacules, vivement colorées et vibrantes, finissent par ressembler à des chenilles comestibles. Cette transformation favorise la prédation par les oiseaux, et par conséquent la

transmission parasitaire. En effet, les parasites achèvent leur cycle de vie en pondant leurs oeufs dans les voies urinaires de l'oiseau qui mange l'escargot (Revue Rennie, 1992).

Dans le cadre de l'association *B. glabrata-S. mansoni*, des modifications de comportement ou d'apparence n'ont -à notre connaissance- jamais été décrites.

### III. Aspects immunologiques

L'intégration du couple hôte-parasite d'un point de vue immunitaire est primordiale à la fois pour le développement du parasite qui doit échapper aux mécanismes de défense de l'hôte, et ce pendant des périodes pouvant durer jusqu'à plusieurs années, mais aussi pour l'hôte dont la survie est directement liée à celle du parasite. Certains parasites s'installent chez leurs hôtes en choisissant un site privilégié, peu accessible aux moyens de défense de l'hôte. Il s'agit principalement de parasites intracellulaires comme les toxoplasmes, les trypanosomes ou les leishmanies, ou de parasites du cristallin. Les schistosomes par contre, comme l'ensemble des parasites, sont exposés au système immunitaire de l'hôte et utilisent donc plusieurs mécanismes pour échapper à sa réponse immune.

#### III.1. Mimétisme et déguisement moléculaires

L'existence de communautés antigéniques entre le parasite et son hôte peut résulter de deux phénomènes: d'une part le mimétisme moléculaire, où le parasite synthétise des déterminants semblables à ceux de l'hôte, puis les exprime à sa surface, et d'autre part le déguisement moléculaire, où le parasite adsorbe -de manière passive ou grâce à des récepteurs spécifiques- des déterminants de l'hôte à sa surface.

L'hypothèse de l'expression d'épitopes communs entre un parasite et son hôte, appelée "mimétisme moléculaire" par Damian en 1964, fut confirmée pour la

première fois par Capron dans le modèle *S. mansoni*. Il y a 30 ans, des techniques d'immunoélectrophorèse permettant l'analyse comparative d'extraits parasitaires et d'hôte invertébré ont abouti à l'identification d'une antigénicité croisée entre *S. mansoni* et *B. glabrata* (Capron et coll., 1965).

L'approfondissement de ces travaux par Dissous et coll. (1986-b/1987) et Grzych et coll. (1987) a débouché sur la caractérisation d'un épitope oligosaccharidique retrouvé à tous les stades du parasite mais aussi chez *B. glabrata* et dans l'hémocyanine d'un mollusque marin ancestral (600 millions d'années), *Megathura crenulata*, plus connu des immunologistes sous le nom de keyhole limpet hemocyanin (KLH). La signification de l'expression à la surface d'un parasite humain d'un épitope glycanique hautement conservé dans l'évolution reste encore mystérieuse. Cependant, comme cela a déjà été évoqué précédemment, on peut supposer que cette structure oligosaccharidique soit essentielle au schistosome pour son adaptation rapide aux variations de pression osmotique qu'il subit au cours des divers stades de son évolution (passage de la cercaire à l'hôte vertébré ou adaptation du miracidium à la vie aquatique).

De nombreuses équipes ont pu rapporter l'existence de communautés antigéniques entre *S. mansoni* et *B. glabrata*. Des analyses immunocytochimiques réalisées par Yoshino et Cheng (1978) ont montré une communauté antigénique entre la surface du miracidium et des macromolécules de l'hémolymphe de *B. glabrata*. Ces antigènes persistent lors de la transformation *in vitro* des miracidies en sporocystes (Yoshino et Bayne, 1983), et des anticorps dirigés contre les sporocystes sont capables de se fixer sur des hémocytes de *B. glabrata* (Bayne et Stephens, 1983). Plusieurs antigènes présents à la fois chez *B. glabrata* et *S. mansoni* ont été isolés et partiellement caractérisés (Rivera-Marrero et Hillyer, 1985), et un antigène de 53 kDa (SMw-53P) partiellement caractérisé chez *S. mansoni* adulte, présenterait des réactions immunologiques croisées avec *F. hepatica* et *B. glabrata* (Rasmussen et coll., 1985).

Plus récemment, Dissous et Capron (1989) ont montré que des anticorps dirigés contre un extrait protéique de *B. glabrata* reconnaissaient deux protéines (Sm 43 et Sm 39) de *S. mansoni* au stade miracidium. Des anticorps dirigés contre ces protéines ont révélé une molécule unique de 39 kDa (Bg39) dans les produits de traduction obtenus à partir de l'ARN messenger de *B. glabrata*. Des analyses ultrastructurales réalisées à l'aide d'anticorps anti-Sm39 sur des coupes de *S. mansoni* et de *B. glabrata* ont permis de localiser les protéines Sm39 et Bg39 au niveau musculaire, et le clonage moléculaire de la protéine de mollusque a montré qu'il s'agissait de la tropomyosine. Chez le miracidium, des expériences immunocytochimiques ont permis d'observer une association de la tropomyosine aux vésicules des crêtes épidermiques, composants destinés à former le futur tégument du sporocyste. Cette localisation permet d'envisager que cette molécule soit impliquée dans l'interaction miracidium et/ou sporocyste-mollusque. La séquence de la tropomyosine de *S. mansoni* (SmTM) publiée par Xu et coll. (1989) a pu être comparée à Bg39. Dissous et coll. (1990) observent un degré d'identité plus important entre *S. mansoni* et *B. glabrata* (65,1%) que celui existant entre trématodes et nématodes (60%). Ceci permet de penser que certaines protéines, hautement conservées au cours de l'évolution, auraient subi des pressions sélectives complémentaires pendant l'adaptation du parasite à son hôte. Weston et coll. (1993/1994) ont confirmé puis poursuivi l'ensemble de ce travail en clonant deux nouvelles tropomyosines: BgTMII chez le mollusque et SmTMII chez le schistosome qui correspond vraisemblablement à Sm43 préalablement décrite par Dissous et coll. (1989). En comparant les différentes tropomyosines entre elles, ils constatent une homologie plus importante entre BgTMII et SmTM (68,3%) qu'entre les deux tropomyosines de schistosomes (65,8%), ce qui renforce à nouveau l'implication de molécules communes dans l'interaction mollusque-schistosome.

Bien qu'il ait été souvent suggéré que ces différentes molécules communes entre le schistosome et le mollusque puissent jouer un rôle dans l'échappement du parasite vis-à-vis de la réponse immune de l'hôte, il est probable que la

communauté épitopique entre l'hôte et le parasite correspond plus à une convergence phylétique et à une adaptation vis-à-vis d'un même environnement qu'à une stratégie d'évasion de la part du parasite (Capron et Dessaint, 1992).

L'utilisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux a permis à Yoshino et Boswell (1986) de mettre en évidence le phénomène de déguisement moléculaire à différents stades de développement du parasite dans le mollusque. Cependant, l'hypothèse que ce phénomène puisse être utilisé comme stratégie d'évasion de la part du parasite n'a pas encore été confirmée, faute d'études concluantes jusqu'à présent. De nouvelles analyses plus sensibles utilisant les outils de la biologie moléculaire devraient permettre d'évaluer le degré d'homologie entre les épitopes portés à la surface du parasite et les déterminants de l'hôte (Van der Knaap et Loker, 1990).

### III.2. Hypothèse d'interférence entre le parasite et le mollusque

A côté des stratégies de mimétisme ou de déguisement moléculaire, l'hypothèse de l'interférence fait jouer au parasite un rôle plus agressif dans lequel le schistosome survit chez le mollusque en interférant avec son système de défense interne. Dans ce cas, l'adaptation mutuelle du parasite et de son hôte résulte de l'émission respective de signaux de communication cellulaire. D'un côté, le mollusque peut émettre des molécules qui seront utilisées par le parasite à son profit; de l'autre, le schistosome peut libérer certaines substances qui sont soit non identifiables par le mollusque, soit capables d'induire une modulation de la réponse immune de l'hôte.

#### III.2.1. Expression de molécules d'hôte

Plusieurs exemples semblent prouver que certains facteurs d'origine mollusque agissent en faveur du parasite, tant au niveau de la recherche, de

l'approche ou de l'attachement, que de la pénétration ou du développement du miracidium à l'intérieur du mollusque.

Certaines molécules, dont la nature chimique est encore très controversée, sont émises par les mollusques et exercent une action attractive vis-à-vis des miracidies (MacInnis, 1965/Mason, 1977). Parmi ces substances, un glycoconjugué de plus de 30 kDa interviendrait à la fois dans la reconnaissance, l'approche et l'attachement du miracidium à son hôte (Haas et coll., 1990). Après le contact, le comportement du miracidium dépendrait d'un autre glycoconjugué de masse moléculaire supérieure à 300 kDa. Les auteurs suggèrent que ces molécules "signal" -par leur grande taille-, permettraient aux parasites de trouver leur hôte, malgré la multitude de molécules plus petites, présentes en grandes quantités dans le biotope (souvent vaseux) des mollusques (Harbel et Haas, 1992).

Une autre glycoprotéine de 80 kDa identifiée et purifiée chez *B. glabrata*, joue un rôle dans le développement du schistosome. Des expériences de marquage métabolique avec la méthionine <sup>35</sup>S, réalisées sur les différents stades parasitaires ont révélé que ce facteur stimulerait spécifiquement la synthèse protéique chez les miracidies et qu'il pourrait être impliqué dans la première étape de transformation des miracidies en sporocystes (Dissous et coll., 1986-a). Plusieurs espèces de mollusques d'eau douce sont capables de stimuler plus ou moins efficacement *S. mansoni* au stade miracidium, mais on ne sait pas à l'heure actuelle si l'activation est due chez tous les mollusques au facteur de 80 kDa. Bien que cette étude devrait être complétée par l'utilisation d'autres espèces de miracidies, on peut d'ores et déjà penser que ce phénomène n'est pas restreint au couple *B. glabrata*-*S. mansoni* mais qu'il peut être généralisé à d'autres interactions mollusques-trématodes.

### III.2.2. Emission de molécules parasitaires impossibles à identifier par le mollusque.

En 1990, Van der Knaap et Loker ont proposé deux scénarii voisins, envisageables pour expliquer dans ce cas la stratégie d'évasion du parasite. Il se



pourrait par exemple que certains mollusques ne possèdent pas -au sein de leur système immunitaire- les molécules de reconnaissance spécifiques des épitopes synthétisés par le parasite. Dans ce cas, le parasite poursuit son installation et son développement à l'intérieur de l'hôte, qui comporte comme le suggère Schiff (1994), une certaine déficience au niveau de son système de défense interne. D'autre part, certains parasites produiraient un épitope unique reconnu par certains hôtes et pas par d'autres, ce qui leur permettrait de s'installer chez ces derniers sans être rejetés.

### III.2.3. Emission de molécules parasitaires capables d'entraîner une modulation des mécanismes immunitaires du mollusque

La première indication qu'une larve de trématode pouvait modifier la réponse du système de défense interne du mollusque fut apportée il y a presque une vingtaine d'années par Lie et coll. dans des modèles de double infection Echinostome-Schistosome chez *B. glabrata*. Les auteurs ont observé que la résistance de certaines souches de *B. glabrata* (10-R2) vis-à-vis de *S. mansoni* pouvait être remise en cause lorsque les mollusques étaient préalablement exposés à *E. paraensei* (Lie et coll., 1977-a/b), *E. lindoense* ou encore *E. liei* (Lie, 1982).

Le même type de résultat a pu être obtenu dans un modèle de double infection Schistosome-Schistosome. En effet, chez une souche de *B. glabrata* sélectionnée par Richards (1976) comme étant très susceptible vis-à-vis d'une souche (PR-1) de *S. mansoni* et absolument non permissive vis-à-vis d'une autre (Lc-1), on observe une susceptibilité partielle des mollusques pour la souche Lc-1 si une première infection a été réalisée quelques jours auparavant avec la souche PR-1 (Lie, 1982). Ces exemples montrent que les Echinostomes et les Schistosomes sont capables de diminuer la résistance de l'hôte, et l'on peut penser qu'il en est de même avec probablement toutes les espèces de trématodes (Lie, 1982).

Par la suite, des expériences réalisées *in vitro* par Loker et coll. (1986), ont permis de montrer que les hémocytes représentent manifestement la cible de cette interférence. Selon Lodes et coll., (1989), le parasite libérerait une variété de

produits d'excrétion-sécrétion (ES) immédiatement après la phase de pénétration du miracidium, lors de sa transformation en sporocyste primaire. Certains de ces produits affecteraient le système cellulaire de défense du mollusque, à savoir les hémocytes. En effet, dans les mollusques *B. glabrata* infectés par des miracidies d'*Echinostoma lindoense*, on observe non seulement une prolifération de l'organe hématopoiétique (hyperplasie), mais aussi des modifications à la fois morphologiques et fonctionnelles au niveau des hémocytes (Jeong et coll., 1983). Dans le modèle *B. glabrata* / *S. mansoni*, les travaux de plusieurs équipes ont d'ores et déjà permis de décrire une altération de la mobilité (Lodes et Yoshino, 1990), de la cytotoxicité (Loker et coll., 1986) et des capacités de phagocytose (Connors et Yoshino, 1990/Fryer et Bayne, 1990) des hémocytes infectés. La production d'ES par les sporocystes entraînerait cependant de nombreux autres effets. Kassim et Richards (1978) ainsi que Granath et Yoshino (1983), ont observé une modulation des activités lysosomiales; Yoshino et coll. ont aperçu une modification de la biosynthèse des protéines (Yoshino et Lodes, 1988) et ont détecté récemment au niveau du miracidium/sporocyste une activité cystéine protéasique, sécrétée de manière continue (Yoshino et coll., 1993). Enfin, Connors et coll. qui, de même que Shozawa et coll. (1989), avaient démontré la production d'anion superoxyde  $O_2^-$  par les hémocytes de *Bg* (Connors et Yoshino, 1990), ont récemment identifié dans les ES de *S. mansoni*, une molécule anti-oxydante capable de réduire ce métabolite toxique de l'oxygène (Connors et coll., 1991). Ce dernier exemple montre manifestement que l'interférence du parasite avec les activités de défense de l'hôte peut s'exprimer sous la forme d'une résistance aux composés toxiques, hypothèse avancée notamment par Bayne et Yoshino dès 1989.

Si les conséquence de l'interférence entre le schistosome et son hôte ont été clairement mises en évidence, la caractérisation des molécules impliquées et la compréhension des mécanismes mis en jeu ne sont pas encore très avancées.

Dans un travail récent, Lodes et coll. (1991) ont tenté de mettre en évidence des molécules parasitaires capables d'interférer avec les hémocytes de mollusque.

Deux protéines ont pu être isolées à partir d'ES de sporocystes de *S. mansoni* : H30 qui correspond à une fraction de haut poids moléculaire et PkI, obtenue à partir de H30, qui est composée de sous-unités d'environ 22-24 kDa. Les auteurs suggèrent que dans les mollusques susceptibles, les ES du parasite entraîneraient la liaison des lectines plasmatiques au niveau des hémocytes. Rappelons qu'habituellement ces molécules ne peuvent se lier à la surface des hémocytes qu'après avoir subi des modifications enzymatiques engendrées par leur fixation aux particules étrangères. Les hémocytes épargneraient alors le parasite car la fixation des lectines leur aurait fait perdre tout caractère offensif. L'interférence de ces ES (H30 et PkI) avec les hémocytes de mollusque pourrait se faire par le biais de deux polypeptides hémocytaires (19 et 46 kDa). Ceux-ci, normalement capables de se fixer sur les sporocystes primaires de *S. mansoni* ne seraient pratiquement plus synthétisés dans les souches de mollusques sensibles et/ou seraient bloqués par les ES parasites (Lodes et Yoshino, 1993). Il est à noter que d'autres chercheurs avaient déjà identifié des molécules capables de se fixer aux sporocystes, mais présentes uniquement chez les mollusques résistants, comme notamment la 50 kDa décrite par Bayne et coll. (1986) ou la 55 kDa rapportée plus récemment par Spray et Granath (1990).

Dans notre laboratoire, une protéine majeure de 20 kDa a été identifiée à la surface des hémocytes de *B. glabrata* infecté (Duclermortier, 1993). Cette molécule, absente des hémocytes sains, apparaîtrait dès le 14ème jour de l'infection, ce qui permet de supposer que le parasite est plus ou moins impliqué dans son apparition. Des expériences vont être entreprises pour savoir si cette molécule peut aussi se fixer sur les sporocystes ou leurs ES. D'autre part, une molécule de 66 kDa a été retrouvée uniquement à la surface des hémocytes de mollusques permissifs (Cousteau et Yoshino, 1994). Cette protéine, capable de fixer les ES de sporocyste, pourrait être responsable de l'immunosuppression observée chez les hôtes susceptibles.

Une étude approfondie visant à caractériser la nature des produits parasitaires mis en jeu a été initiée dans un modèle trématode-mollusque voisin du modèle *B. glabrata-S. mansoni*, le couple *Trichobilharzia ocellata-Lymnea stagnalis*. Des expériences réalisées *in vitro*, permettent de supposer que certains facteurs d'origine parasitaire puissent agir directement sur l'activité phagocytaire des hémocytes (De Jong-Brink, 1992-a). D'autres interviendraient plus indirectement, en entraînant une libération -par le mollusque- de neuropeptides, capables à leur tour d'agir spécifiquement sur l'activité des hémocytes. En effet, lors de l'infection de la lymnée par ce schistosome aviaire, la schistosomine, synthétisée dans le système nerveux central du mollusque, est libérée par les cellules productrices (LGCs pour Light Green Cells) sous l'induction du parasite (Hordijk et coll., 1991/Schallig et coll., 1991-a-b). L'apparition de ce neuropeptide dans l'hémolymphe de mollusques infectés coïncide avec le développement des cercaires à partir des sporocystes secondaires. Comme il n'y a aucun contact entre le parasite et le système nerveux du mollusque, les auteurs ont suggéré que la libération de la schistosomine était probablement causée par un facteur humoral provenant des cercaires (De Jong-Brink, 1992-b). Plusieurs études ont été entreprises pour déterminer l'origine et la nature de ce facteur. L'une d'entre elles a montré que seul un extrait méthanolique de cercaires contenait un facteur capable d'induire une libération de schistosomine *in vitro* (Schallig et coll., 1992). Les résultats obtenus récemment montrent que ce facteur n'est ni un ecdystéroïde, ni un stéroïde de type vertébré, un eicosanoïde ou encore un peptide. Il se pourrait que la libération *in vitro* de la schistosomine soit due à des acides aminés (revue De Jong-Brink, 1992-a).

Une étude semblable a été récemment envisagée dans notre laboratoire pour le couple *B. glabrata-S. mansoni* (Duvaux-Miret et coll., 1992-b). Divers neuropeptides tels que l'ACTH, l' $\alpha$ -MSH et la  $\beta$ -endorphine ont été retrouvés chez *B. glabrata* infesté. L'origine des neuropeptides détectés reste encore à déterminer. Ils peuvent être libérés par le système neuroendocrine du mollusque, par les

hémocytes ou encore par le parasite. En effet, ces 3 peptides opioïdes, dosés par RIA (radioimmunoassay), ont été retrouvés à différents stades parasitaires (cercaires, schistosomules, vers adultes, miracidies) (Duvaux-Miret et Capron, 1992). Cependant, même si l'origine parasitaire de ces peptides n'a pas encore été clairement prouvée, leur absence chez les mollusques contrôles (sains) laisse penser que *S. mansoni* est impliqué de façon plus ou moins directe dans l'apparition de ces molécules chez l'animal infesté.

Cet intérêt pour les neuropeptides qui participent directement ou indirectement à l'évasion immune du parasite est apparu avec la prise de conscience de l'existence d'un réseau neuroimmunologique chez les vertébrés (Smith et Blalock, 1988/Blalock, 1989) puis chez les invertébrés (Stefano, 1989). Initialement, les neuropeptides étaient considérés comme des molécules spécifiques du système nerveux, tandis que les cytokines étaient restreintes au système immunitaire. Le terme de réseau neuroimmunologique fait intervenir la notion d'échange bidirectionnel d'information; à savoir que des cytokines peuvent être produites dans le système nerveux et réguler des réponses neuroendocrines, et qu'inversement, des neuropeptides peuvent être libérés par des cellules immunitaires et avoir des propriétés immunomodulantes (Duvaux-Miret et coll., 1992-a).

Dans le cadre du réseau neuroimmunologique, nous avons voulu savoir si les cytokines étaient aussi impliquées dans la relation hôte-parasite. En effet, il est apparu que les cytokines étaient vraisemblablement des molécules ancestrales lorsque des similarités ont été trouvées entre certaines cytokines de vertébrés et des molécules d'invertébrés (Donnelly et coll., 1985/ Beck et Habicht, 1986/ Beck et coll., 1989/ Paemen et coll., 1992). De plus, la récente découverte chez des mollusques comme *Mytilus edulis*, *Planorbarius corneus* ou *Viviparus ater* de molécules apparentées aux cytokines (Hugues et coll., 1990/ Ottaviani et coll., 1993-

b/ Granath et coll., 1994) a suscité l'intérêt de notre équipe pour effectuer de telles recherches chez *B. gabrata*.

---

V

LES CYTOKINES  
D'INVERTEBRES

## I. Généralités sur les cytokines et leurs propriétés

Les cytokines sont des facteurs solubles qui jouent un rôle essentiel dans la communication entre les différentes cellules du système immunitaire. Le terme de cytokine regroupe en réalité un groupe hétérogène de molécules comprenant les interleukines (IL1 à IL12) également appelées lymphokines ou monokines selon les cellules qui les produisent, les interférons ( $\text{INF}\alpha, \beta, \gamma$ ), les TNF (tumor necrosis factor)  $\alpha$  et  $\beta$ , les CSF (colony stimulating factors), le TGF (transforming growth factor)  $\beta$ , et de nombreux facteurs de croissance tels que l'érythropoïétine, le NGF (nerve growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), le FGF (fibroblast growth factor) ou encore le PDGF (platelet derived growth factor).

Depuis la découverte des premières cytokines il y a une trentaine d'années, plusieurs facteurs ont été purifiés à partir de liquides biologiques et les techniques modernes de biologie moléculaire et de chimie des protéines ont aboutit au clonage et au séquençage de nombreuses cytokines. L'expression de ces gènes dans des bactéries ou des cellules eucaryotes a permis d'obtenir de grandes quantités de protéines recombinantes. Ces cytokines ainsi purifiées ont fait l'objet d'analyses physicochimiques et biologiques détaillées.

La plupart des cytokines sont des protéines de masse moléculaire inférieure à 80 kDa. Elles sont souvent composées de sous-unités dont la taille varie entre 10 et 20 kDa et qui sont reliées par un ou plusieurs ponts dissulfures. Bien que cela n'apparaisse pas indispensable pour l'activité biologique de la plupart d'entre elles, ces molécules sont souvent glycosylées. L'analyse de leur structure par cristallographie a parfois pu être réalisée, et permet de constater qu'elles contiennent un fort pourcentage (40-60%) de structures  $\alpha$  hélicoïdales.

A côté des quelques propriétés physicochimiques énumérées ci-dessus, un certain nombre de propriétés biologiques peuvent être également mentionnées. Les cytokines agissent la plupart du temps localement, de manière autocrine ou paracrine, et leurs effets endocrines (à distance) ne sont donc



qu'occasionnellement observés. Efficaces à très faible concentration, elles exercent leur action en se liant spécifiquement à un récepteur membranaire de surface, saturable et de haute affinité. Ces récepteurs sont en général des glycoprotéines de 50 à 200 kDa qui résultent parfois de l'association de 2 protéines (hétérodimères). Les étapes suivant la fixation au récepteur de surface sont mal connues, mais on observe dans certains cas un signal de transduction à travers la membrane et une modulation de l'expression de certains gènes cellulaires.

Qu'il s'agisse de conditions physiologiques ou pathologiques, les cytokines exercent des fonctions pléiotropiques concernant la différenciation, la maturation ou la prolifération des cellules. D'autre part, les cellules sont souvent capables de répondre à plusieurs signaux, qu'ils soient redondants, synergiques ou antagonistes. Les cytokines établissent donc un réseau de communication très complexe entre des cellules productrices et des cellules cibles, non seulement à l'intérieur du système immunitaire mais aussi au niveau du système hématopoiétique (revues Balkwill, 1988/ Trotta, 1991/ Gillis, 1991).

Plus récemment, il est apparu que des cytokines étaient également produites par le système nerveux (cellules gliales et neurones) et par certaines glandes endocrines, et qu'elles pourraient agir à distance à travers la circulation, à la manière des hormones (Rothwell, 1991). La notion de réseau neuroimmunologique décrite dans le chapitre précédent peut donc même être étendue au domaine de l'endocrinologie, et certains auteurs utilisent préférentiellement le terme de réseau neuroendocrinoimmunologique (Smith, 1992).

## II. Les cytokines d'invertébrés

Depuis déjà une dizaine d'années, plusieurs travaux ont démontré l'existence de molécules apparentées aux cytokines chez les invertébrés, suggérant ainsi que ces molécules pourraient avoir été conservées tout au long de l'évolution.

## II.1. Molécules apparentées à L'IL-1

A notre connaissance, la première étude décrivant une protéine dont les effets biologiques sur les cellules de mammifères ressemblent à ceux des lymphokines a été rapportée par Donnelly et coll. (1985) à la suite des travaux initiés par Prendergast (Prendergast et Suzuki, 1970/ Prendergast et coll., 1983). Les auteurs ont en effet isolé une protéine de 39 kDa à partir de coelomocytes de l'étoile de mer *Asterias forbesi* qui inhibe *in vivo* et *in vitro* l'expression des molécules d'histocompatibilité de classe II (Ia ) induites à la surface de macrophages murins par des lymphokines. Les coelomocytes sont des cellules phagocytaires semblables aux macrophages de vertébrés et les effets de ce SSF (sea star factor) sont comparables à ceux de l'IL1. En effet, cette cytokine, également appelée monokine est produite par les macrophages de mammifères. L'ensemble de ces observations permettait d'envisager que le SSF pourrait être un ancêtre de l'IL1 de vertébrés.

Beck et Habicht (1986) se sont également intéressés à l'étoile de mer. Ils ont trouvé une activité IL-1-like dans les coelomocytes et ont pu isoler et caractériser une molécule IL-1-like à partir du liquide coelomique. Cette molécule est capable d'engendrer -directement ou en présence de concentrations submitogéniques de concanavaline A- la prolifération de thymocytes murins. Elle stimulerait également la prolifération de fibroblastes et la synthèse de protéines fibroblastiques. D'autre part, son activité serait inhibée par un anticorps anti IL-1 humaine. Bien que la taille de cette molécule soit différente des IL-1 de vertébrés (29,5 kDa au lieu de 17 kDa), l'IL-1 de l'étoile de mer ressemblerait beaucoup aux IL-1 murine et humaine. On distingue effectivement 3 molécules différentes par leur pI (7,5/5,9/4,8) comme pour l'IL-1 humaine (7,2/6,0/5,4).

Une étude semblable a été menée chez les Prochordés. Beck et coll. (1989) détectent dans plusieurs espèces de tuniciers une activité IL-1-like qui correspond dans ce cas à une fraction de 20 kDa. Outre son activité dans les tests de prolifération thymocytaire, l'IL-1-like de tunicier entraînerait une augmentation de la

perméabilité vasculaire, fonction récemment attribuée à l'IL-1 humaine (Habicht et Beck, 1987). Chez les Prochordés, deux isoformes de pI 7,0 et 5,5 ont été identifiées (Beck et coll., 1990-b).

Le microséquençage de l'isoforme pI 7,5 de l'IL-1 d'échinoderme supposée correspondre à l'IL-1 $\beta$  humaine a permis de déterminer la séquence en AA de la partie N-terminale de la protéine. En comparant la séquence obtenue avec les IL-1 $\beta$  de vertébrés connues jusqu'à ce jour, on remarque la conservation de trois acides aminés (isoleucine en position 6, alanine en position 10 et lysine en position 11). La suite de cette séquence n'a à notre connaissance jamais été publiée. Pour des raisons techniques, les isoformes pI 5,4 et 4,8 n'ont pas pu être séquencées mais leur composition en acides aminés suggère qu'elles ressembleraient plutôt à d'autres cytokines de vertébrés (Beck et Habicht, 1991).

Si les résultats de Beck et coll. prouvent que les cytokine-like d'invertébrés sont capables d'agir sur des cellules de mammifères, réciproquement, les travaux de Raftos et coll. (1991-b) montrent qu'une interleukine de vertébré peut stimuler des cellules d'invertébré *in vitro*. Leurs expériences prouvent que l'IL-2 recombinante humaine entraîne une prolifération des cellules de tunicier. Ces auteurs ont également voulu tester *in vitro* l'effet des cytokine-like d'invertébrés dans un système homologue, et observent qu'une fraction IL-1-like de tunicier a un effet stimulateur sur des cellules de la même espèce (cellules lymphocyte-like et amœbocytes) (Raftos et coll., 1991-a).

D'autres expériences menées par les mêmes équipes montrent que les molécules IL-1-like favorisent l'activité phagocytaire des amœbocytes d'échinoderme et de tunicier, celle-ci étant bloquée par des anticorps anti-IL-1 de vertébré (Beck et coll., 1993/ Cooper et coll., 1994). L'IL-1 d'invertébré agirait également comme une opsonine: en effet, des érythrocytes ou des levures opsonisés par l'IL-1 sont rapidement ingérées par les amœbocytes. Enfin, les auteurs décrivent une libération d'IL-1-like par des hémocytes de tuniciers stimulés avec des particules de zymosan (Raftos et coll., 1992).

Des molécules apparentées à l'IL-1 ont été également recherchées chez les annélides. Une molécule IL-1-like d'environ 20 kDa a pu être isolée dans le coelome de *Nereis virens* (pI 7,4/5,2)(Beck et coll., 1990-a). D'autre part, l'utilisation de techniques d'immunodétection a permis de déceler récemment chez *Nereis diversicolor* l'existence d'une substance apparentée à l'IL-1 $\alpha$  humaine au niveau de certains coelomocytes et dans les cellules cérébrales (Paemen et coll., 1992).

Les mollusques ont également fait l'objet de nombreuses investigations. Les premiers travaux ont été entrepris sur la moule et montrent que ses immunocytes répondent *in vivo* et *in vitro* à l'IL-1, de la même façon que le feraient des granulocytes humains. D'autre part, l'hémolymphe et les hémocytes de *Mytilus edulis* de même que le tissu nerveux contiendraient une molécule apparentée à l'IL-1 (Hugues et coll.,1990/ Stefano et coll., 1991-a). Chez la limace *Incilaria fruhstorferi*, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL1 $\alpha$  a révélé la présence d'une molécule IL1-like dans l'hémolymphe et les hémocytes de cet invertébré (Furuta et coll., 1994). Chez les gastéropodes, les hémocytes de *Planorbarius corneus* et *Viviparus ater* possèdent des molécules IL-1-like (IL-1  $\alpha$  et  $\beta$ ) lorsqu'ils sont dotés d'une activité phagocytaire (Ottaviani et coll., 1993-b), et tout récemment, une activité IL-1 vient d'être découverte dans l'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata* (Granath et coll., 1994).

## II.2. Molécules apparentées à d'autres cytokines

En 1989, Beck et coll. suggèrent l'existence d'une activité IL-2 like chez les tuniciers, mais il ne s'agit que d'expériences préliminaires qui n'ont à notre connaissance pas encore été confirmées (Beck et coll., 1989-a-b).

Outre les IL-1  $\alpha$  et  $\beta$  précédemment citées, Ottaviani et coll. (1993-b) ont mis en évidence une variété de molécules cytokine-like (l'IL-2, l'IL-6 et le TNF $\alpha$ ) dans les hémocytes des gastéropodes *P. corneus* et *V. ater*.

Après l'IL-1, le TNF est la molécule la plus souvent retrouvée chez les invertébrés. Mis à part les gastropodes, elle a été détectée dans l'hémolymphe de

*Mytilus edulis* (Hugues et coll., 1990) et de *Incilaria fruhstorferi* (Furuta et coll., 1994). On la retrouve également chez les échinodermes et les annélides. En effet, Beck et coll. l'identifient comme une molécule d'environ 20 kDa chez *Asterias forbesi* (pI 5,2 /4) (1989-b) et chez *Lumbricus terrestris* ou *Nereis virens* (pI 7,4/5,8/5,4/4,8/5,2) (1990-b). Un travail récent suggère enfin qu'une autre annélide, le ver de terre *Eisenia foetida*, posséderait dans son coelome une activité TNF-like (Bilej et coll., 1994-a-b).

### III. Cytokines et relation hôte-parasite

Les parasites peuvent utiliser des molécules nécessaires à leur croissance ou à leur différenciation en détournant à leur profit certains messages (cytokines) émis lors de la réponse immune de l'hôte. La littérature fournit d'ailleurs quelques exemples qui illustrent cette stratégie (revue Denis et coll. 1991).

Dans le modèle d'infection par *Leishmania mexicana amazoniensis*, Mazingue et coll.(1989) ont pu observer que l'IL-2 était responsable de la croissance des promastigotes *in vitro*, mais aussi de l'exacerbation des lésions et de la prolifération parasitaire *in vivo*. Ces auteurs rapportent que le GM-CSF et l'IL3 se comportent également comme des facteurs de croissance pour diverses espèces de leishmanies. L'administration d'IL3 entraînerait une exacerbation des lésions cutanées dans la leishmaniose expérimentale murine due à *Leishmania major* (Feng et coll., 1988).

Une autre étude visant à savoir si les facteurs de croissance d'hôte pouvaient être impliqués dans la régulation de la croissance de certains parasites, a permis de mettre en évidence le rôle inducteur de l'EGF (epidermal growth factor) sur le protozoaire *Trypanosoma brucei* (Hide et coll., 1989).

D'autres travaux suggèrent que le TNF $\alpha$  pourrait inciter les macrophages à produire un facteur (peut-être l'IL1 ou l'IL6) capable de stimuler la croissance de *Trypanosoma muscli* (Kongshavn et Ghadirian, 1989).

Plus récemment, une équipe s'est intéressée au rôle du TGF $\beta$  dans l'infection par *Leishmania amazoniensis*. Les expériences réalisées montrent clairement que cette cytokine, induite lors de l'infection, contribue à la survie du parasite. En effet, le TGF $\beta$  agit sur les macrophages qui sont les cellules-hôte exclusives de ce parasite intracellulaire, en inhibant certaines de leurs fonctions (Barral-Netto et coll., 1992/ Barral et coll., 1993). Il convient de préciser que les activités immunosuppressives du TGF $\beta$  vis-à-vis des macrophages avait été déjà décrite dans les infections causées par *Trypanosoma cruzi* (Silva et coll., 1991).

Dernièrement, il a été démontré que l'Inf $\gamma$  stimulait directement la croissance du protozoaire *Trypanosoma brucei* (Bakhiet et coll., 1993). En réalité, le parasite contrôlerait lui-même l'émission de cette cytokine grâce à la libération d'un facteur, le TLTF qui active sélectivement les cellules T CD8 et stimule leur production d'Inf $\gamma$  mais aussi de TGF $\beta$  (Bakhiet et coll., 1993/ Olsson et coll., 1993).

Dans le modèle schistosome, certaines études ont tenté depuis plusieurs années, de mettre en évidence une influence immunologique de l'hôte sur l'excrétion d'oeufs de *S. mansoni* par des souris infestées (Doenhoff et coll., 1978). Récemment, plusieurs travaux ont permis de démontrer que la ponte des oeufs et la formation des granulomes étaient favorisées par le TNF $\alpha$  de l'hôte (Amiri et coll., 1992/Joseph et Boros, 1993). Le parasite utiliserait donc cette cytokine, par l'intermédiaire d'un récepteur approprié, non seulement pour se reproduire, mais aussi pour entourer les oeufs d'un granulome afin de protéger l'hôte des toxines libérées (Sher, 1992). Ces observations rendent compte de l'extraordinaire adaptation du parasite à son hôte, puisque le schistosome, assure sa survie tout en protégeant son hôte.

Tous ces exemples montrent que les cytokines de l'hôte peuvent agir en faveur du parasite. Ces molécules, certes non spécifiques, jouent donc un rôle particulier dans la relation du parasite avec son hôte vertébré. On peut alors légitimement se demander si de telles molécules -à supposer qu'elles existent-

pourraient avoir de l'importance dans un modèle d'association parasite-hôte invertébré comme dans le cas du schistosome et de son hôte intermédiaire.

## BUT DU TRAVAIL

Parallèlement aux vertébrés, la mise en évidence de cytokines chez les mollusques -qui n'en est qu'à ses balbutiements-, pourrait permettre d'élucider certains mécanismes immunologiques impliqués dans les interactions mollusque-trématode et plus particulièrement dans la schistosomiase causée par *S. mansoni*. La notion de conservation phylogénétique des cytokines mise en évidence par de nombreux auteurs nous a incité à rechercher la présence ces molécules chez *Biomphalaria glabrata*. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la recherche d'une molécule apparentée au TNF $\alpha$ .

Issu d'une molécule précurseur de 26 kDa, le TNF $\alpha$  mature est un polypeptide de 157 acides aminés (76 acides aminés de moins que la forme précurseur) et de masse moléculaire 17 350 Daltons. Son point isoélectrique est de 5,3 et sa forme native est un trimère. Sa structure tridimensionnelle -établie en 1989 (Jones et coll., 1989)- met en évidence pour chaque sous-unité, un motif habituellement retrouvé dans les protéines de capsides des virus de plante, dénommé "jelly-roll" ou gâteau roulé. Chez l'homme, le gène du TNF $\alpha$  est organisé en tandem avec le TNF $\beta$ , entre les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité III et I, sur le bras court du chromosome 6. Si les monocytes-macrophages activés sont classiquement considérés comme les cellules principalement impliquées dans la production du TNF $\alpha$ , de nombreuses autres cellules peuvent, sous l'action d'inducteurs appropriés, synthétiser du TNF $\alpha$ . Citons à titre d'exemple les lymphocytes du sang périphérique, les cellules NK et les fibroblastes. La remarquable variété des stimuli susceptibles de provoquer la sécrétion cellulaire de TNF $\alpha$  permet d'imaginer le rôle essentiel que joue cette cytokine dans les mécanismes de défense de l'organisme. Parmi les stimuli d'origine exogène, le LPS mais aussi certains virus et certains parasites (dont le schistosome) constituent des inducteurs très puissants. Quelques cytokines



(comme l'IL1 et l'INF) représentent d'excellents stimuli endogènes tandis que d'autres inhibent sa production. Ainsi, le TNF $\alpha$  se trouve au centre d'un véritable réseau de cytokines capables de moduler (induire ou inhiber) sa synthèse. Parmi toutes les cytokines, le TNF $\alpha$  est sans aucun doute la plus pléiotropique (Beutler et Cerami, 1992). En effet, cette molécule supporte de multiples activités biologiques si bien qu'il est difficile d'être exhaustif. Retenons cependant ses effets cytotoxiques responsables de la nécrose hémorragique de certaines tumeurs, ses effets inflammatoires au niveau local ou systémique ainsi que ses activités antivirales et antiparasitaires. Par l'étendue de son action, cette molécule revêt de nombreux intérêts cliniques, tant en cancérologie qu'au niveau infectieux et dans ces deux domaines, l'aspect thérapeutique du TNF $\alpha$  fait toujours l'objet d'intenses recherches.

Les raisons du choix de cette cytokine reposent tout d'abord sur le fait que cette molécule est très fortement conservée chez les mammifères, puisque l'homologie entre les différents TNF $\alpha$  séquencés (homme, souris, rat, lapin, porc, chat, chien, chèvre, ovin, bovin, cheval) est d'environ 70%, et d'autre part qu'elle vient d'être identifiée chez plusieurs mollusques. De plus, aucune recherche n'a -à notre connaissance- été entreprise sur une éventuelle molécule "TNF-like" chez *Biomphalaria glabrata*, tandis qu'une étude très récente réalisée par Granath et coll. (1994) vient de révéler la présence d'IL1. Enfin, de même que cette IL-1 intervient de différentes manières dans la relation entre le schistosome et son hôte vertébré, la découverte de la présence du TNF $\alpha$  chez *Biomphalaria glabrata* nous permettrait d'envisager son implication dans la relation trématode-mollusque.

# RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

## I. Détection chez *Biomphalaria glabrata* d'une immunoréactivité vis-à-vis du TNF alpha

Une immunoréactivité vis-à-vis du TNF $\alpha$  a tout d'abord été recherchée dans un extrait brut de mollusques entiers préparé en présence d'inhibiteurs de protéases (Aprotinine-PMSF). Le dosage radioimmunologique réalisé pour différentes dilutions de l'échantillon, a permis de quantifier cette immunoréactivité entre 24 et 260 fmol/ml. Pour s'assurer de la spécificité de l'immunoréactivité détectée dans l'extrait et identifier les espèces moléculaires réactives, un nouveau dosage a été réalisé sur les fractions obtenues après chromatographie de filtration en gel (G50). Les résultats de cette expérience sont présentés dans la Figure 11. Outre le pic de la fraction 9 correspondant à l'exclusion des espèces moléculaires de plus de 30 000 daltons, on distingue 3 pics d'immunoréactivité, dont un, majoritaire, est situé entre les fractions 12 et 14 et correspond au pic d'éluion de la ribonucléase A (13900 daltons). Les deux autres pics correspondent à des composants de plus petite taille. Cependant, une seconde expérience réalisée dans les mêmes conditions ne nous a pas permis de confirmer ces premières observations.

## II. Recherche d'une activité biologique TNF $\alpha$

Dans le but de confirmer les résultats préliminaires obtenus par dosage radioimmunologique, nous avons décidé de rechercher l'activité biologique du TNF $\alpha$  au moyen du test standard utilisant la lignée cellulaire L-929. Rappelons que ces cellules, habituellement résistantes au TNF, deviennent sensibles à l'action de celui-ci lorsqu'elles sont traitées par l'actinomycine D.

Détection d'une immunoréactivité vis-à-vis du TNF  $\alpha$  dans un extrait total de *B.glabrata* fractionné sur colonne G50

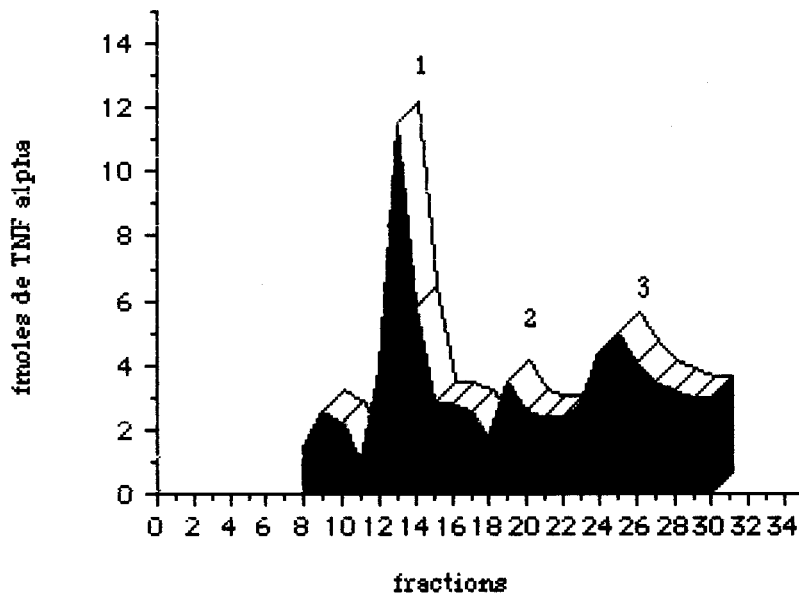


Figure 11

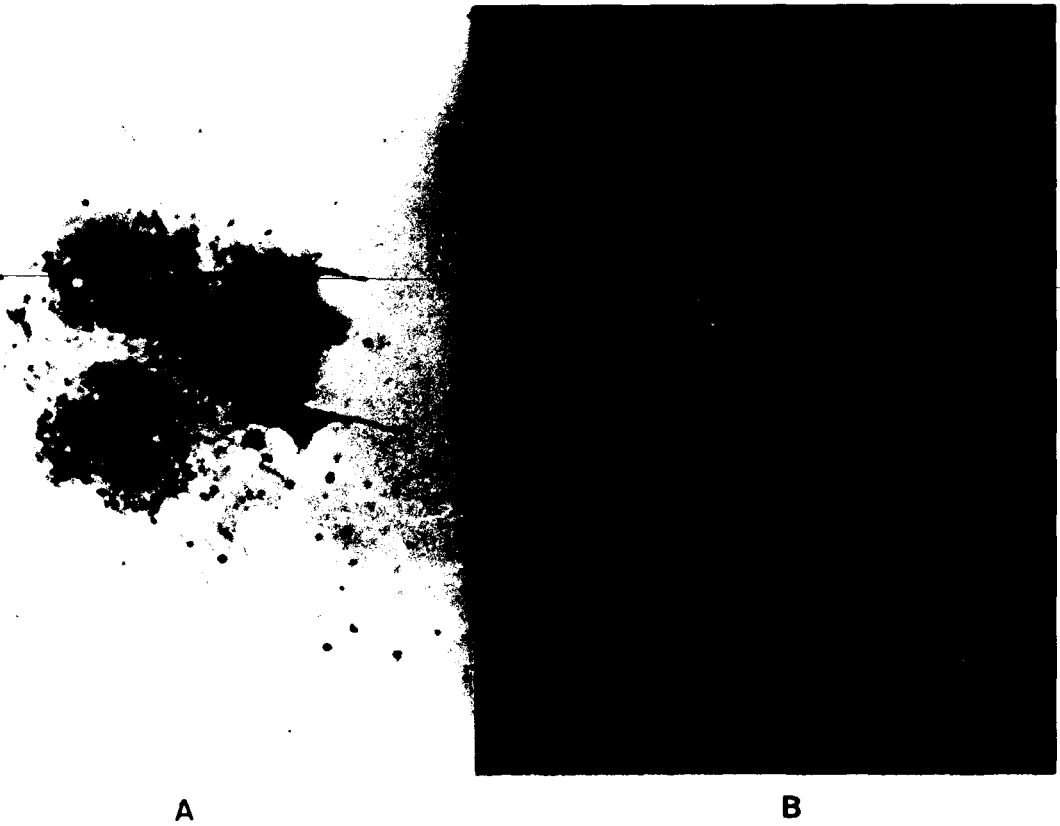
Plusieurs expériences ont été réalisées mais une seule a révélé l'existence d'une faible activité variant de 4 à 26 U/ml dans l'extrait brut de *B.glabrata*. Devant le manque de reproductibilité des dosages, la stabilité de l'extrait a été mise en cause. Cependant, des dosages de l'extrait réalisés parallèlement avec ou sans inhibiteurs de protéases (Aprotinine + PMSF) ont donné sensiblement les mêmes résultats. Pour éliminer l'hypothèse d'une dégradation protéolytique de la molécule au niveau de l'extrait, le TNF $\alpha$  humain recombinant ayant servi à réaliser la courbe standard a été dosé seul ou en présence de l'extrait. Les résultats obtenus ont été identiques dans les deux cas, confirmant ainsi l'incapacité de l'échantillon à dégrader le TNF.

Bien que l'activité biologique s'avérait difficile à mettre en évidence, les premiers résultats obtenus par dosage radioimmunologique permettaient de croire à l'existence d'une communauté épitopique avec le TNF $\alpha$ . Pour essayer de localiser cette immunoréactivité observée vis-à-vis des anticorps anti-TNF $\alpha$ , des expériences immunocytochimiques ont été entreprises.

### III. Immunodétection de molécules apparentées au TNF $\alpha$

Par marquage immunocytochimique d'hémocytes de *B.glabrata*, des molécules apparentées au TNF $\alpha$  ont été détectées à la fois dans les cellules adhérentes et les cellules rondes présentes dans l'hémolymphe. La Figure 12-A représente l'immunoréactivité visualisée dans une cellule adhérente par la technique d'immunoperoxydase. Cette immunoréactivité est préférentiellement localisée au niveau des granules de la cellule, alors qu'aucun marquage n'apparaît sur les lames contrôles. Ce résultat indique que l'activité de la peroxydase endogène a bien été bloquée par l'étape de préincubation en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et que la réaction est spécifique.

Immunodétection de molécules apparentées au TNF  $\alpha$



Marquage immunocytochimique d'hémocytes de *Biomphalaria glabrata* avec des anticorps polyclonaux dirigés contre le TNF $\alpha$  humain :

A : Technique d'immunoperoxydase / B : Technique d'immunofluorescence

Figure 12

La technique d'immunofluorescence, également appliquée aux hémocytes, a confirmé la présence et la localisation au niveau des granules, de molécules apparentées au TNF $\alpha$  (Figure 12-B).

Comme nous l'avons déjà mentionné, les hémocytes de mollusque constituent une population de cellules hétérogènes, comportant des cellules rondes (ou hyalinocytes) et des cellules adhérentes (ou granulocytes), et l'origine de ces deux types de cellules est encore aujourd'hui très controversée. Certaines équipes sont convaincues de l'existence de deux types cellulaires originellement différents. Pour l'équipe d'Ottaviani par exemple, les hyalinocytes seraient issus d'une lignée lymphocytaire tandis que les granulocytes appartiendraient à une lignée macrophagique (Ottaviani, 1983/ Ottaviani et Franchini, 1988). D'autres auteurs (Van Der Knaap et al, 1993) pensent au contraire que les hémocytes ronds et adhérents correspondent à différents stades de maturation d'une seule et même lignée cellulaire.

Nos résultats révélant un marquage positif au niveau des granules des cellules adhérentes de *B. glabrata*, confirment les récents travaux d'Ottaviani et coll. (1993) montrant la présence de molécules apparentées au TNF $\alpha$  dans les cellules adhérentes de deux autres mollusques, *Planorbarius corneus* et *Viviparus ater*. Si *Planorbarius corneus* possède dans son hémolymphe les deux types de cellules décrites ci-dessus, il n'en est pas de même pour *Viviparus ater* chez qui les auteurs ne retrouvent qu'une seule catégorie d'hémocytes, de type granulocytes. Dans ces deux espèces de gastéropodes, un marquage exclusif des cellules adhérentes a été observé alors que chez *B. glabrata*, une immunoréactivité -certes plus modérée- a été aussi détectée dans les cellules rondes. Cette observation nous paraît tout-à-fait vraisemblable puisque chez les vertébrés, le TNF $\alpha$  n'est pas seulement retrouvé dans les macrophages mais il est également produit par les lymphocytes (Rock et Lowry, 1991).

#### IV. Caractérisation des molécules apparentées au TNF $\alpha$

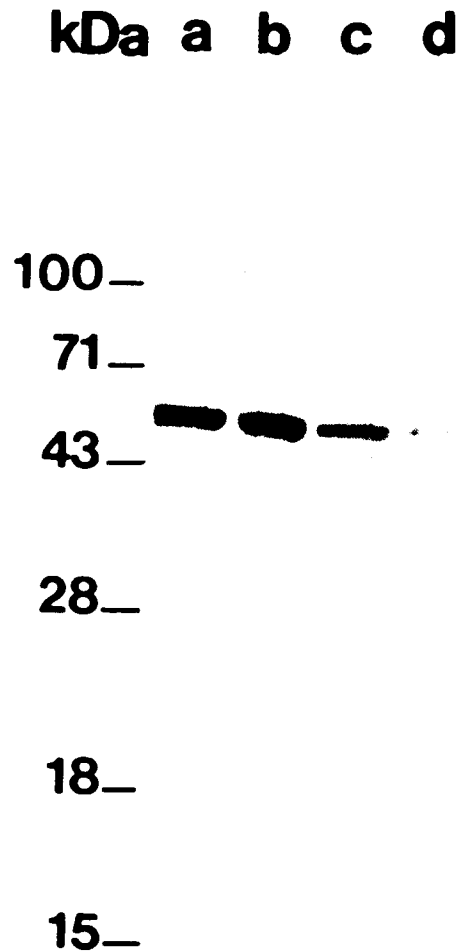
Afin d'identifier les molécules détectées en immunomarquage, des expériences de western blot ont été réalisées sur différents extraits de *B. glabrata*. Le résultat d'une expérience, présenté dans la Figure 13, indique que l'antisérum de lapin dirigé contre le TNF $\alpha$  humain reconnaît dans l'extrait d'hémocytes une bande majeure et spécifique de 53 kDa, ainsi qu'une bande plus faible ayant une taille supérieure (approximativement 120 kDa). Des extraits d'hémolymphe, de glande digestive et de mollusques entiers ont été également analysés. La bande de 53 kDa est détectée dans chaque extrait, tandis que celle de 120 kDa n'est retrouvée que dans l'hémolymphe. Les contrôles réalisés avec un sérum de lapin sain ont permis de confirmer la spécificité de reconnaissance entre les anticorps anti-TNF $\alpha$  et le composant de 53 kDa.

Les expériences de western blot révèlent que la taille du composant hémocytaire mis en évidence par immunocytochimie est bien plus importante que celle du TNF humain, qui rappelons-le est de 17 kDa. Sachant que la forme active du TNF $\alpha$  est un trimère, nous nous sommes donc demandés si la molécule mise en évidence pouvait correspondre à la forme multimérique du TNF $\alpha$  ( $3 \times 17 \text{ kDa} = 51 \text{ kDa}$ ). De nouvelles expériences de western blot réalisées dans des conditions réductrices ne se sont pas révélées être en faveur de cette hypothèse.

Plusieurs équipes ont déjà détecté chez les vertébrés des molécules apparentées au TNF $\alpha$  ayant une taille approximativement identique à celle que nous avons mise en évidence. En effet, les travaux de Liu et coll. (1987/1989) portant sur les lymphocytes T cytotoxiques murins ont révélé l'existence de cytotoxines cytosoliques et membranaires (50-60 kDa) immunologiquement apparentées au TNF $\alpha$ . D'autre part, Kinkhabwala et coll. (1990) ont mis en évidence des molécules apparentées au TNF $\alpha$  à la surface des lymphocytes T humains activés, et dont la taille varie de 50-60 à 70-80 kDa.



Identification par Western blot de molécules  
apparentées au TNF  $\alpha$



Identification de molécules apparentées au TNF $\alpha$  dans les hémocytes (a), l'hémolymphe (b), la glande digestive (c) et un extrait de mollusques entiers (d). L'analyse en Western blot de ces différentes fractions (50  $\mu$ g de protéines par piste) a été réalisée avec des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre le TNF $\alpha$  humain..

Figure 13

Enfin, de nouveaux exemples ont été apportés par des équipes travaillant sur le modèle de l'embryon de poulet. Gendron et coll. (1991) ont identifié une molécule TNF-like de 50 kDa dans le système nerveux du poulet au cours des derniers stades de son développement embryonnaire, tandis que Wride et Sanders viennent de décrire l'existence de deux protéines (50 et 70 kDa) retrouvées dans les différents feuilletts embryonnaires dès le stade gastrula (Wride et Sanders, 1993). Ces différents exemples nous confortent dans l'idée que l'immunoréactivité que nous venons de mettre en évidence grâce aux anticorps anti-TNF $\alpha$  humain n'est pas fortuite. Puisque l'hypothèse d'une forme multimérique du TNF $\alpha$  a été écartée, il faudrait aussi considérer l'éventualité que la molécule de 53 kDa puisse être un précurseur du TNF $\alpha$ .

Une molécule de 120 kDa a été mise en évidence dans l'extrait hémocytaire et dans l'hémolymphe, et il est intéressant de noter qu'une molécule de même taille a été également détectée par Wride et Sanders, dans l'embryon de poulet (Wride et Sanders, 1993). La spécificité de reconnaissance de cette molécule par les anticorps anti-TNF $\alpha$  devra cependant être confirmée.

La présence d'une immunoréactivité au niveau de la glande digestive du mollusque peut s'expliquer par le fait que cet organe comporte des hémocytes résidents. Rappelons ici que les hémocytes des gastéropodes peuvent indifféremment circuler librement dans l'hémolymphe ou s'établir au niveau des tissus adjacents, et ce de manière complètement réversible. Il est donc fort probable que les hémocytes soient responsables de l'immunoréactivité détectée dans la glande digestive. Cependant, les cellules digestives sont caractérisées par une activité phagocytaire intense, au même titre que certains hémocytes (Ottaviani et coll., 1990); il est donc également possible que ces cellules puissent elles-mêmes exprimer ce composant de 53 kDa. Cette éventualité devrait donc être envisagée.

Pour confirmer ces résultats, un marquage métabolique des hémocytes a été entrepris, suivi d'une immunoprécipitation par les anticorps anti-TNF $\alpha$ . D'autres immunoprécipitations utilisant des sérums ou anticorps contrôles ont été réalisées simultanément. Les résultats de cette expérience sont reportés dans la Figure 14.

L'analyse de l'autoradiogramme permet de déceler la présence de quatre bandes de 65, 50, 30 et 20 kDa reconnues par le sérum anti-TNF $\alpha$  (piste 1). Parmi celles-ci, la bande de 65 kDa est immunoprécipitée par tous les anticorps testés. D'autre part, la spécificité de la molécule de 30 kDa peut être discutée car elle est également reconnue par le sérum anti-Bg total (piste 3). La bande de 50 kDa est quant à elle immunoprécipitée à la fois par les anticorps anti-TNF $\alpha$  (piste 1) et anti-IL1 $\alpha$  (piste 4). Ce résultat nous paraît très intéressant, car il rejoint une hypothèse émise par Beck et coll. (1991), selon laquelle les molécules IL1 et TNF pourraient être issues d'une même structure ancestrale. Enfin, il est également intéressant de remarquer que le composant spécifiquement immunoprécipité par les anticorps anti-TNF $\alpha$  possède une taille d'environ 20 kDa, proche de celle du TNF $\alpha$  de vertébré.

## V. Quantification de l'immunoréactivité vis-à-vis du TNF $\alpha$

Deux tests différents pouvaient être utilisés pour quantifier l'immunoréactivité détectée vis-à-vis du TNF $\alpha$  dans les différents tissus du mollusque: le test radioimmunologique (RIA) ou l'ELISA.

Le test radioimmunologique, basé sur un principe d'inhibition, avait été utilisé lors de nos premiers travaux et nous avait donné des résultats peu reproductibles. Pour devenir plus fiable, de nombreuses mises au point auraient été nécessaires, rendant alors l'expérience globalement trop coûteuse.

Ce test a donc été abandonné au profit de l'ELISA, basé sur un principe de détection, mieux adapté à notre système, et semble t-il beaucoup plus fiable.

Immunoprécipitation des antigènes hématocytaires de *Biomphalaria glabrata* marqués à la 35S Méthionine



piste 1 : anticorps anti-TNF alpha  
piste 2 : sérum de lapin pré-immun  
piste 3 : sérum anti-Bg total  
piste 4 : anticorps anti-II.1 alpha  
piste 5 : anticorps anti-II.1 beta

Figure 14

Le test ELISA Quantikine kit (R&D systems) a donc été utilisé pour quantifier les molécules TNF $\alpha$  immunoréactives dans les différents tissus du mollusque. Ces dosages ont confirmé les précédentes expériences de western blot puisque des molécules immunologiquement apparentées au TNF $\alpha$  ont pu être détectées dans les différents extraits. Les résultats du dosage sont reportés dans le tableau de la Figure 15. Chez les animaux sains, la quantité de matériel immunoréactif vis-à-vis du TNF $\alpha$  a été évaluée à 61.5 pg/ml dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe. Hugues et coll. qui ont récemment découvert des composants TNF $\alpha$ -like chez *Mytilus edulis*, ont déterminé par la technique ELISA la concentration de ces molécules à 128 pg/ml dans l'hémolymphe (1990). Nos résultats sont compatibles avec ces derniers. Dans les hémocytes, la concentration est bien moins importante puisqu'elle n'est que de 12.6 pg/ml (équivalent d'hémolymphe). Ce résultat signifie que la majeure partie (83%) des molécules immunologiquement apparentées au TNF $\alpha$  se situe dans la fraction "sérique" de l'hémolymphe. Les dosages suivants, réalisés sur les extraits de glande digestive et de mollusque entier, ont permis de détecter des quantités plus faibles mais significatives de composants TNF $\alpha$  immunoréactifs (respectivement 1.4 et 2.3 pg/mg de protéines) (Figure 15).

Certains auteurs ont découvert depuis plusieurs années, les effets immunosuppresseurs des parasites vis-à-vis des mollusques. Dans le modèle trématode/mollusque, Lie (1982) définit l'hypothèse d'interférence comme étant la capacité du parasite à moduler le système de défense de l'hôte, afin d'assurer sa survie. Les travaux de Loker et coll. (1986) montrent que les hémocytes, premières cellules effectrices de l'hôte, sont les cibles de cette interférence.

D'ailleurs, de nombreux auteurs s'accordent à montrer que les parasites ou leurs produits d'excrétion peuvent altérer un grand nombre des fonctions de ces cellules, telles que la phagocytose (Van der Knaap et coll., 1987/ Fryer et Bayne, 1990), la cytotoxicité (Loker et coll., 1986), la mobilité (Lodes et Yoshino, 1990), l'adhérence (Noda et Loker, 1989), l'activité des enzymes lysosomiales (Kassim et Richards, 1978/

Analyse quantitative de l'immunoréactivité vis-à-vis du TNF  $\alpha$  dans les différents tissus du mollusque *Biomphalaria glabrata*

Quantités de molécules TNF $\alpha$  immunoréactives exprimées en pg

	Extraits	Mollusques sains	Mollusques infectés
A	Hémolymphe	61.5 +/- 16.9 (6)	40.1 +/- 15.2 (6)
	Culot d'Hémocytes	12.6 +/- 5.6 (3)	11.5 +/- 5.9 (3)
B	Mollusques entiers	2.3 +/- 2.0 (3)	4.2 +/- 2.2 (3)
	Glande digestive	1.4 +/- 1.3 (3)	3.3 +/- 0.5 (3)

Les tests ELISA ont été réalisés sur différents extraits de mollusques sains ou infectés depuis 28 jours par *S.mansoni*. Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre d'expériences réalisées dans chacun des cas. Les résultats (moyenne +/- déviation standard) sont exprimés en pg/ml équivalent d'hémolymphe (A) et en pg/mg d'extrait protéique(B). Des différences statistiquement significatives ont été observées entre mollusques sains et mollusques infectés dans les extraits d'hémolymphe ( $p < 0,01$ ) et de glande digestive ( $p < 0,05$ ).

Figure 15

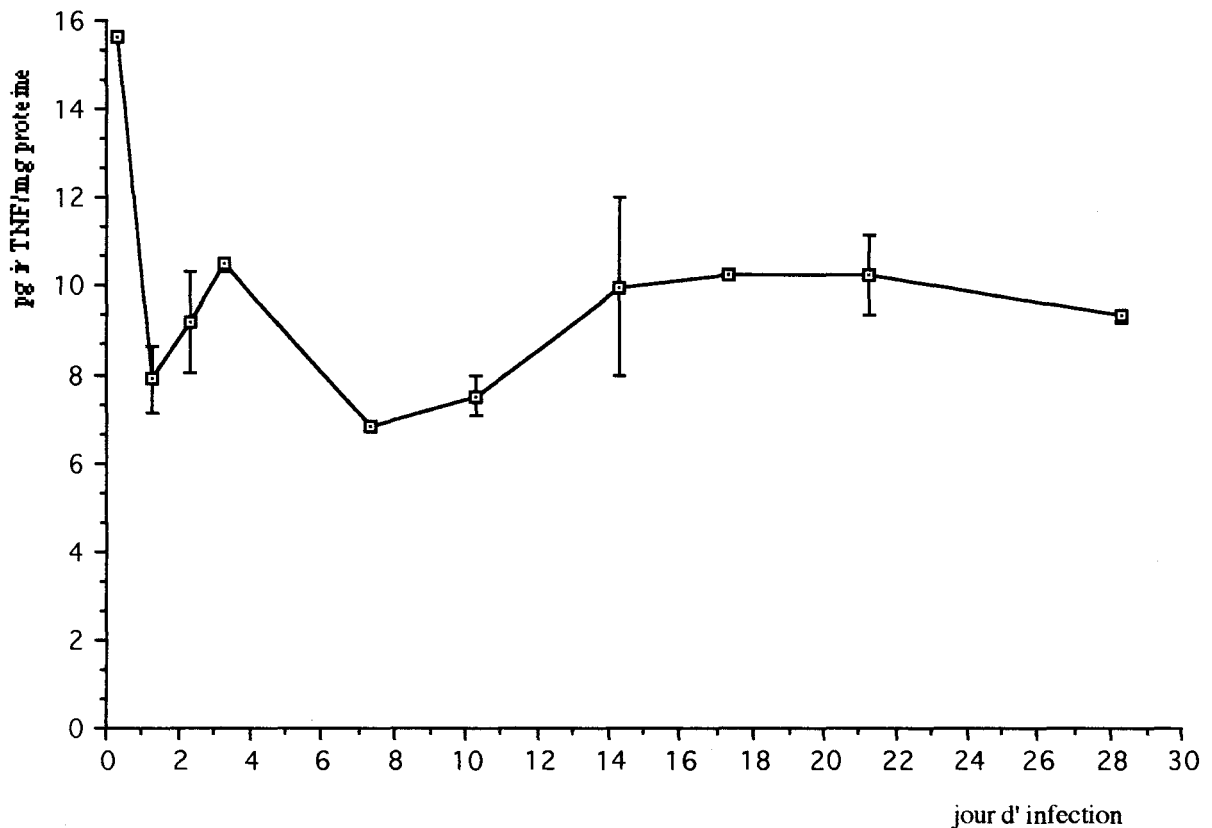
Granath et Yoshino, 1983), la formation d'ion superoxyde (Connors et Yoshino, 1990) ou encore les activités biosynthétiques (Yoshino et Lodes, 1988).

Convaincus de l'effet immunosuppresseur de l'infection parasitaire chez les mollusques, nous avons voulu savoir si l'expression des molécules immunoréactives vis-à-vis du  $\text{TNF}\alpha$  pouvait être modulée lors de l'infection de *B. glabrata* par *S.mansoni*. Les résultats présentés dans le tableau de la Figure 15 indiquent qu'une quantité significativement plus faible ( $p < 0.01$ ) de ces molécules est détectée dans la fraction "sérique" de l'hémolymphe des mollusques infectés depuis 28 jours (40.1 pg/ml) en comparaison à celle mesurée dans l'hémolymphe des mollusques sains. Par contre, aucune différence significative ( $p > 0.05$ ) n'a été décelée entre les hémocytes infectés (11.5 pg/ml) et les hémocytes normaux (12.6 pg/ml). Des numérations cellulaires ont été réalisées pour comparer la concentration des hémocytes circulant des mollusques infectés par rapport aux mollusques sains. Celle-ci augmente sensiblement puisque l'on compte  $510 \pm 142$  cellules / $\mu\text{l}$  dans l'hémolymphe de mollusque infecté contre seulement  $380 \pm 98$  cellules / $\mu\text{l}$  dans les contrôles. L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'infection parasitaire entraîne une inhibition partielle de la synthèse de molécules apparentées au  $\text{TNF}\alpha$  par ces cellules.

Pour approfondir nos recherches, nous avons décidé de doser les molécules  $\text{TNF}\alpha$  immunoréactives dans l'hémolymphe au cours de l'infection. Aux différents jours de l'infection, l'hémolymphe de 15 spécimens a été récoltée, et chaque pool a permis de réaliser deux déterminations en ELISA. Grâce à un dosage protéique préalable, les résultats sont exprimés en pg/mg de protéines afin de tenir compte des éventuelles dilutions de l'hémolymphe lors de son prélèvement.

Cette analyse cinétique, représentée sur la Figure 16, indique tout d'abord que la quantité de molécules  $\text{TNF}\alpha$  immunoréactives diminue très fortement (30-50%) 24 heures après le jour J de l'infection, c'est à dire consécutivement à la pénétration des miracidies dans les mollusques.

Analyse cinétique de l'expression des molécules TNF immunoréactives dans l'hémolymphe de mollusques infectés par *S.mansoni*.



Différents jours après l'infection, l'hémolymphe de 15 spécimens a été récoltée et chaque pool a permis de réaliser deux déterminations en ELISA. Les résultats (moyenne +/- déviation standard) sont exprimés en pg ir TNF $\alpha$ /mg de protéines pour tenir compte des dilutions éventuelles de l'hémolymphe lors de sa récolte. Dans ces expériences, une légère diminution des protéines totales (atteignant environ 12% à J 28) a été observée dans l'hémolymphe infectée.

Figure 16



Pendant les quatre semaines suivantes, période nécessaire à la maturation des parasites et à leur différenciation en cercaires, la concentration de ces molécules reste relativement faible. Elle ne retrouvera pas son taux initial, tout au moins jusqu'à la fin de cette période. Ces observations confirment donc nos précédents résultats, montrant que les hémocytes de mollusques infectés synthétisent les molécules apparentées au TNF $\alpha$  de façon moins active que les hémocytes de mollusques sains. Des expériences analogues viennent d'être entreprises par Granath et coll. vis-à-vis d'une molécule de *Biomphalaria glabrata* apparentée à l'IL1. Les auteurs observent également une diminution significative du taux d'"IL1-like" au niveau du plasma (fraction acellulaire de l'hémolymphe) des mollusques infectés par *S.mansoni* (Granath et coll., 1995). Sachant que ces deux molécules possèdent de multiples propriétés en commun chez les vertébrés (Chaplin et Hogquist, 1992), il est intéressant d'observer des effets similaires entre les molécules "TNF-like" et "IL1-like" de *Biomphalaria glabrata*. Ce résultat argumente favorablement l'hypothèse de Beck et coll. (1989-b) sur l'origine commune probable de ces deux cytokines.

La situation semble tout-à-fait différente au niveau de la glande digestive. En effet, comme nous le montre le tableau de la Figure 15, l'expression des molécules apparentées au TNF $\alpha$  apparaît significativement augmentée ( $p < 0.05$ ) dans l'organe infecté (3.3 pg/mg d'extrait protéique) par rapport à l'organe sain (1.4 pg/mg). Il est cependant important de préciser que cette augmentation est certainement sous évaluée, puisqu'après 28 jours d'infection, de multiples sporocystes filles et cercaires ont colonisé cet organe. Ces derniers participent en effet à la quantité totale de protéines mesurée.

L'ensemble de ces dosages montre donc que l'infection de *B.glabrata* par *S.mansoni* induit des effets opposés dans deux compartiments tissulaires distincts du mollusque: hémolymphe et glande digestive.

Ces effets contraires équilibrent globalement le taux des molécules immunologiquement apparentées au TNF $\alpha$  dans les mollusques sains et infectés. En

effet, nous constatons une absence de modification significative du taux de ces molécules lorsque nous comparons les extraits totaux de mollusques sains (2.3 pg/mg) et infectés (4.2 pg/mg) (Figure 15).

## VI. Discussion à cette étape du travail

La plupart des expériences biochimiques et biologiques que nous venons de décrire jusqu'à présent tend à démontrer l'existence d'une molécule apparentée au  $\text{TNF}\alpha$  chez le mollusque *Biomphalaria glabrata*. Cependant, lorsque nous comparons notre approche à celle des autres équipes s'intéressant depuis plusieurs années aux molécules "cytokines-like" d'invertébrés, force est de constater que l'activité biologique de notre molécule fait cruellement défaut. En effet, en ce qui concerne les molécules apparentées à l'IL1 par exemple, les auteurs ont recherché *in vitro* l'activité biologique de leur molécule dans des systèmes hétérologues (cytokine d'invertébré vis-à-vis de cellules de vertébrés) (Beck et Habicht, 1986/Habicht et Beck, 1987) ou homologues (cytokine d'invertébré vis-à-vis des cellules de l'invertébré) (Raftos et coll., 1991-a). Réciproquement, ils s'intéressent à l'action de cytokines de vertébrés sur des cellules d'invertébrés (Raftos et coll., 1991-b/Granath et coll., 1995). Dans le cas du  $\text{TNF}\alpha$ , les tests classiques utilisant les lignées L-929 ou 3LL constituent la première étape pour mettre en évidence l'activité biologique (Bilej et coll., 1994-a-b). D'autres équipes travaillent plutôt comme pour l'IL1, dans des systèmes hétérologues en observant les effets de la cytokine humaine recombinante sur des cellules d'invertébrés (Hugues et coll., 1990). En ce qui nous concerne, étant donné nos difficultés à détecter une activité biologique par le simple test "L-929" et le faible avancement de nos recherches à ce moment là, il semblait inutile d'entreprendre des dosages plus sophistiqués tels que ceux mentionnés ci-dessus.

Stefano et coll. (1991) ont démontré l'induction de substances IL1-like par les hémocytes de *M. edulis*, en réponse à l'action d'opioïdes. Les dosages en ELISA révèlent une stimulation d'un facteur 5 à 10 par la DAMA ([D-Ala<sup>2</sup>, D-Met<sup>5</sup>] enkephalinamide). D'autre part, Raftos et coll. (1992) qui s'intéressent aux hémocytes de tuniciers, ont décrit une libération de molécules IL1-like qualitativement plus importante lorsque ces cellules sont stimulées avec du zymosan. Cette constatation est à mettre en relation avec les capacités de phagocytose des hémocytes d'invertébrés. Ces observations, tant originales que séduisantes, nous ont incité à mettre au point des expériences analogues dans notre propre modèle. En effet, sachant que l'IL1 et le TNF $\alpha$  sont toutes deux des cytokines issues de la lignée macrophagique et qu'elles ont un grand nombre d'effets biologiques similaires (Rosenblum et Donato, 1989), nous avons voulu rechercher l'effet des opioïdes et/ou du zymosan sur la production de molécules immunologiquement apparentées au TNF $\alpha$  dans l'hémolymphe de *B. glabrata*, tout en espérant obtenir le même type de résultat que ces équipes. Les premiers tests ELISA tendent à montrer que la production de ces molécules est doublée par la DAMA, et que l'effet des particules de zymosan entrainerait une stimulation d'un facteur 3 ou 4. Ces résultats, bien que très encourageants, sont cependant trop préliminaires pour être présentés ici et les expériences mériteraient d'être reproduites.

Il est important d'apporter quelques autres précisions à notre discussion. Les tests RIA et ELISA ont été réalisés à l'aide de "kits" commercialisés, par conséquent on ne peut pas être absolument certains que les anticorps anti-TNF $\alpha$  utilisés dans ces dosages sont exactement les mêmes que ceux qui nous ont permis de réaliser les expériences d'immunocytochimie et de western blot. Cependant, cette remarque ne remet pas en cause la spécificité des résultats présentés jusqu'ici puisque des contrôles internes ont été réalisés pour chaque expérience. D'autre part, le fait que les protéines mises en évidence dans ce travail soient spécifiquement reconnues par différents anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$ , permet d'affirmer que chacune

d'entre elles comporte au moins un épitope en commun avec le TNF $\alpha$ , et que nos résultats ne sont pas dûs à la présence d'épitopes identiques sur des molécules non apparentées. D'autre part, rappelons à ce sujet que d'autres équipes ont mis en évidence des molécules apparentées au TNF $\alpha$  ayant approximativement la même taille que le composant de 53 kDa (Liu et coll., 1987-1989/ Kinkhabwala et coll., 1990/ Gendron et coll. 1991/ Wride et Sanders, 1993).

L'ensemble des expériences réalisées jusqu'à présent nous ayant convaincu de l'existence chez *Bg* de molécules TNF $\alpha$  immunoréactives, nous avons décidé d'approfondir nos recherches spécifiquement vis-à-vis de la molécule de 53 kDa, et de rechercher le message et le gène codant pour cette molécule. Ces perspectives ont fait l'objet de la deuxième partie de notre travail.

## VII. Recherche de séquences nucléotidiques homologues à celle du TNF $\alpha$ humain

### VII. 1. Séquence ARN

Différents northern blots ont été réalisés à partir de la faible quantité d'ARN total d'hémocyte dont nous disposions, d'ARN total de glande digestive, et d'ARN total ou [poly A<sup>+</sup>] de mollusque entier, en utilisant comme sonde la séquence cDNA codant pour le TNF $\alpha$  humain et préparée à partir d'un plasmide aimablement fourni par P. Vassali. La Figure 17 représente ce plasmide (PRS-1) contenant l'insert TNF $\alpha$  entre les sites de restriction Pst1 et EcoR1. Pour localiser précisément la séquence du TNF $\alpha$  au niveau de l'insert, ce dernier a été sous cloné dans le phage M13, puis séquencé. La séquence, représentée sur la Figure 18, indique que l'insert code pour les aminoacides 57 à 157 du TNF $\alpha$ , ce qui représente les 2/3 de la molécule du côté C-terminal. L'analyse détaillée de la séquence permet de repérer après le codon STOP, une trentaine de nucléotides irrelevantes.



Séquence de l'insert TNF $\alpha$  sous cloné dans le phage M13 et déduction de sa séquence en acides aminés

CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	TGC	CCC
L	I	Y	S	Q	V	L	F	K	G	Q	G	C	P
57													
TCC	ACC	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	GCC
S	T	H	V	L	L	T	H	T	I	S	R	I	A
GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	AAG	GTC	AAC	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG
V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	S	A	I	K
AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	ACC	CCA	GAG	GGG	GCT	GAG	GCC	AAG
S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	E	A	K
CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	CTG	GGA	GGG	GTC	TTC	CAG	CTG
P	W	T	E	P	I	Y	L	G	G	V	F	Q	L
GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	GAG	ATC	AAT	CGG	CCC	GAC
E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	P	D
TAT	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT	GGG	ATC
T	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	T	F	G	I
ATT	GCC	CTG	<u>TGA</u>	GTCG	<u>AAGCTI</u>	GGGG	ACCCTAGAGGTCTTTTTTTTATTTT						
I	A	L	Stop		Hind III								
157													
vecteur M13 mp 18													
EcoR1													

L'insert code pour les acides aminés 57 à 157 du TNF $\alpha$ , ce qui représente les 2/3 de la molécule du côté C-terminal. Un site de restriction Hind III (encadré) est situé après le codon Stop, dans la séquence nucléotidique irrelevante. Plus en aval se trouve le site EcoR1 (encadré) du vecteur M13 mp18.

Figure 18

Pour éviter des hybridations non spécifiques, ceux-ci ont été otés de la séquence par coupure au niveau du site de restriction HindIII (Figure 18). L'hybridation des northern blots avec l'insert marqué au  $^{32}\text{P}$  n'a malheureusement abouti à la détection d'aucun signal.

## VII.2. Séquences ADN

La séquence TNF $\alpha$  humain a été également utilisée vainement dans des expériences de dot blots et de Southern blots. Ces différents échecs nous permettent de supposer que les conditions d'hybridation choisies pour ces expériences doivent être remises en cause. Des mises au point devront être également envisagées pour les solutions de lavage afin de déterminer les meilleures conditions de stringence. Il est probable que les protocoles que nous avons utilisés ne sont pas suffisamment bien adaptés au système hétérologue (ARN ou ADN d'invertébré/ sonde TNF $\alpha$  humaine) dans lequel nous travaillons. Lorsque nous avons voulu réaliser un criblage de la banque cDNA de *B. glabrata* avec l'insert TNF $\alpha$ , nous avons rencontré les mêmes difficultés puisque sur les 150 000 recombinants analysés, aucun clone positif n'a pu être détecté. De même, les expériences d'amplification utilisant comme amorces des séquences conservées du TNF $\alpha$  de vertébré ont été infructueuses. Toutes ces données semblaient indiquer que le niveau de conservation du gène TNF $\alpha$  dans l'évolution était relativement faible et que la molécule de 53 kDa immunologiquement apparentée au TNF $\alpha$  était vraisemblablement très différente du TNF $\alpha$  humain. Nous avons donc décidé d'adopter une autre stratégie, celle de cribler la banque d'expression de *B. glabrata* avec les anticorps anti-TNF $\alpha$  reconnaissant la molécule de 53 kDa en western blot.

## VIII. Criblage de la banque cDNA d'expression par les anticorps anti-TNF $\alpha$

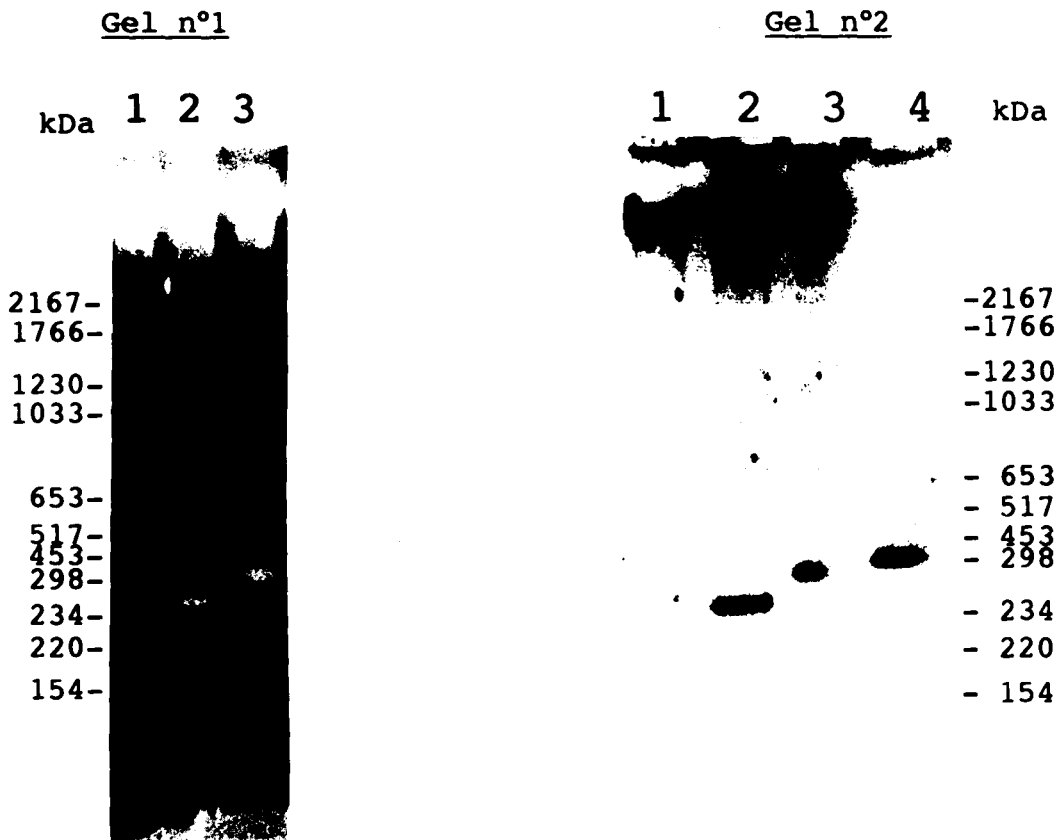
Nous avons voulu contrôler dans un premier temps la qualité d'expression de la banque *B.glabrata* construite en  $\lambda$ gt11 (Dissous et coll., 1990), à l'aide d'un sérum anti-*Bg* total, puis d'un sérum anti-hémocytes de *Bg*. Environ 25 000 recombinants ont été criblés par chaque antiserum. Avec les anticorps anti-*Bg* total, 5 à 10% des clones ont été révélés positivement, tandis qu'1 à 2 clones par filtre (0.03%) étaient reconnus par des anticorps anti-hémocytes. Ces résultats nous paraissent cohérents étant donné la faible proportion des hémocytes par rapport à l'ensemble des cellules d'un mollusque entier.

Le criblage de 800 000 plages de lyse avec le sérum anti-TNF $\alpha$  a conduit à l'isolement de deux clones OB5 et OB14, qui, après digestion par EcoR1, présentent respectivement des inserts d'environ 250 et 300 pb (Figure 19).

De manière à savoir si les séquences OB5 et OB14 présentaient des homologies entre elles, nous avons réalisé des hybridations croisées. Les inserts des clones OB14 et OB5 ont été amplifiés par PCR, marqués au  $^{32}\text{P}$ , puis mis au contact respectivement des Southern blots S1 et S2 contenant chacun l'ADN des clones OB5 et OB14 (Figure 20). L'ADN d'un clone irrelevant a été utilisé sur chacun des blots comme contrôle négatif, tandis que sur S2, la sonde elle-même -c'est-à-dire le fragment OB5 amplifié par PCR- a servi de contrôle positif. La taille légèrement supérieure de l'insert PCR par rapport au fragment OB5 initial correspond aux amorces PCR situées de part et d'autre de l'insert. Ainsi, l'insert PCR a une taille d'environ 50 pb (2 x 24 pb) de plus que l'insert du clone OB5. Après exposition des autoradiogrammes pendant une nuit à -20°C, nous avons observé que sur S1 la sonde OB14 n'hybridait pas le fragment OB5 et que réciproquement la sonde OB5 n'hybridait pas le fragment OB14 sur S2. Ces résultats prouvaient ainsi qu'OB5 et OB14 étaient bien des clones distincts.



Analyse des clones OB5 et OB14 après digestion par EcoR1:  
Détermination de la taille des inserts



Gel n°1

piste 1 : clone irrelevant  
piste 2 : clone OB5  
piste 3 : clone OB14

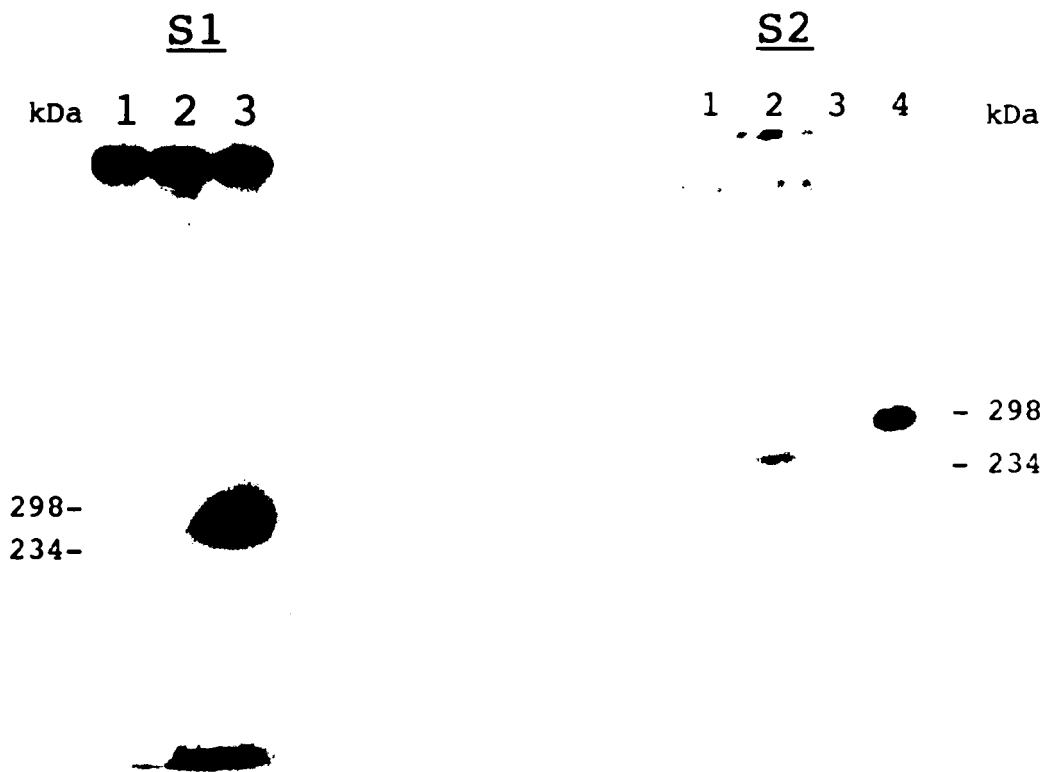
Gel n°2

piste 1 : clone irrelevant  
piste 2 : clone OB5  
piste 3 : clone OB14  
piste 4 : insert du clone OB5 amplifié par PCR

Les gels 1 et 2 ont servi à réaliser respectivement les Southern blots de la figure 20.

Figure 19

**Recherche d'homologies entre les inserts des clones OB5 et OB14  
par des hybridations croisées**



S1

piste 1 : clone irrelevant  
piste 2 : clone OB5  
piste 3 : clone OB14

S2

piste 1 : clone irrelevant  
piste 2 : clone OB5  
piste 3 : clone OB14  
piste 4 : insert du clone OB5 amplifié par PCR

Les Southern blots 1 et 2 proviennent respectivement des gels 1 et 2 présentes dans la figure 19.

**Figure 20**

## IX. Séquençage de l'ADNc des clones OB5 et OB14

Plutôt que la technique de séquençage classique préconisant le sous-clonage en M13 de l'insert purifié, nous avons préféré utiliser la technique du "TA cloning", qui permet d'intégrer facilement des fragments amplifiés par PCR. Cette technique a été menée en parallèle pour les deux clones.

Après purification des inserts sur colonne "Magic prep" et sous-clonage dans le vecteur PCR<sup>TM</sup> II, nous avons pu déterminer les séquences OB5 et OB14.

La séquence de l'ADNc et la séquence protéique correspondante d'OB5 et d'OB14 sont représentées respectivement dans les Figures 21 et 22.

Les séquences des deux clones correspondent chacune à un cadre de lecture ouvert sans interruption; ainsi, OB5 contient un fragment de 270 pb codant pour 90 aminoacides, tandis que les 327 pb d'OB14 codent pour 109 aminoacides.

## X. Recherches d'homologies

Les comparaisons des séquences en acides aminés des protéines OB5 et OB14 avec les banques de données (DNASTAR), n'ont révélé aucune homologie particulière.

Les protéines OB5 et OB14, ayant été reconnues par des anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$ , doivent comporter au moins un épitope en commun avec cette cytokine. Pour essayer de mettre en évidence cet épitope commun, nous avons utilisé le programme informatique "Amino Acid Align" (AANW version 1.68) permettant de comparer deux séquences protéiques en les alignant l'une avec l'autre. Nous avons donc entrepris de comparer chacune des 2 protéines avec le TNF $\alpha$  humain. Ces comparaisons sont présentées sur la Figure 23.

Séquence d'ADNc du clone OB5 et séquence protéique correspondante

1	GGG	ACT	GAA	TCA	TTA	GAT	CAA	AAT	GTG	TCA	TCC	CAG	ATT	TCA
1	G	T	E	S	L	D	Q	N	V	S	S	Q	I	S
43	AAT	CCA	GCT	AGT	GAA	AAC	AGT	ATC	TCT	TCA	CAG	CCT	AGT	CCA
15	N	P	A	S	E	N	S	I	S	S	Q	P	S	P
85	ACT	ACA	GAT	GGC	ATT	ACT	GCT	CCT	ATA	TCA	GCT	CAA	AGC	ACA
29	T	T	D	G	I	T	A	P	I	S	A	Q	S	T
127	GAA	GCT	GTT	CAT	GGA	TCT	CAG	TAC	ACT	GAC	TCT	TAT	CAA	CAG
43	E	A	V	H	G	S	Q	Y	T	D	S	Y	Q	Q
169	AAT	TTT	TTT	CAA	ACT	GGT	GAA	GAT	GAT	AAC	TCA	ATG	GTT	GAT
57	N	F	F	Q	T	G	E	D	D	N	S	M	V	D
211	GAA	TCT	GAG	GAA	AGG	GAT	ATA	AAA	CCT	TCA	ATA	GAT	ACT	GAT
71	E	S	E	E	R	D	I	K	P	S	I	D	T	D
253	GTA	ACT	TTT	ATA	AAA	GAG	270							
85	V	T	F	I	K	E	90							

Figure 21

Séquence d'ADNc du clone OB14 et séquence protéique correspondante

1	CCA	GCC	GTC	CCA	TTC	TAT	GGG	ACA	TGC	CAA	GCC	TTT	ATC	AGC
1	P	A	V	P	F	Y	G	T	C	Q	A	F	I	S
43	CAG	TAC	GGC	GCT	GTG	AAC	TGC	TAC	TCA	TCT	CCA	ATC	AAT	GAA
15	Q	Y	G	A	V	N	C	Y	S	S	P	I	N	E
85	TCC	TGC	TGC	AGC	ACG	TGC	AAG	TCC	TAC	AAT	AAC	GGA	AGA	GTT
29	S	C	C	S	T	C	K	S	Y	N	N	G	R	V
127	GGC	TGT	GAA	TAT	GGT	GAC	CGA	TCC	TTA	GAC	TGT	GTG	AAG	TAC
43	G	C	E	Y	G	D	R	S	L	D	C	V	K	Y
169	ACC	AAG	GCT	GCC	ATA	TGC	CCC	ACA	TAT	AAG	AAC	ACT	CTT	TGC
57	T	K	A	A	I	C	P	T	Y	K	N	T	L	C
211	TGC	GGA	TAT	TGC	TAT	AAC	TAC	GTC	GGC	AAG	AGA	TCC	CCA	TCG
71	C	G	Y	C	Y	N	Y	V	G	K	R	S	P	S
253	GAT	GAG	CCA	GTT	CCC	AAG	TTA	AAC	ATC	ACT	CTT	CCA	AAG	ATA
85	D	E	P	V	P	K	L	N	I	T	L	P	K	I
295	ATA	GGT	CAG	GAG	CCT	GAC	ATC	ATG	CCC	TTT	GAA	327		
99	I	G	Q	E	P	D	I	M	P	F	E	109		

Figure 22



Pour OB5, on distingue 3 zones d'homologies, correspondant aux régions 10-25, 59-68 et 81-96 du TNF $\alpha$ . Dans ces zones où l'homologie varie de 60 à 80%, 30 à 40% des résidus sont strictement conservés. Des analyses semblables ont été menées pour OB14. Dans ce cas, nous n'avons remarqué qu'une seule région où la séquence protéique s'aligne avec le TNF $\alpha$ . Il est intéressant de remarquer que cette région, située entre les AA 5 et 26 du TNF $\alpha$ , enregistre les mêmes scores d'homologie (80%) et d'identité (39%) que la protéine OB5.

L'alignement des séquences OB5 et HUTNFA a été également réalisé à l'aide du programme "Lipman-Pearson Protein Alignment" (Figure 24). Dans cette analyse, on distingue aussi 3 zones (correspondant aux régions 1-26, 33-47 et 59-98 du TNF $\alpha$ ) présentant 71% à 87% d'homologie. Ces valeurs sont tout à fait cohérentes avec notre première analyse où le score variait entre 60 et 80%. Granath et coll. ont réalisé des études semblables avec la séquence partielle d'une molécule de *Bg* biologiquement et immunologiquement apparentée à l'IL1. Les résultats préliminaires montrent une similarité de 88% entre la séquence du mollusque et l'IL1 $\beta$  humaine (Granath et coll., 1995). Les valeurs élevées trouvées par Granath et coll. et nous-mêmes peuvent être justifiées par le fait que l'IL1 et le TNF $\alpha$  font partie des cytokines les plus conservées au cours de l'évolution. Chez l'homme, les séquences de ces deux molécules ne comportent pas d'homologies (Rosenblum et Donato, 1989), cependant, nous avons déjà mentionné l'hypothèse de Beck et coll. (1991) selon laquelle l'IL1 et le TNF pourraient être issues d'une même structure ancestrale. Par conséquent, et afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de rechercher l'existence d'une homologie éventuelle entre les molécules apparentées à l'IL1 et au TNF chez le mollusque *Biomphalaria glabrata*. Ceci pourra être envisagé dès que les séquences complètes des différentes molécules auront été obtenues.



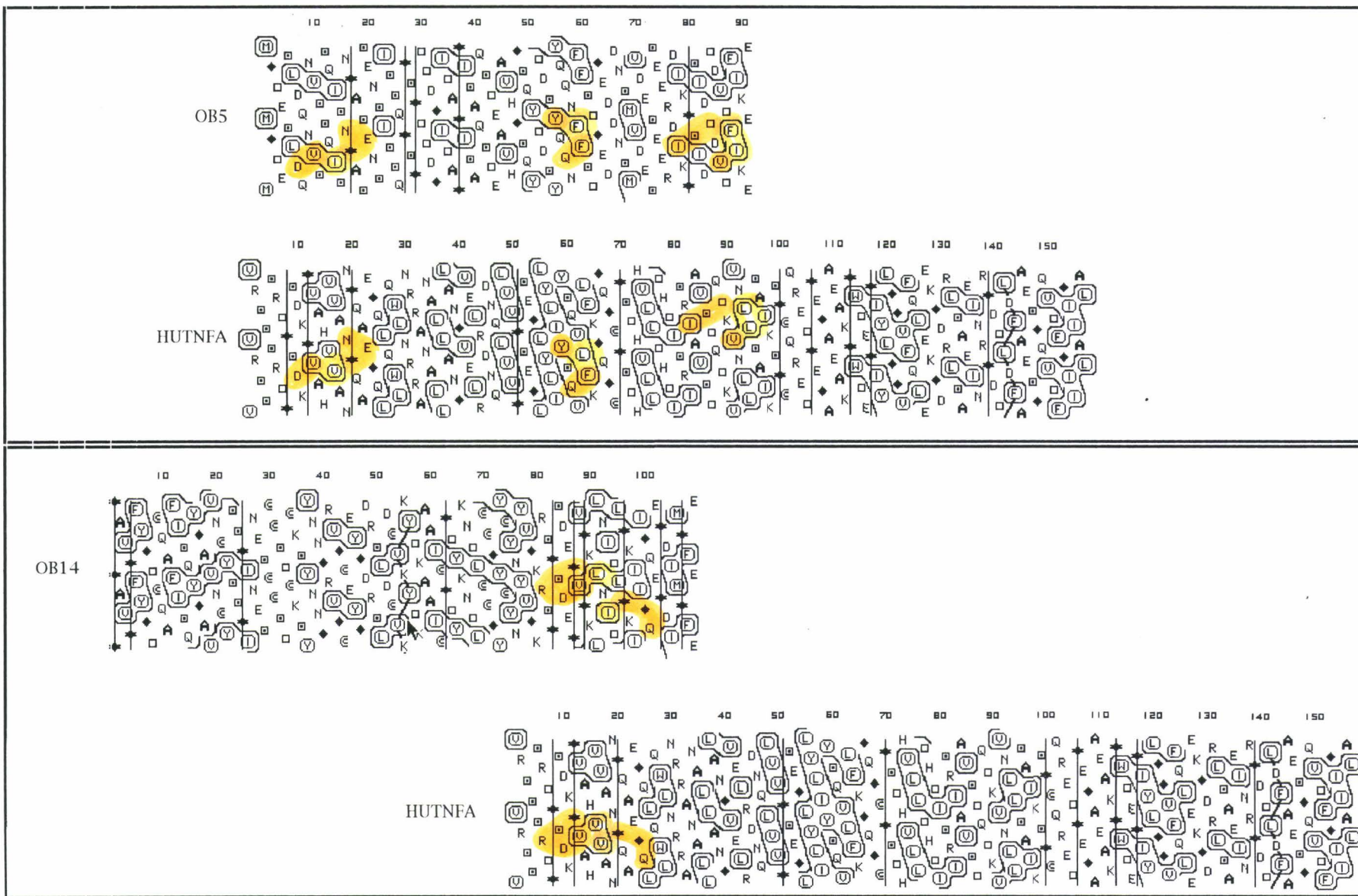


L'utilisation d'un système de représentation en deux dimensions d'une séquence peptidique sous forme théorique d'hélice  $\alpha$  permet l'étude des "clusters" hydrophobes mais également, le rapprochement d'acides aminés éloignés en séquence primaire (Gaboriaud et coll. 1987/ Lemesle-Varloot et coll. 1990). La comparaison par HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) des protéines OB5 et OB14 permet donc non seulement de retrouver les homologies détectées par alignement des séquences primaires, mais aussi d'en déceler de nouvelles grâce au rapprochement de certains acides aminés en structure secondaire. C'est par exemple le cas sur OB14 des résidus Pro 96, Gly 100 et Glu 101 (Figure 25).

Il est intéressant de remarquer que l'alignement des séquences protéiques OB5 et OB14 se fait dans les deux cas avec la région N terminale du TNF $\alpha$ . Une étude basée sur les régions antigéniques du TNF $\alpha$  a révélé que la portion N-terminale flexible comprenant les acides aminés 1 à 23 était une des 3 régions les plus immunogéniques de la molécule. Des expériences de "binding" utilisant des anticorps anti-peptides connus indiquent que ce fragment contiendrait au moins deux sites antigéniques correspondants aux résidus 1 à 10 et 11 à 23 (Corti et coll., 1992). Deux autres zones d'homologie, correspondant aux régions 59-68 et 81-96 du TNF $\alpha$  ont été identifiées pour OB5 (Figure 23). Cependant, selon cette équipe, plusieurs régions parmi lesquelles les portions 56-75 et 76-94 apparaissent comme peu ou pas antigéniques. L'ensemble de ces observations permet de supposer que les anticorps anti-TNF $\alpha$  que nous avons utilisé ont reconnu sur OB5 et OB14 une séquence apparentée à la région 1-23 du TNF $\alpha$  et peut justifier les alignements obtenus pour ces deux clones en structure secondaire (Figure 25). Cette hypothèse suggérerait que dans le sérum anti-TNF $\alpha$  polyclonal, des anticorps de même spécificité aient reconnu un même épitope au niveau des 2 protéines.

Il est généralement admis que la reconnaissance d'un épitope par un anticorps nécessite que cet épitope comporte au moins 4 à 6 résidus. L'acide aspartique, la valine et la proline situés respectivement aux positions 10, 13 et 20 du TNF $\alpha$ , sont les trois seuls aminoacides retrouvés à la fois sur les séquences OB5 et

Représentation en deux dimensions (HCA) des clones OB5 et OB14 vis-à-vis du TNF $\alpha$  humain



★ proline, © cystéine, ◆ glycine, □ sérine, □ thréonine.

Figure 25

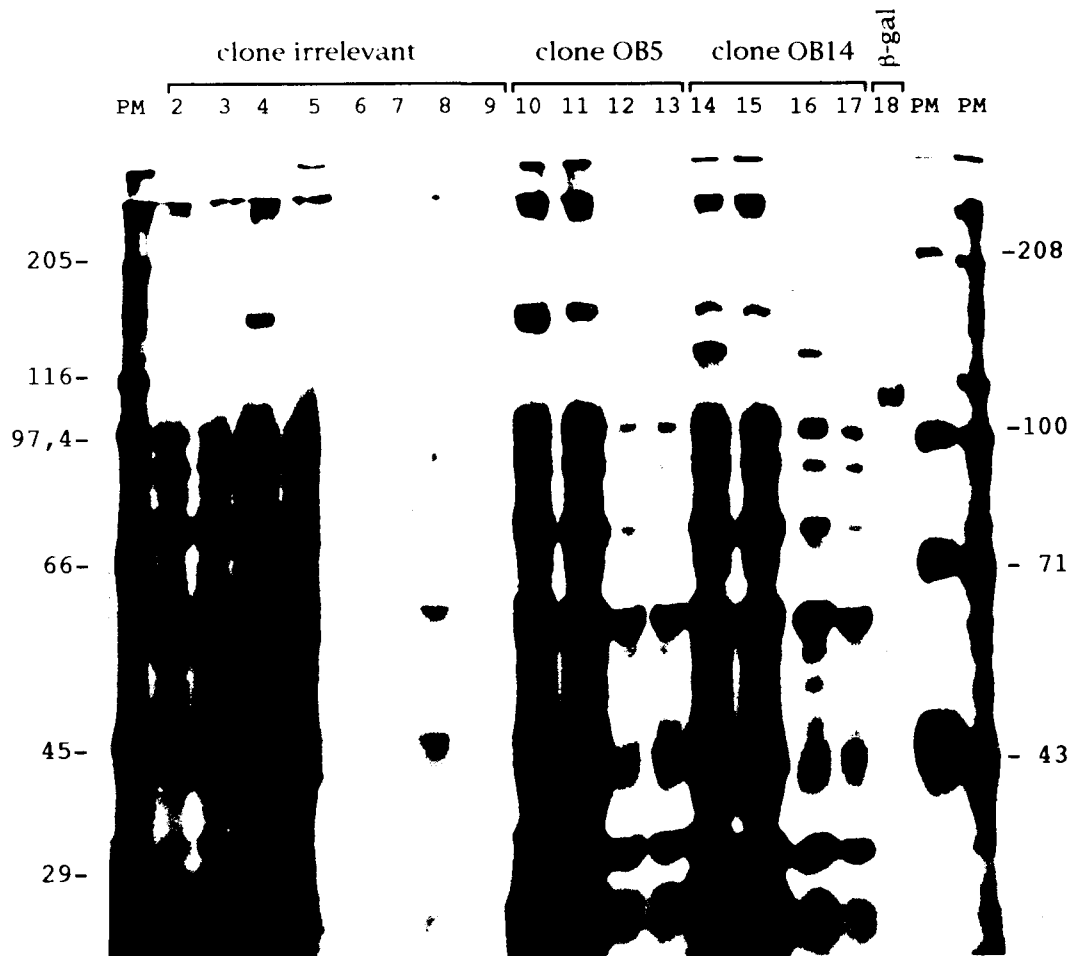
OB14 (Figure 23). Ceci est *a priori* insuffisant pour permettre aux anticorps anti-TNF $\alpha$  de reconnaître ce site. Pourtant, le nombre de résidus impliqués dans le contact entre deux molécules complémentaires est parfois si restreint, que la liaison est difficilement prédictible. Dans les modèles ligand-récepteur, la littérature fournit l'exemple des TNF $\alpha$  et  $\beta$  qui sont capables de se lier avec la même affinité sur les mêmes récepteurs (TNFR I et TNFR II) alors que la zone de contact avec leurs récepteurs est faiblement conservée entre les deux molécules (Eck et Sprang, 1989). Un autre exemple concerne le ligand du récepteur CD40 (CD40 L). La séquence primaire de cette molécule présente 20 à 26% d'identité avec les TNF et sa représentation tridimensionnelle (3-D) est comparable à la structure en "gateau-roulé" des TNF $\alpha$  et  $\beta$ . La région de CD40 L correspondant à la zone de contact des TNF avec leurs récepteurs est par contre très différente puisqu'un seul résidu important semble conservé. Ce ligand est néanmoins tout-à-fait capable de se lier aux récepteurs pour les TNF (Peitsh et Jongeneel, 1993). L'ensemble de ces observations suggère que le faible score d'identité entre les séquences primaires d'OB5/OB14 et du TNF $\alpha$  ne permet pas d'exclure un certain degré de conservation structurale entre ces molécules.

Dans le cas qui nous intéresse on peut donc envisager que seuls les trois aminoacides Asp 10, Val 13 et Pro 20 aient permis aux anticorps anti-TNF $\alpha$  de reconnaître les protéines OB5 et OB14. Si l'acide aminé Pro 20 n'est retrouvé que dans 4 séquences TNF $\alpha$  de mammifères (homme, chien, chat, lapin) sur l'ensemble de celles connues à l'heure actuelle (homme, porc, vache, chèvre, chien, chat, lapin, rat, souris, cheval), il convient de mentionner que les résidus Asp 10 et Val 13 sont par contre particulièrement conservés, exceptions faites de deux espèces (chèvre et chien) pour l'acide aminé Asp 10 et d'une seule espèce (lapin) pour le résidu Val 13 (voir revue Fiers, 1993).

## XI. Expression et caractérisation des protéines de fusion $\beta$ -Gal/OB5 et $\beta$ -Gal/OB14

Nous avons décidé de produire les protéines recombinantes OB5 et OB14. La préparation d'un lysat bactérien contenant la protéine recombinante désirée nécessite l'expression du phage recombinant dans les bactéries lysogènes *E. coli* Y1089. En effet, ces dernières comportent un site de mutation qui augmente la fréquence de lysogénie du phage et un autre qui inhibe l'activité protéasique. Une fois infectées par le clone sélectionné, les bactéries Y1089 sont mises en culture et la synthèse de la protéine de fusion contenant la  $\beta$ -galactosidase est induite par l'addition d'IPTG dans le milieu de culture. Pour chacun des clones, une culture sans IPTG est effectuée en parallèle: la comparaison des lysats de culture permet ainsi d'identifier facilement la protéine induite. Celle-ci s'accumule à l'intérieur des bactéries; soit dans des inclusions cytoplasmiques, soit dans le cytoplasme lui-même. C'est pour cette raison que l'on recherche systématiquement les protéines recombinantes à la fois dans le culot bactérien et dans le surnageant cytoplasmique. Dans notre expérience, un clone irrelevant, utilisé comme contrôle négatif, a été traité exactement dans les mêmes conditions que les clones OB5 et OB14. Les culots et les surnageants bactériens provenant de cultures induites ou non induites des différents clones ont été déposés sur gel de polyacrylamide et après migration, colorés au bleu de Coomassie (Figure 26). La comparaison des cultures induites ou non induites par l'IPTG permet de déceler la protéine de fusion de chaque clone. Dans le contrôle, la protéine recombinante n'apparaît qu'au niveau du culot (pistes 2 et 4) tandis que pour les clones OB5 et OB14, elle est visible à la fois dans le culot (pistes 10 et 14) et le surnageant (pistes 12 et 16). Le poids moléculaire des protéines de fusion a été évalué à 176 kDa pour  $\beta$  Gal/OB5 et 153 kDa pour  $\beta$  Gal/OB14, ce qui correspond à 60 kDa pour OB5 et 37 kDa pour OB14, puisque le poids moléculaire de la  $\beta$  Galactosidase est de 116 kDa (piste 18, Figure 27).

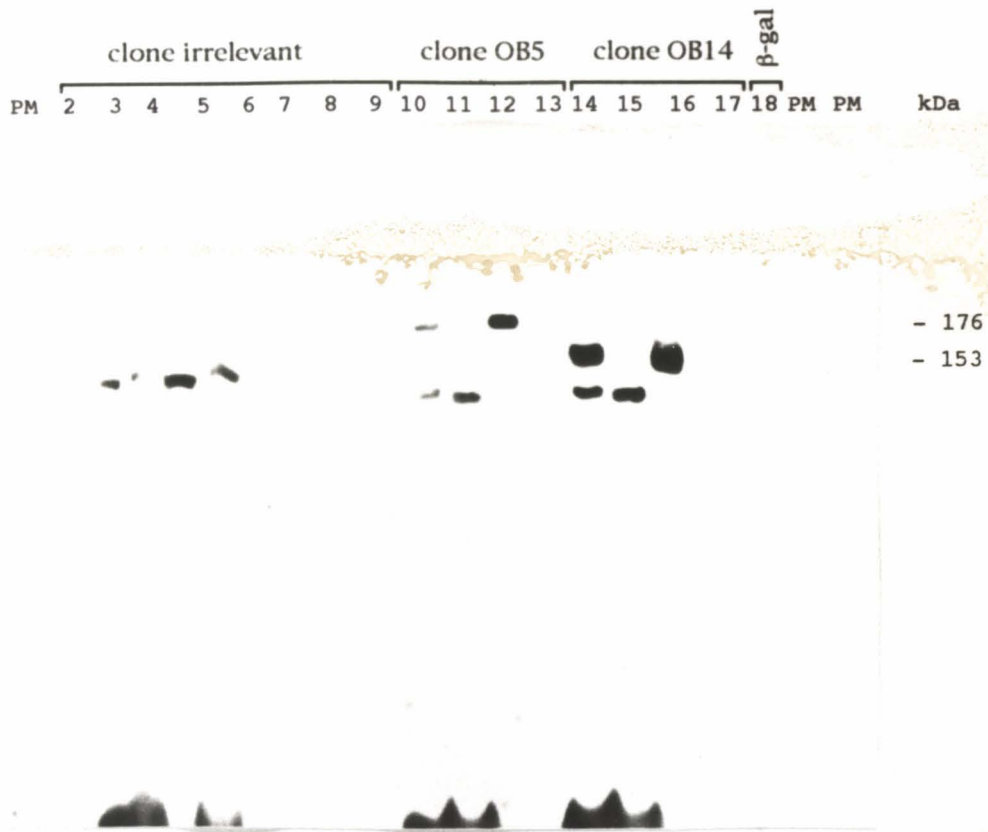
Analyse sur gel de polyacrylamide  
des cultures induites ou non induites des clones OB5 et OB14



- piste 2: clone irrelevants culot bactérien culture induite (10  $\mu$ l)  
 piste 3: clone irrelevants culot bactérien culture non induite (10  $\mu$ l)  
 piste 4: clone irrelevants culot bactérien culture induite (25  $\mu$ l)  
 piste 5: clone irrelevants culot bactérien culture non induite (25  $\mu$ l)  
 piste 6: clone irrelevants surnageant cellulaire culture induite (éq 90  $\mu$ l)  
 piste 7: clone irrelevants surnageant cellulaire culture non induite (éq 90  $\mu$ l)  
 piste 8: clone irrelevants surnageant cellulaire culture induite (éq 150  $\mu$ l)  
 piste 9: clone irrelevants surnageant cellulaire culture non induite (éq 150  $\mu$ l)  
 piste 10: clone OB5 culot bactérien culture induite (45  $\mu$ l)  
 piste 11: clone OB5 culot bactérien culture non induite (45  $\mu$ l)  
 piste 12: clone OB5 surnageant cellulaire culture induite (45  $\mu$ l)  
 piste 13: clone OB5 surnageant cellulaire culture non induite (45  $\mu$ l)  
 piste 14: clone OB14 culot bactérien culture induite (45  $\mu$ l)  
 piste 15: clone OB14 culot bactérien culture non induite (45  $\mu$ l)  
 piste 16: clone OB14 surnageant cellulaire culture induite (45  $\mu$ l)  
 piste 17: clone OB14 surnageant cellulaire culture non induite (45  $\mu$ l)  
 piste 18:  $\beta$ -Galactosidase (1  $\mu$ l à 10  $\mu$ g/ $\mu$ l)

Figure 26

Mise en évidence de la réactivité des Ac anti-TNF $\alpha$   
avec les protéines de fusion  $\beta$ -Gal/OB5 et  $\beta$ -Gal/OB14



piste 2: clone irrelevante culot bactérien culture induite  
 piste 3: clone irrelevante culot bactérien culture non induite  
 piste 4: clone irrelevante culot bactérien culture induite  
 piste 5: clone irrelevante culot bactérien culture non induite  
 piste 6: clone irrelevante surnageant cellulaire culture induite  
 piste 7: clone irrelevante surnageant cellulaire culture non induite  
 piste 8: clone irrelevante surnageant cellulaire culture induite  
 piste 9: clone irrelevante surnageant cellulaire culture non induite  
 piste 10: clone OB5 culot bactérien culture induite  
 piste 11: clone OB5 culot bactérien culture non induite  
 piste 12: clone OB5 surnageant cellulaire culture induite  
 piste 13: clone OB5 surnageant cellulaire culture non induite  
 piste 14: clone OB14 culot bactérien culture induite  
 piste 15: clone OB14 culot bactérien culture non induite  
 piste 16: clone OB14 surnageant cellulaire culture induite  
 piste 17: clone OB14 surnageant cellulaire culture non induite  
 piste 18:  $\beta$ -Galactosidase

Figure 27

Le poids moléculaire des protéines OB5 et OB14 ne semble pas concorder avec les résultats précédents. En effet, la protéine de 90 AA codée par le fragment de 270 pb du clone OB5 devrait théoriquement faire 11,3 kDa, alors que celle de 109 AA codée par OB14 (327 pb) devrait faire environ 14 kDa. Nos résultats mettent en évidence des protéines OB5 et OB14 bien plus importantes (60 et 37 kDa) que ce qu'on était en droit d'attendre (11,3 et 14 kDa). D'autre part, il est surprenant qu'OB5 n'ait pas un poids moléculaire inférieur à celui d'OB14. Il est possible que l'anomalie se situe au niveau de la préparation des phages recombinants lysogènes. Pour vérifier cette hypothèse, il serait donc intéressant de relancer une préparation de phages à partir d'une culture en Y1089, afin de vérifier sur gel d'agarose la taille de l'insert et le cas échéant, d'entreprendre un nouveau séquençage. On pourrait aussi envisager l'expression des protéines OB5 et OB14 dans d'autres vecteurs plasmidiques (type pGEX ou pQE), ce qui nous permettrait par ailleurs d'étudier leur capacité de liaison éventuelle aux récepteurs pour le TNF.

Devant l'incohérence de ces résultats, il nous a paru important de vérifier que les protéines recombinantes produites étaient toujours immunologiquement apparentées au TNF $\alpha$ . Nous avons donc réalisé un western blot à partir d'un gel identique à celui de la Figure 26 (Figure 27). Cette figure montre que les protéines de fusion des clones OB5 et OB14 sont reconnues spécifiquement par le sérum de criblage anti-TNF $\alpha$  (respectivement pistes 10/12 et 14/16). Il est intéressant de noter que dans cette expérience, les protéines de fusion ont été partiellement (OB14) ou majoritairement (OB5) retrouvées dans le surnageant cellulaire.

Dans les pistes correspondant aux différents culots (pistes 2 à 5 pour le contrôle, 10 et 11 pour le clone OB5 et 14 et 15 pour le clone OB14), on remarque en outre une immunoréactivité très nette avec un composant de 120 à 130 kDa. La spécificité de reconnaissance de ce composant par les anticorps anti-TNF $\alpha$  devra être contrôlée et les raisons de cette immunoréactivité, recherchées.

## XII. Discussion sur la deuxième partie de ce travail

Si de nombreuses équipes se sont intéressées à l'existence de molécules apparentées aux cytokines chez les invertébrés, la plupart d'entre elles n'ont utilisé que des méthodes biologiques et/ou immunologiques. Par contre, la caractérisation de ces molécules par des techniques de biologie moléculaire n'a été que rarement tentée. A notre connaissance, seules trois équipes dont la nôtre ont essayé de réaliser une approche moléculaire de ces molécules "cytokines-like".

L'équipe pionnière en ce domaine est celle de Beck et Habicht dans les années 1990. Les auteurs, qui avaient identifié 3 isoformes d'IL1 chez l'échinoderme *Asterias forbesi* (étoile de mer), ont purifié ces molécules (par ultrafiltration, chromatographie d'exclusion, chromatofocalisation, HPLC ...) et réalisé le séquençage protéique de l'isoforme (pI 7.4) apparentée à l'IL1 $\beta$  humaine (PI 7.0). Sur les 28 résidus séquencés, 24 ont pu être identifiés, parmi lesquels 3 (Isoleucine, Alanine et Lysine en positions 6, 10, 11 respectivement) apparaissent strictement conservés par rapport à l'IL1 de vertébré (Beck et coll., 1990). Dans cette étude, le degré d'homologie entre les deux molécules n'est pas indiqué, mais l'on peut néanmoins considérer qu'elles sont identiques à 12,5% (3 résidus /24).

L'autre équipe ayant abordé l'aspect moléculaire des substances "cytokines-like" est celle de Granath et Connors. En effet, après avoir découvert une activité IL1 dans l'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata* (Granath et coll., 1994), les chercheurs ont essayé de trouver le gène codant pour cette molécule. La sonde IL1 $\beta$  humaine a été utilisée sur des Southern blots d'ADN génomique de mollusque, mais sans résultat. D'autre part, des oligonucléotides synthétiques correspondant à diverses régions conservées de l'IL1 $\beta$  ont été utilisés comme amorces dans des réactions de PCR dans l'espoir d'amplifier la séquence IL1 $\beta$  de *Biomphalaria glabrata*. Parmi les multiples réactions utilisant différentes combinaisons d'amorces, une seule amplification a pu être obtenue. Le produit de cette amplification serait un fragment d'environ 170 pb dont la séquence partielle



afficherait 88% d'homologie avec la séquence IL1 $\beta$  humaine (Granath et coll., 1995).

Notre équipe est donc très probablement la première, sinon la seule à avoir abordé l'aspect moléculaire des substances "TNF-like" chez les invertébrés, puisque les deux autres équipes se sont plutôt intéressées aux molécules "IL1-like". Pour notre part, les molécules OB5 et OB14 mises en évidence par criblage d'une banque d'expression avec un sérum spécifique sont respectivement identiques à 16,7 (ou 28,4% selon l'alignement de la Figure 24) et 26,5% et homologues à 69 et 68% au TNF $\alpha$  humain. Il n'est pas réellement possible de comparer ces valeurs à celles obtenues par Beck ou Granath avec l'IL1, mais il est néanmoins intéressant de constater que les scores d'homologie et d'identité obtenus entre les molécules d'invertébrés et ces deux cytokines sont à peu près du même ordre de grandeur.

Notons que chaque groupe a utilisé une approche particulière, différente de celle des autres groupes. En effet, Beck et coll. ont réalisé des purifications de la protéine afin de la séquencer directement, tandis que Granath et coll. ont fait appel aux techniques de PCR et que nous avons adopté le criblage par anticorps d'une banque d'expression.

En réalité, nous avons débuté nos recherches de la même façon que Granath et coll. viennent de la faire pour l'IL1. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, nos premières expériences ont consisté à hybrider des dot blots et des Southern blots avec une sonde humaine; cependant, nous n'avons obtenu aucun résultat. Nous avons également essayé d'amplifier une séquence de *Bg* à l'aide d'oligonucléotides correspondant à des régions conservées de la molécule et servant d'amorces dans les réactions de PCR.

Malheureusement, la séquence du fragment amplifié obtenu n'a pas révélé d'homologies avec le TNF $\alpha$ . La comparaison de cette séquence avec les banques de données a montré une homologie avec la partie C-terminale des "GTP Binding Proteins" de type  $\beta$ . Ces molécules, très homologues (70%) aux "G $\beta$  like proteins", ont été récemment identifiées comme les récepteurs de la protéine kinase C activée

(RACK, Ron et coll, 1994). Curieusement, au niveau du génome, elles sont associées comme le TNF (Nedwin et coll., 1985), au complexe majeur d'histocompatibilité. Nous aurions pu aussi, à la manière de Beck et coll., réaliser le séquençage protéique direct de la molécule de 53 kDa. Il serait nécessaire d'obtenir de grandes quantités de cette protéine pour la purifier par différentes techniques successives. La comparaison de la séquence obtenue avec les séquences OB5 et OB14 pourrait permettre de déceler une éventuelle identité avec l'une ou l'autre des protéines.

DISCUSSION GÉNÉRALE,  
CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES

\*La relation hôte-parasite repose sur un dialogue permanent et raffiné au cours duquel s'expriment à la fois les stratégies de survie parasitaire et les mécanismes de défense de l'hôte. Dans la schistosomiase, de par le cycle biologique complexe du parasite impliquant un hôte intermédiaire invertébré et un hôte définitif vertébré, les manifestations de la relation entre le schistosome et ses hôtes sont obligatoirement très diverses.

Au cours des dix dernières années, ont émergé de multiples indications tendant à montrer que toute relation hôte-parasite nécessitait l'emploi d'un langage commun aux deux protagonistes. Dans ce contexte, les neuropeptides et les cytokines ont été particulièrement étudiés, ces familles de molécules pouvant constituer des systèmes de communication éventuels entre le parasite *S. mansoni* et ses hôtes potentiels.

Les neuropeptides ont été particulièrement étudiés dans notre laboratoire (Duvaux-Miret, 1992). Les peptides dérivés de la pro-opiomélanocortine (POMC) ( $\beta$ -endorphine, ACTH,  $\alpha$ -MSH) ont été retrouvés à tous les stades parasitaires (Duvaux-Miret et coll., 1990) et certains exercent un rôle immunosuppresseur à la fois sur les immunocytes de l'hôte intermédiaire (mollusque) et sur les monocytes de l'hôte vertébré (Duvaux-Miret et coll., 1992-b). Par ailleurs, on peut supposer que certains neuropeptides pourraient être impliqués dans la migration des schistosomes chez leur hôte définitif, et la topographie précise de leur habitat vasculaire (Capron, 1995).

Outre chez le trématode *Schistosoma mansoni*, les neuropeptides dérivés de la POMC ont été également identifiés chez les mollusques gastropodes *Planorbarius corneus* et *Lymnaea stagnalis* (Ottaviani et coll., 1991) et chez *Biomphalaria glabrata* infesté par *Schistosoma mansoni* (Duvaux-Miret et coll., 1992-b). Chez ce dernier, ces molécules seraient impliquées dans le comportement du parasite et dans le choix précis des organes dans lequel il s'établit (Duvaux-Miret et coll., 1992-c).

Ces études tendent à montrer qu'il existe une conservation phylogénétique de ces molécules et suggèrent que les messages de la communication cellulaire chez les vertébrés et les invertébrés ont une origine commune possible.

L'implication des cytokines dans le langage bidirectionnel entre le parasite et ses hôtes a été également recherchée. S'il l'on n'a jamais pu prouver l'existence de molécules "cytokine-like" chez le schistosome, celui-ci semble néanmoins capable d'intégrer le langage des cytokines de son hôte (Capron, 1995).

De récentes observations ont montré l'influence du TNF $\alpha$  de l'hôte vertébré sur la fécondité des vers femelles de schistosomes (Amiri et coll., 1992). Alors que les vers femelles produisent moins d'oeufs chez les souris SCID, le traitement de ces souris par le TNF $\alpha$  restaure totalement les capacités de reproduction des schistosomes. Il apparaît à la lumière de ces travaux que les schistosomes utilisent le TNF $\alpha$  de l'hôte comme un stimulus de reproduction ou un facteur de croissance embryogénique. Ces résultats sont en accord avec une nouvelle étude, montrant que chez des souris C57BL/6, le TNF $\alpha$  accélère d'une manière dose-dépendante la production des oeufs par les vers, ainsi que leur maturation (Yoshinari et coll., 1994). Ces effets sont neutralisés par addition d'anticorps anti-TNF $\alpha$  polyclonaux. Le TNF $\alpha$  interviendrait également dans l'induction de granulomes (Joseph et Boros, 1993) qui protègent l'hôte de l'action des facteurs toxiques libérés par l'oeuf (Sher, 1992). L'ensemble de ces observations permet d'envisager la présence d'un récepteur pour le TNF à la surface des schistosomes (Mc Kerrow et Ritter, 1992/ Yoshinari et coll., 1994) et conforterait l'idée que les récepteurs de cytokines sont des molécules ancestrales (Yamamori et Sarai, 1992).

Afin de savoir si dans ce contexte, l'intégration par le parasite du langage de l'hôte pouvait également concerner l'hôte invertébré, nous avons entrepris la recherche de TNF $\alpha$  chez le mollusque *Biomphalaria glabrata*. Ce travail s'est inscrit dans l'étude menée dans notre laboratoire visant à analyser les bases moléculaires de la relation que le parasite entretient avec ses hôtes potentiels, vertébrés ou invertébrés.

Nous avons pu montrer l'existence de molécules apparentées au TNF $\alpha$  dans l'hémolymphe, les hémocytes mais aussi l'hépatopancréas (glande digestive) des mollusques sains et infectés. Entre le 10<sup>ème</sup> et le 17<sup>ème</sup> jour après l'infection, les jeunes sporocystes de *S. mansoni* migrent activement à travers les tissus voisins et/ou passivement par le biais du système circulatoire vers la glande digestive du mollusque. Ce n'est qu'une fois arrivés dans les tissus de l'hépatopancréas que les sporocystes filles croissent et se développent rapidement, et que débute la cercariogénèse (Jourdane et Théron, 1987). Les dosages des molécules apparentées au TNF $\alpha$  réalisés par ELISA dans les extraits de glande digestive de mollusque sains ou infectés ont révélé une quantité significativement plus importante -bien que probablement sous évaluée- de ces molécules dans l'organe infecté, suggérant ainsi que les cercaires puissent utiliser le TNF $\alpha$  du mollusque pour leur différenciation et leur développement. La mise en évidence de récepteurs pour le TNF $\alpha$  sur les cercaires permettrait de vérifier cette hypothèse.

Une molécule "IL1-like" a été également mise en évidence chez *Biomphalaria glabrata* (Granath et coll., 1994). Cette molécule, dont l'activité biologique et l'immunoréactivité vis-à-vis de l'IL1 $\beta$  humaine ont été démontrées, est présente dans l'hémolymphe de mollusques sains, mais sa production décroît après infection des animaux par *S. mansoni*. Il est intéressant de constater que l'IL1 et le TNF, qui ont un grand nombre d'activités communes chez les vertébrés (Rosenblum et Donato, 1989), subissent une inhibition de synthèse analogue chez les mollusques infestés. Cette observation renforce l'idée que les similarités d'action observées entre ces deux molécules chez les vertébrés sont probablement apparues très précocement dans l'évolution.

Différentes cytokines ont d'ores et déjà été identifiées chez les mollusques: l'IL1 $\alpha$ , l'IL1 $\beta$ , l'IL2, l'IL6, le TNF $\alpha$  et le TNF $\beta$  (Ottaviani et coll., 1993/ Hugues et coll., 1990/ Ottaviani et coll., 1995). Il est probable que les défenses de l'hôte invertébré soient régulées par un réseau de cytokines analogue à celui présent chez les vertébrés. Les invertébrés subissent en effet toutes sortes d'agressions qui pourraient être à

l'origine d'une libération de cytokines inflammatoires. La découverte de plusieurs cytokines chez les invertébrés ne démontre cependant pas l'existence d'un tel réseau. Pour tenter d'en apporter une preuve, l'interactivité des cytokines IL1 et TNF $\alpha$  bien connue chez les vertébrés (Dinarello, 1989/ Rosenblum et Donato, 1989/ Bethea et coll., 1992), a été étudiée chez *Mytilus edulis* (Hugues et coll., 1990). Ce travail montre que les hémocytes du mollusque sont capables de répondre à l'IL1 et au TNF $\alpha$  comme les granulocytes humains et que la réponse vis-à-vis de l'IL1 peut être partiellement supprimée par des anticorps anti-TNF $\alpha$ , le reste de la réponse étant supprimé par des anticorps anti-IL1. Cette observation, indiquant que l'IL1 exerce son action par l'intermédiaire d'une molécule "TNF $\alpha$ -like", est à notre connaissance le premier et le seul argument retrouvé dans la littérature en faveur d'un réseau "cytokine-like" chez les invertébrés.

La découverte des molécules "cytokine-like" chez les invertébrés laisse supposer qu'il existe comme pour les neuropeptides, une conservation phylogénétique de ces molécules et renforce l'hypothèse que les vertébrés et les invertébrés utilisent des molécules communes dans leur relation avec le parasite.

Il est fascinant de constater que des molécules retrouvées chez deux espèces aussi différentes que l'homme et le mollusque, produisent les mêmes effets. Dans la famille des neuropeptides, les peptides dérivés de la POMC de l'hôte vertébré comme ceux de l'hôte invertébré sont impliqués dans le comportement du parasite et la topographie de son habitat. De même, parmi les cytokines, nous venons de mentionner l'exemple du TNF $\alpha$  qui joue le rôle d'un facteur de croissance et de développement du schistosome à la fois chez l'hôte définitif et l'hôte intermédiaire. L'extension des recherches dans ce domaine permettra sans doute de découvrir d'autres molécules mais peut-être aussi d'autres familles de molécules impliquées dans la relation entre le parasite et ses hôtes. Il sera alors possible de prouver que deux espèces aussi éloignées sur le plan évolutif que l'homme et le mollusque, mais

exposées au même parasite, sont en réalité beaucoup plus proches l'une de l'autre qu'on ne l'imagine.

\*\* La récente découverte de l'existence d'un réseau neuroimmunologique chez les vertébrés (Smith et Blalock, 1988/ Blalock, 1989) puis chez les invertébrés (Stefano, 1989) a amené les chercheurs à s'intéresser aux interactions neuropeptides-cytokines chez les mollusques.

Le premier exemple concerne un mollusque bivalve: la moule *Mytilus edulis*. Chez cet animal, différents récepteurs opioïdes ont été retrouvés au niveau des hémocytes (Stefano et coll., 1989-a/1992-a). Ces cellules adoptent des changements conformationnels lorsqu'elles sont stimulées par des neuropeptides opioïdes, et sont capables de migrer ou d'adhérer (Stefano et coll., 1989-a/1989-b)

L'administration *in vitro* de l'opioïde DAMA ([D-Ala<sup>2</sup>-Met<sup>5</sup>]-enképhalinamide, analogue synthétique de la Met-enképhaline) induit la formation d'une molécule apparentée à l'IL1, à la fois dans les hémocytes mais aussi dans les tissus nerveux de l'animal. La spécificité de cette substance "IL1-like" a pu être mise en évidence par l'effet antagoniste d'anticorps anti-IL1 (Stefano et coll., 1991). D'autre part, l'hormone de stimulation des mélanocytes ou hormone mélanotrope (MSH) est capable de désactiver les immunocytes activés spontanément ou stimulés par le TNF (Stefano et coll., 1992-b).

Chez deux autres mollusques, les gastropodes prosobranches *Planorbarius corneus* et *Viviparus ater* de nombreuses recherches ont été également réalisées dans ce domaine. Des incubations *in vitro* d'hémolymphe de *V. ater* avec du CRF (corticotropin-releasing-factor) ou de l'ACTH provoquent la libération de norépinéphrine, de dopamine ou d'épinéphrine par les hémocytes (Ottaviani et coll., 1993-a). Ces résultats ont été également reproduits chez *P. corneus* (Ottaviani et coll., 1995). De plus, des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'amines biogènes (tyrosine hydroxylase et dopamine  $\beta$ -hydroxylase) ont été retrouvées dans



les hémocytes (Ottaviani et coll., 1993-a), suggérant que ces cellules ont des capacités de réponses neuroendocrines.

D'autres expériences ont montré que lorsque les hémocytes de gastropodes sont préalablement incubés avec de l'IL2, la libération d'amines biogènes induites par le CRF est réduite et la fixation du CRF devient impossible à la surface des hémocytes. Ceci suggère que l'IL2 et le CRF entrent en compétition pour un même récepteur au niveau de la membrane des hémocytes, l'affinité pour ce récepteur étant cependant plus forte avec le CRF qu'avec l'IL2 (Ottaviani et coll., 1994). Les cytokines IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et TNF $\beta$  exercent les mêmes effets inhibiteurs sur la libération d'amines biogènes induites par le CRF (Ottaviani et coll., 1995). Il a donc été envisagé que le CRF et ces cytokines puissent se lier à un même récepteur ancestral situé sur les membranes des hémocytes. Cette éventualité, si elle est vraie, permettra d'apporter des explications d'un point de vue évolutif sur les récentes observations rapportées chez les mammifères à propos de la promiscuité des récepteurs de cytokines (Kondo et coll., 1993/ Noguchi et coll., 1993/ Russel et coll., 1993).

Chez les gastropodes pulmonés, l'existence d'un réseau neuroimmunologique a été recherchée chez *Lymnaea stagnalis* dans le contexte de son infection par le schistosome aviaire *Trichobilharzia ocellata*. L'infection par ce parasite entraîne une diminution des capacités de reproduction et un gigantisme de ce mollusque. La schistosomine est synthétisée puis libérée sous certaines conditions de stress, comme par exemple l'infection du mollusque par le schistosome. Comme nous l'avons déjà souligné, cette molécule est présente dans l'hémolymphe des mollusques parasités et semble impliquée dans la "castration parasitaire". Elle induit en effet des changements dans l'excitabilité des cellules neuroendocriniennes chargées de contrôler les fonctions de reproduction et de croissance du mollusque (Hordjik et coll., 1992).

Ce facteur a été initialement décrit comme étant un neuropeptide émis par les cellules LGCs du système neuroendocrine du mollusque. Un récent rapport indique qu'il est également produit par des cellules du système de défense interne du

mollusque, à savoir les hémocytes (De Jong-Brink et coll., 1994). Ce facteur est actuellement plutôt considéré comme une molécule "cytokine-like", bien que sa structure moléculaire ne révèle aucune homologie de séquence avec les cytokines de vertébrés identifiées jusqu'à présent. La schistosomine est comparable à l'IL1, qui, chez les vertébrés, est libérée par les macrophages pendant un stress et transmet des signaux depuis le système immunitaire jusqu'au système neuroendocrine (De Jong-Brink et coll., 1994).

Ce dernier exemple montrant l'existence d'un réseau neuroimmunologique chez les gastropodes pulmonés, particulièrement évident en cas d'infection par un schistosome aviaire, est très intéressant. En effet, il révèle l'implication d'un tel réseau dans une relation hôte-parasite très voisine de celle que nous étudions.

Chez *Biomphalaria glabrata*, les recherches ne sont pas encore si avancées. Comme nous l'avons déjà mentionné, un effet immunosuppresseur causé par l'action de certains neuropeptides sur les immunocytes du mollusque a été décrit dans notre laboratoire. L' $\alpha$ -MSH, résultant de la conversion de l'ACTH par l'endopeptidase neutre 24.11 (NEP) (Shipp et coll., 1990) entraîne une inhibition de l'adhérence et des activités locomotrices des immunocytes de *Bg*. Lorsque ces cellules proviennent d'animaux infectés par *Schistosoma mansoni* (14 jours après infection), leurs capacités d'activation sont inhibées, mais elles sont restaurées par l'addition d'anticorps anti-ACTH et anti-MSH (Duvaux-Miret et coll., 1992-b). Ces observations montrent l'existence d'un réseau neuroimmunologique chez *B. glabrata*.

Il n'existe à notre connaissance, aucun autre travail en cours visant à approfondir le rôle des interactions neuroimmunologiques chez *B. glabrata*. D'ailleurs, la découverte de la schistosomine dans l'hémolymphe de *B. glabrata* (De Jong-Brink et coll., 1991) n'a semble-t-il pas suscité de plus amples recherches dans ce domaine.

Il est certain que la découverte chez les invertébrés, de molécules apparentées aux neuropeptides et aux cytokines de vertébrés, représente un formidable intérêt tant d'un point de vue de l'évolution que d'un point de vue fondamentalement

immunologique. Cependant, nous sommes convaincus qu'une meilleure connaissance des interactions neuroimmunologiques et de leur implication dans la relation hôte-parasite sera indispensable pour mieux comprendre les mécanismes qui favorisent l'installation ou le rejet du parasite.

\*\*\* La résistance de *B. glabrata* vis-à-vis de l'infection par *S. mansoni* fait intervenir des réponses cellulaires et humorales. Il a été montré depuis plusieurs années que chez les mollusques résistants, les larves de *S. mansoni* sont tuées par un mécanisme de cytotoxicité médié par les hémocytes (Bayne et coll., 1980-a). En réalité, les hémocytes de mollusques susceptibles, tout autant que ceux des mollusques résistants, sont capables d'encapsuler les sporocystes de *S. mansoni in vitro*; cependant, seuls les hémocytes de souches résistantes peuvent attaquer le tégument des sporocystes (Bayne et coll., 1984). Cette observation a permis de réaliser que pour activer les mécanismes de cytotoxicité des hémocytes après l'étape de reconnaissance des sporocystes en tant que particules étrangères, d'autres signaux étaient nécessaires. Plusieurs études montrant que la résistance pouvait s'acquérir par transfert passif de sérum de mollusque résistant vers un mollusque susceptible, révélèrent l'origine plasmatique de certains facteurs de résistance (Bayne et coll., 1980-b/ Loker et Bayne, 1982/ Granath et Yoshino, 1984).

Dans un récent travail, l'éventualité que l'IL1 puisse être un de ces facteurs liés à la résistance de *B. glabrata* vis-à-vis de *S. mansoni* a été étudiée. En effet, son apparition précoce dans la vie animale et sa conservation dans l'évolution, mais également ses propriétés d'activation des fonctions phagocytaires faisaient de cette molécule un bon candidat (Granath et coll., 1994). Une activité "IL1-like" a été démontrée dans l'hémolymphe des mollusques résistants (souches 10-R2 et 13-16-R1), et dans une moindre mesure, dans l'hémolymphe des mollusques susceptibles (souche M-line). Après exposition à *S. mansoni*, le taux d'IL1 varie fortement dans les différentes souches, mais reste toujours plus élevé dans les mollusques

résistants. Par ailleurs, L'IL1 recombinante humaine, sans effet sur les hémocytes de *Bg* susceptible, engendre la production d'anion superoxyde  $O_2^-$  par les hémocytes des souches résistantes. Cet effet est supprimé par un antagoniste du récepteur à l'IL1. L'ensemble de ces observations suggère donc que l'IL1 joue un rôle significatif dans la capacité de *B. glabrata* à résister à l'infection par *S. mansoni* (Granath et coll., 1994).

La poursuite de ce travail a consisté à étudier *in vivo* le rôle de l'IL1. Pour cela, l'IL1 recombinante humaine a été injectée dans des mollusques susceptibles, juste avant leur infection. Les résultats de cette expérience montrent une diminution du nombre de cercaires libérées par ces mollusques, en comparaison des mollusques contrôles. D'autre part, l'injection d'IL1 dans les souches susceptibles (M-line) et résistantes (13-16-R1) augmente, 24 heures après l'infection, la phagocytose médiée par les hémocytes ainsi que la production d'anion superoxyde  $O_2^-$  qui en dépend. Ces nouveaux résultats confirment que la molécule sérique dont l'immunospecificité, l'activité biologique et la fonction s'apparentent à l'IL1, est impliquée dans la susceptibilité ou la résistance des mollusques à l'infection par *S. mansoni* (Connors et coll., 1995).

Dans nos expériences, les dosages réalisés par ELISA des molécules apparentées au  $TNF\alpha$  dans l'hémolymphe indiquent que la majeure partie (83%) de ces molécules est retrouvée dans le sérum. Une inhibition partielle (30-50%) de leur synthèse est observée dans les mollusques infectés, et ce dès 24 heures après l'exposition au parasite. Ces résultats, semblables à ceux rapportés par Granath et Connors pour la molécule "IL1-like" de *Bg*, nous incitent à croire que les substances "TNF-like" du mollusque pourraient être également impliquées dans les phénomènes de résistance et/ou de susceptibilité des mollusques vis-à-vis de *S. mansoni*. Rappelons en effet que chez les vertébrés, cette cytokine, au moins aussi pléiotropique que l'IL1, est impliquée comme elle dans un grand nombre de processus inflammatoires (Fiers, 1993). Des expériences visant à prouver l'éventuelle participation des molécules "TNF-like" dans les phénomènes de

susceptibilité ou de résistance des mollusques devront être entreprises. La récente acquisition dans notre laboratoire de la souche *B. glabrata* résistante 13-16-R1, nous permettra très prochainement de doser les molécules TNF $\alpha$ -immunoréactives dans ces mollusques et d'établir des comparaisons avec nos premiers résultats. Une analyse cinétique sera également réalisée sur la souche résistante après infection par *S. mansoni*, et comparée à la courbe initialement obtenue avec les mollusques susceptibles. Enfin, le rôle protecteur du TNF $\alpha$  humain recombinant chez le mollusque infecté pourra être envisagé.

\*\*\*\* Pour pouvoir véritablement approfondir les recherches sur le rôle des molécules "cytokine-like" dans la relation hôte-parasite, et plus particulièrement dans la susceptibilité et/ou la résistance à l'infection, la caractérisation moléculaire de ces cytokines apparaît dorénavant indispensable.

En ce qui concerne les molécules apparentées au TNF $\alpha$  chez *Biomphalaria glabrata*, l'obtention des séquences complètes constitue un de nos objectifs prioritaires. En effet, il est évident que sans information sur les séquences, il est impossible d'évaluer le degré d'homologie entre les cytokines de vertébrés et celles des invertébrés, même si l'on admet que ces molécules existent depuis des millions d'années (Cooper et coll., 1994).

Cette partie du travail a été récemment poursuivie par Vinca Lardans et Pascal Duclermortier dans notre laboratoire. Les séquences OB5 et OB14 codant pour 2 polypeptides reconnus par les anticorps anti-TNF $\alpha$ , ont été utilisées comme sondes pour rechercher dans la banque cDNA des copies plus complètes de ces clones.

Les résultats montrent dès à présent que la séquence OB5 est contenue dans une protéine de poids moléculaire voisin de 53 kDa présentant une homologie très limitée avec le TNF $\alpha$ . Bien que cette protéine possède un motif en doigt de zinc dans sa partie C-terminale, aucune autre homologie particulière avec d'autres protéines n'est apparue lors de l'analyse des banques de données.

La séquence OB14 quant à elle est portée par un ARN messenger de 2,4 kb, dont la séquence partielle montre qu'il code pour une protéine significativement homologue (50%) à diverses protéines ribosomales.

Ces résultats confirment donc que OB5 et OB14 sont deux protéines distinctes. L'identité de l'une ou l'autre de ces protéines avec le composant "TNF $\alpha$ -like" de 53 kDa identifié dans les différents tissus de *B. glabrata* devrait être déterminé.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## PREMIERE PARTIE : BIOLOGIE ET BIOCHIMIE

### 1. Animaux

Une souche portoricaine de *Schistosoma mansoni* est maintenue au laboratoire, chez le planorbe *Biomphalaria glabrata* comme hôte intermédiaire et chez le hamster doré *Mesocricetus auratus* comme hôte définitif.

Les mollusques (souche albinos) sont élevés dans des aquariums où l'eau (50% eau de Volvic-50% eau déminéralisée) est maintenue à 25-28°C. Leur nourriture comprend de la laitue et un mélange complet supplémenté en vitamines et en calcium. Les mollusques sains utilisés ont une taille approximative de 10 mm de diamètre. Des spécimens de 5-7 mm sont infestés par *S.mansoni* après une exposition à sept miracidies (par mollusque). Les mollusques infestés sont utilisés à différents jours après l'infection.

### 2. Préparation des différents extraits

#### 2.1. Extraits bruts

Les mollusques sont essuyés avec un papier absorbant. L'hémolymphe est collectée directement en insérant une aiguille fine dans la cavité cardiaque et environ 100 µl peuvent être ainsi récoltés par mollusque. L'hémolymphe est centrifugée à 2000 x g pendant 10 min à 4°C et le surnageant est stocké à -20°C jusqu'à utilisation. Le culot de cellules (hémocytes) ainsi obtenu, est resuspendu dans du tampon PBS (10 mM Phosphate, 0,15 M NaCl), pH 7,4, puis soumis aux ultra-sons dans la glace (deux fois 30 secondes) et centrifugé 15 min à 10 000 x g à 4°C. Le lysat cellulaire est récupéré et stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

Pour préparer un extrait total de mollusques, les corps entiers sont homogénéisés en PBS contenant 100 U/ml d'aprotinine (inhibiteur de protéases) à l'aide d'un appareil Ultraturrax puis d'un homogénéiseur de Dounce. L'extrait est centrifugé à 10 000 x g pendant 1 heure à 4°C, et le surnageant est récupéré et stocké à -20°C



jusqu'à utilisation. Le même protocole est utilisé pour la préparation d'un extrait de glande digestive.

## 2.2. Extrait fractionné

La technique de gel filtration, utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur taille, n'a été appliquée qu'à l'extrait total de mollusque.

On utilise une colonne de billes Sephadex G50 (Pharmacia, Suède) dont la masse moléculaire d'exclusion est de 50 000 daltons et dont la gamme de fractionnement s'étend de 1500 à 30 000 daltons. Après stabilisation de la colonne en PBS-inhibiteurs (Aprotinine 100 U/ml, PMSF 1mM) et dépôt de l'échantillon, l'effluent est collecté par fractions de 1 ml. Cet extrait n'a été employé que pour rechercher par dosage radioimmunologique (voir ci-après), le matériel TNF $\alpha$  immunoréactif dans les fractions ainsi collectées.

## 3. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry. Ce dosage est réalisé en microméthode. A partir d'une solution stock de Sérum Albumine Bovine à 1mg/ml, on réalise une gamme étalon. Aux différents points de la gamme (5mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg) ainsi qu'aux échantillons à tester, on rajoute 2 ml d'une solution de Biuret préparée extemporanément. Après une incubation de 30 min à l'obscurité, 0,2 ml de réactif de Folin (Merck, Allemagne) dilué au  $1/2$  sont ajoutés dans chaque tube et une nouvelle incubation a lieu à l'abri de la lumière pendant 15 min. La lecture de la densité optique est stable à 660 nm pendant environ 2 heures.

### Solution de Biuret:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 4% / NaOH 0,1M	10 ml
Tartrate de Potassium et de Sodium 2%	0,1 ml
CuSO <sub>4</sub> 2%	0,1 ml

#### 4. Dosage radioimmunologique

Un kit RIA (Amersham) a été utilisé pour rechercher le matériel TNF $\alpha$  immunoréactif dans des extraits de mollusques, bruts ou fractionnés par passage sur une colonne G50. Le test est basé sur la compétition entre le TNF $\alpha$  radioactif ( $^{125}\text{I}$  TNF $\alpha$ ) et le TNF $\alpha$  des extraits, vis-à-vis d'anticorps spécifiques du TNF $\alpha$ . Les complexes TNF $\alpha$ -anticorps réagissent avec un deuxième anticorps couplé à des particules magnétiques. Une séparation magnétique ou une simple centrifugation peuvent être employées pour dissocier la fraction complexée de la fraction libre. Le dosage de la radioactivité dans le culot permet de calculer la quantité de  $^{125}\text{I}$  TNF $\alpha$  complexé aux anticorps et donc de déterminer, par interpolation d'une courbe standard, la concentration de TNF $\alpha$  dans l'échantillon. Le protocole expérimental suivi est exactement celui recommandé par les fabricants et il peut être résumé dans le tableau ci-dessous, où tous les volumes sont en microlitres.

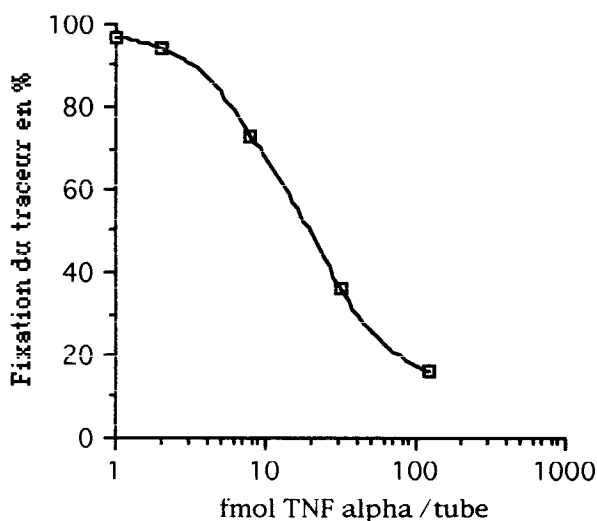
Protocole de dosage radioimmunologique					
	Coups totaux	Complexes non spécifiques	Zéro Standard	Standards	Echantillons
Tampon	-	200	100	-	-
Standard	-	-	-	100	-
Echantillon	-	-	-	-	100
Antisérum	-	-	100	100	100
Bien agiter les tubes, les boucher puis les incuber 4 heures à température ambiante					
Traceur	100	100	100	100	100
Bien agiter les tubes, les boucher puis les incuber 16 à 24 heures à +4° C					
Complexe billes magnétiques	2°Anticorps/	250	250	250	250
Bien agiter les tubes, les incuber 10 minutes à température ambiante					
Centrifuger les tubes à 1500 g minimum, pendant 10 minutes					
Aspirer délicatement le surnageant, égoutter les culots					
Compter la radioactivité					

- Les différents points de la gamme (0 fmol, 1 fmol, 2 fmol, 3,9 fmol, 7,8 fmol, 15,6 fmol, 31,2 fmol, 62,5 fmol, 125 fmol ) et les échantillons sont dosés en double.

- Le rapport:  $\frac{\text{complexes non spécifiques}}{\text{coups totaux}}$  ne doit pas dépasser 2 à 4%.
- Le rapport  $\frac{(\text{zéro standard} - \text{complexes non spécifiques}) \times 100}{\text{coups totaux}}$  doit être de 40%.
- Le rapport complexes spécifiques/ zéro standard est calculé en pourcentage pour tous les points de la gamme selon l'équation suivante:

$$\frac{(\text{standard} - \text{complexes non spécifiques}) \times 100}{(\text{zéro standard} - \text{complexes non spécifiques})}$$

Une courbe standard de ce type est obtenue:



### 5. Activité biologique

Le test biologique standard pour rechercher l'activité TNF implique l'utilisation d'une lignée de fibroblastes murins, la L-929. Ces cellules sont habituellement résistantes au TNF, en effet, les cellules de la lignée L-929 sont capables de synthétiser 2 polypeptides P36 et P42 qui les rendent réfractaires à l'effet cytotoxique du TNF. Traitées par l'actinomycine D (ou la cycloheximide), la synthèse

des deux polypeptides protecteurs est supprimée et les cellules deviennent alors sensibles au TNF. L'activité biologique est déterminée comme la quantité de TNF $\alpha$  nécessaire pour tuer en 18 heures 50% de L-929 traitées à l'actinomycine D. Les concentrations sont définies à partir d'une courbe standard réalisée pour chaque expérience avec du TNF $\alpha$  humain recombinant (Pharma Biotechnology Hannover, Allemagne).

La lignée L-929 est maintenue en culture dans du milieu RPMI contenant 1% de glutamine, 10% de sérum de veau foetal et des antibiotiques (Pénicilline, Steptomycine), dans une étuve à 37°C et contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont repiquées tous les 4 à 5 jours. Pour cela, le surnageant est éliminé, les cellules adhérentes sont décollées par une solution de trypsine-EDTA, puis centrifugées et resuspendues dans un milieu neuf. Le test est réalisé dans des microplaques de culture de 96 puits où 5 x 10<sup>4</sup> cellules dans 100  $\mu$ l de milieu sont déposées par puits. Après 4 heures de culture, les cellules sont traitées par 50  $\mu$ l d'actinomycine D (20  $\mu$ g/ml en PBS) et au bout de deux heures, 100  $\mu$ l de standard ou d'échantillon sont ajoutés. Après 24 heures de culture, le surnageant est éliminé et les cellules sont colorées au MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide). La coloration est stoppée par 100  $\mu$ l d'acide acétique et la lecture est effectuée à 580 nm.

## 6. Immunocytochimie

Les hémocytes de *B.glabrata* ont été analysés à l'aide des techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase. Toutes les étapes immunologiques se déroulent en chambre humide et à température ambiante. Les cellules en suspension dans l'hémolymphe sont déposées sur des lames traitées au silane. Après 15 min, l'observation au microscope met en évidence les cellules adhérentes des cellules non adhérentes, restées en suspension. Les cellules sont fixées pendant 1 heure dans du PBS pH 7,4 contenant 3% de paraformaldéhyde, puis rendues perméables par un traitement d'1 heure en PBS-Triton X100 à 0,3%. Les lames sont

ensuite lavées en PBS, puis séchées à l'air libre avant d'être stockées à -20°C en présence d'actigel jusqu'à utilisation.

Pour les analyses en immunofluorescence, les réactions non spécifiques sont évitées en préincubant les lames dans une solution de saturation (PBS contenant du sérum normal de chèvre 1/50 et de la BSA 1%). Cette étape de blocage des sites non spécifiques est suivie par une incubation des lames à tester pendant 2 heures dans le sérum polyclonal de lapin anti-TNF $\alpha$  humain dilué au 1/100. Les lames contrôles sont quant à elles incubées dans du sérum de lapin normal à la même dilution afin de mettre en évidence une éventuelle immunoréactivité avec un antigène endogène. Après plusieurs lavages en PBS, les lames sont mises 2 heures à l'obscurité, en présence d'une solution de Bleu d'Evans (contre-colorant de fluorescence à 0,01%) contenant un conjugué de chèvre couplé au Fluoroisothiocyanate (FITC) et dirigé contre les IgG de lapin (Sigma, St. Louis, MO). Les lames sont ensuite lavées abondamment, séchées, puis recouvertes de quelques gouttes de PBS/glycérol (v/v) et d'une lamelle. La fluorescence est appréciée grâce à un microscope équipé d'une lampe UV (490/525 nm).

Pour les analyses en immunoperoxydase, une préincubation des lames pendant 20 min dans de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% bloque l'activité de l'enzyme (peroxydase) endogène. Après les étapes de lavages et de saturation, les lames à tester sont incubées avec le sérum anti-TNF $\alpha$  humain dans les mêmes conditions (temps, dilution...) que les analyses en immunofluorescence, tandis que les lames contrôles sont mises en présence d'un sérum de lapin non-immun. Une nouvelle série de lavages est suivie d'une incubation pendant 2 heures à l'obscurité avec un conjugué de chèvre couplé à la peroxydase et dirigé contre les IgG de lapin (Dako, Danemark; dilution 1/100). En présence du substrat de la peroxydase, le tetrachloro 3-3 diaminobenzidine (Sigma) et de peroxyde d'hydrogène à 3%, la réaction enzymatique se développe en 5 à 10 min. Une contre-coloration nucléaire est ensuite réalisée avec l'hématoxyline d'Harris.

## 7. Electrophorèse des protéines et Western blot

Les protéines des différents extraits de mollusques ont été séparées sur gels d'acrylamide (13%), en présence de SDS (SDS-PAGE), selon la technique de Laemmli (1970). Après électrophorèse, les différents échantillons (25-50 µg de protéines) sont transférés sur membrane de nitrocellulose et l'immunoblot réalisé selon la méthode de Towbin et coll. (1979). Les bandes de nitrocellulose sont incubées à 4°C pendant la nuit, avec le sérum polyclonal de lapin anti-TNF $\alpha$  humain (neutralisant, Genzyme, USA) ou le sérum de lapin normal. Un conjugué de chèvre couplé à la peroxydase et dirigé contre les IgG de lapin (Diagnostic Pasteur, France; dilution 1/1000) est utilisé comme deuxième anticorps. La révélation de la réaction s'est faite avec le 4 chloro-1-naphtol, qui donne en présence de la peroxydase une coloration bleue-violette.

## 8. Marquage métabolique d'hémocytes

L'hémolymphe de 20 mollusques sains (7-12 mm) est collectée, puis centrifugée 2 min à 200 x g. Le surnageant est stocké à -20°C jusqu'à utilisation, et le culot d'hémocytes ainsi obtenu est resuspendu dans 100 µl de MEM sans méthionine, dilué au 2/3. Les hémocytes, répartis dans 2 des 96 puits d'une microplaque de culture, sont incubés en présence de 50 µCi par puits de <sup>35</sup>S méthionine (>37 Bq/mmol, Amersham). Au bout de 4 heures de culture à 28°C, les hémocytes sont prélevés et abondamment lavés en MEM. Le culot est ensuite repris dans 200 µl de tampon (62,5 mM Tris, 2% SDS) pH 6,8, puis porté à ébullition pendant 3 min. Chaque échantillon est alors centrifugé à 10 000 x g de façon à éliminer les débris cellulaires. Pour estimer la radioactivité incorporée, une fraction aliquote (2,5 ou 5 µl) de chaque surnageant ajoutée à 1 ml de BSA 0,02 % est précipitée sur glace par 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 20%. Au bout d'1 heure, le mélange est filtré sur papier Whatman GF/C. Les filtres sont ensuite rincés par du TCA 10% puis de l'eau. Après

séchage, la radioactivité des protéines retenues sur les filtres est mesurée en scintillation liquide (Aqualyte), à l'aide d'un compteur beta (LKB).

#### 9. Immunoprécipitation des antigènes de *B.glabrata* radiomarqués

Les produits radiomarqués préparés en SDS 2% sont incubés avec 10 µl de sérum à tester dans un volume final de 500 µl de tampon (TNTE 116 µl/TNSTE 364 µl) et ce, pendant 4 à 5 heures à +4°C. Les échantillons sont déposés sur 5 à 10 mg de Protéine A-Sépharose CL-4B (Pharmacia, Suède) prégonflée en TNSTE, et chaque tube est mis sous agitation (roue) à +4°C pendant toute la nuit. Les immuns-complexes fixés sur la Protéine A-Sépharose CL-4B sont lavés 9 fois dans du tampon. L'efficacité du dernier lavage peut être contrôlée par simple comptage en scintillation. Sur le culot de Protéine A-Sépharose CL-4B bien égoutté, on dépose 30 µl de tampon d'échantillon SDS-PAGE. Les tubes sont placés à 100°C pendant 2 à 3 min, puis centrifugés. Une fraction aliquote de chaque éluat peut être comptée en scintillation de façon à évaluer la quantité de produits immunoprécipités par rapport à la quantité initiale de produits marqués.

Après migration, le gel SDS-PAGE est soumis à la technique de fluorographie qui permet, grâce à l'addition d'un scintillateur, d'amplifier le signal radioactif lors de l'autoradiographie. Bien que la technique utilisant l'"Amplify" (Amersham, France) soit beaucoup plus rapide, il est préférable d'utiliser le 2,5-Diphényloxazole (PPO) à cause de sa plus grande sensibilité. Le gel est fixé et déshydraté par deux bains successifs de Diméthylsulfoxyde (DMSO) (2 fois 30 min sous agitation), puis plongé pendant deux heures dans un bain de PPO en DMSO (10% poids/poids). Après un abondant rinçage à l'eau bidistillée, les gels sont séchés sous vide, puis mis en exposition avec un film photographique (Kodak X-OMat AR) à -70°C.

TNTE:

Tris	5 mM
NaCl	150 mM
Triton	2%
EDTA	2 mM
Aprotinine	100 U/ml

TNSTE:

Tris	5 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,3%
Triton	2%
EDTA	2 mM
Aprotinine	100 U/ml

### 10. Dosages en ELISA

Le matériel TNF $\alpha$  immunoréactif a été quantifié par un kit ELISA (Quantikine, R&D systems, Europe, U.K.) conçu pour doser le TNF $\alpha$  humain. Le protocole suivi est exactement celui recommandé par les fabricants. Le test ELISA est réalisé dans des microplaques de titration dont le fond des puits est recouvert d'un anticorps monoclonal anti-TNF $\alpha$ . Le TNF $\alpha$ -standard est reconstitué par 1 ml de "RD5", diluant tamponné contenant des inhibiteurs de protéases, et la solution stock ainsi obtenue est à 1000 pg/ml. Une gamme étalon est produite par dilution sérielle du standard. Les différents points de la gamme (0 pg/ml, 15,7 pg/ml, 31,3 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml) et les divers échantillons sont dosés en doubles.

Le test se déroule en plusieurs étapes:

- Déposer 200  $\mu$ l par puits de chaque échantillon ou standard, recouvrir les puits d'un film adhésif et incubé 2 heures à 37°C.
- Aspirer le contenu de chaque puits et laver rigoureusement chacun d'eux avec 400  $\mu$ l du tampon de lavage (solution stock à diluer au 1/25). Répéter l'opération trois fois. Après le dernier lavage, enlever toute trace de tampon de lavage en retournant énergiquement la plaque contre un papier propre et absorbant.
- Ajouter 200  $\mu$ l de conjugué TNF $\alpha$  dans chaque puits. Recouvrir les puits d'un nouveau film adhésif et incubé 2 heures à 37°C.
- Renouveler la procédure d'aspiration et de lavage comme ci-dessus.



- Ajouter 200  $\mu$ l de substrat [1 volume de réactif coloré A (peroxyde d'hydrogène stabilisé) pour 1 volume de réactif coloré B (chromogène tetraméthylbenzidine stabilisé)] dans chaque puits. Recouvrir les puits d'un nouveau film adhésif et incuber 20 minutes à 37°C.

- Renouveler la procédure d'aspiration et de lavage.

- Ajouter 50  $\mu$ l de solution Stop (Acide sulfurique 2 N) dans chaque puits.

La densité optique se lit à 450 nm dans les 30 minutes, à l'aide d'un spectrophotomètre adapté pour les microplaques de titration (Titertek Multiskan MCC/340, Labsystem group, Les Ulis, France).

## DEUXIEME PARTIE : BIOLOGIE MOLECULAIRE

### 1. Préparation de l'ADN

#### 1.1. ADN génomique

Les mollusques décortiqués sont plongés dans l'azote liquide, puis réduits en poudre fine. Le matériel est repris dans 10 volumes de tampon de lyse contenant de la protéinase K (100 µg/ml) et incubé pendant 3 h à 50°C. Les protéines ainsi digérées sont éliminées par 3 extractions au phénol (1v/1v) et centrifugation à 5 000 x g (20 min, 4°C). La phase aqueuse est alors récupérée et dialysée contre un tampon de dialyse (agitation magnétique, 4°C, pendant la nuit) afin d'éliminer toute trace de phénol. Les ARN sont ensuite détruits par addition de 100 µg/ml final de RNase (DNase free) au dialysat et incubation au moins 3 h à 37°C. Deux extractions au phénol/chloroforme (0,5v/0,5v) sont suivies d'une extraction au chloroforme, puis d'une extraction à l'éther (saturé en eau). L'ADN, qui se trouve alors dans la phase inférieure, est récupéré, puis dialysé contre du TE (agitation magnétique, 4°C, pendant la nuit) et l'élimination du phénol est vérifiée par absence d'un pic à 270 nm. L'ADN, éventuellement concentré par plusieurs extractions au butanol, est ensuite précipité par 2,5 volumes d'éthanol absolu froid (3 h, -20°C). Après 10 min de centrifugation à 5 000 x g, le culot d'ADN est lavé avec 1 volume d'éthanol 70% froid. Il est alors repris dans du tampon TE et gardé à 4°C. La concentration est mesurée à 260 nm à l'aide d'une fraction aliquote. Le calcul de la concentration d'ADN se fait d'après la relation: 1 D.O. = 50 µg/ml. Le rapport de densité 260 nm/280 nm doit être compris entre 1,8 et 2,0.

#### Tampon de lyse

EDTA pH 8	0,5 M
Protéinase K	100 µg/ml
Sarcosyl	0,5%

#### Tampon de dialyse

Tris-base pH 8	50 mM
EDTA	100 mM
NaCl	10 mM

## Tampon TE

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

### 1.2. ADN plasmidique bactérien

#### 1.2.1. ADN des plasmides contenant l'insert TNF $\alpha$ humain

Des maxi-préparations d'ADN ont été réalisées à partir du plasmide PRS1 contenant un fragment du TNF $\alpha$  humain afin d'en réaliser la séquence. Par la suite, pour des raisons techniques, ce fragment a été excisé (digestion par les enzymes Hind III et Pst1), purifié par la technique GENECLEAN (voir paragraphe 1.2.3.) et inséré dans un autre plasmide, le pBluescript KS à partir duquel d'autres maxi-préparations d'ADN ont été réalisées. Quelqueroit le plasmide en question, le même protocole a été utilisé:

500 ml d'une culture "over night" en LB Ampicilline sont centrifugés pendant 15 min à 3000 x g et à 4°C et après avoir éliminé le surnageant, le culot bactérien est lavé par 45 ml de solution STE. Il est ensuite resuspendu dans 4 ml de GET-Lysozyme (5 min sous agitation à température ambiante) puis mis au contact de 8 ml de NaOH-SDS (10 min dans la glace) et de 6 ml d'Acétate de potassium 3 M, pH 4,8 (10 min dans la glace). Le mélange est alors centrifugé à 3000 x g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant, filtré à travers une gaze, est mis au contact de 0,6 volumes d'isopropanol pendant 15 min à température ambiante. Après 30 min de centrifugation à 3000 x g et à température ambiante, le culot est récupéré, puis lavé en éthanol 70% et séché avant d'être resuspendu dans 2,8 ml de TE, 3,22 g de CsCl et 30  $\mu$ l de BET (10 mg/ml). Le mélange est transféré dans deux tubes Quick Seal (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Une fois scellés, les tubes sont mis à centrifuger pendant 8 h à 80 000 rpm (accélération : 0; décélération : 9) dans le rotor TLA 100.2 de l'ultracentrifugeuse TL 100 (Beckman). La bande rose due au BET fixé sur l'ADN, est récupérée à l'aide d'une seringue. Le BET est extrait par deux volumes d'isobutanol, puis le chlorure de césium est éliminé par dialyse contre du TE. L'ADN est précipité en ajoutant 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 volumes

d'éthanol absolu à -20°C pendant la nuit. Plusieurs lavages en éthanol sont nécessaires pour éliminer les sels. L'ADN est finalement repris dans de l'eau ultra-pure et gardé à 4°C.

#### Solution STE

Tris	10 mM
EDTA pH 7,5	1 mM
NaCl	0,1 M

#### Tampon TE

Tris	10 mM
EDTA pH 7,5	1 mM

#### 1.2.2. ADN du plasmide PCR II contenant les inserts OB5 et OB14

La préparation de l'ADN du plasmide PCR<sup>TM</sup> II contenant les inserts OB5 et OB14 s'est faite à l'aide du kit Qiagen Midi-Prep (Qiagen, Coger). Le protocole suivi est exactement celui recommandé par les fabricants et permet de travailler à partir de 100 ml d'une culture "over-night" en milieu LB. Brièvement, le culot bactérien est resuspendu dans 4 ml de tampon P1, puis 4 ml de tampon de lyse P2, et incubé à température ambiante pendant 5 min. 4 ml de tampon P3 froid sont rajoutés et le mélange est laissé 15 min dans la glace. Après une centrifugation à 30 000 x g pendant 30 min à 4°C, le surnageant est récupéré et déposé sur une colonne préalablement équilibré en tampon QBT. Les lavages sont effectués avec 10 ml de tampon QC, et 5 ml de tampon d'élution QF permettent de récupérer l'ADN. Celui-ci est précipité par 0,7 volumes d'isopropanol, puis lavé en éthanol 70% froid et repris dans de l'eau ou du TE et stocké à 4°C.

#### Tampon P1 (resuspension)

RNase	100 µg/ml
Tris-HCl	50 mM
EDTA pH 8	10 mM

#### Tampon P2 (lyse)

NaOH	200 mM
SDS	1 %

#### Tampon P3 (neutralisation)

KAc pH 5,5	3 M
------------	-----

#### Tampon QBT (équilibration) pH 7

NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
Ethanol	15 %
Triton X100	0,15 %

Tampon QC (lavage) pH 7

NaCl	1 M
MOPS	50 mM
Ethanol	15 %

Tampon QF (élution) pH 8,5

NaCl	1,25 M
Tris-HCl	50 mM
Ethanol	15%

1.2.3. Purification d'un fragment d'ADN issu d'un plasmide

La technique GENE CLEAN (BIO 101, La Jolla, CA, USA) a été choisie pour purifier un fragment d'ADN issu d'une maxi-préparation de plasmide car elle est rapide et donne de bons rendements.

Une fois excisé du plasmide par une digestion enzymatique appropriée et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, l'insert est visualisé sous lumière UV à 354 nm puis récupéré délicatement. La bande d'agarose est pesée afin d'évaluer approximativement son volume, puis transférée dans un tube (polypropylène). On ajoute 4,5 volumes de NaI, 0,5 volume de TBE et le mélange est chauffé pendant 5 min à 45-55°C. Lorsque tous les morceaux d'agarose ont fondu, le mélange est mis en présence de 10 µl de solution GLASSMILK (matrice de silice en suspension dans l'eau) pendant 5 min à température ambiante et sous agitation (roue). Une très brève (5 sec) centrifugation est ensuite effectuée et le culot (complexe GLASSMILK/ADN) est lavé 3 fois avec 10 à 50 volumes de solution de lavage NEW. Le surnageant est alors éliminé jusqu'à la dernière goutte. Le culot est repris dans 10 µl de TE pH 8 et l'ADN est élué par une incubation de 2 à 3 min à 55°C. Après une brève centrifugation, le surnageant contenant l'ADN élué est récupéré délicatement. Une deuxième élution réalisée avec 5 µl de TE permet de récupérer encore 10 à 20% de matériel, mais une troisième élution s'avère inutile. Les deux éluats sont mélangés et 1/10 de la préparation est analysée sur gel d'agarose. Le rendement obtenu est supérieur à 80% et lorsqu'on compare l'intensité des bandes colorées au BET, il semble être de 100%.

### Solution de lavage NEW:

NEW Wash concentré (NaCl, Tris, EDTA)	1,4 ml
H <sub>2</sub> O	28 ml
Ethanol	31 ml

Une autre technique de purification, la technique “Magic™ PCR Prep” (Promega) a été utilisée pour purifier directement des fragments d’ADN amplifiés par PCR, dans le but de les séquencer. Dans un microtube à centrifuger, 25 µl de produit PCR + 25 µl d’H<sub>2</sub>O sont mélangés à 100 µl de tampon de purification directe. 1 ml de résine Magic PCR Prep est ajouté et l’ensemble est vigoureusement mélangé pendant 1 min. La suspension résine/ADN, déposée sur une “Magic minicolumn” prête à l’emploi, est introduite grâce à l’action d’un piston. De la même façon, la colonne est lavée par 2 ml d’isopropanol 80% puis séchée par une brève (20 sec) centrifugation à 12 000 x g. Pour l’élution de la colonne, 50 µl d’eau sont déposés en surface, et après une min d’attente, une nouvelle centrifugation brève permet de récupérer l’ADN au fond du tube. L’analyse sur gel d’agarose d’une fraction aliquote permet d’évaluer la concentration de l’insert purifié.

### Tampon de purification directe

KCl	50 mM
Tris-HCl pH 8,8	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Triton X100	0,1%

### 1.3. ADN phagique (mini-préparation)

Chaque plage de lyse est mise au contact de 200 µl de bactéries compétentes Y1090 (voir paragraphe 5.3.1.) pendant 30 min à 37°C, puis 5 ml de LB et 50 µl de MgCl<sub>2</sub> 1M sont ajoutés dans chaque tube. Ceux-ci sont incubés pendant 6 à 7 h (sous agitation à 37°C) jusqu’à ce que la lyse soit observée, par rapport à un contrôle ne contenant que des bactéries compétentes. Les tubes sont alors centrifugés à 3 000 x g pendant 15 min et chaque surnageant, transféré dans un nouveau tube, est incubé à 37°C en

présence de DNase (1 mg/ml) et de RNase (1 mg/ml) pendant 30 min. Les tubes sont ensuite plongés dans la glace et le matériel est précipité par du NaCl 2M/PEG 20% (1v/2v) pendant 1 h minimum. Après 30 min de centrifugation à 5 000 x g, les culots de phages sont récupérés et resuspendus par 400 µl de SM. Les tubes sont alors placés à 68°C pendant 15 min en présence de SDS 0,1% et d'EDTA 5 mM pH 8. Après les extractions au phénol, phénol/chloroforme et chloroforme, l'ADN est précipité (3 h à -20°C minimum) en ajoutant 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Un lavage à l'éthanol 70% est ensuite effectué et l'ADN est resuspendu dans l'eau ultra-pure et gardé à 4°C.

La quantité d'ADN préparé par cette technique est faible, mais elle permet néanmoins de connaître rapidement (après digestion enzymatique appropriée et électrophorèse sur gel d'agarose) la taille de l'insert du clone sélectionné. D'autre part, l'insert peut être également amplifié par PCR et sous-cloné dans un plasmide permettant son séquençage, ce qui évite le protocole classique mais lourd des maxi-préparations de phages et du sous-clonage en M13.

### SM

Tris-HCl 7,5	50 mM
NaCl	100 mM
MgSO <sub>4</sub>	8 mM
Gélatine	0,01%

### Milieu LB (pH 7,5)

Bacto-Tryptone	10 g
Bacto-Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1 L

## 2. Préparation de l'ARN

### 2.1. ARN total

Tout le matériel et toutes les solutions sont traitées au diéthylpyrocarbonate (DEPC, Fluka) et autoclavées pendant deux heures afin d'inhiber les RNases.

Les mollusques décortiqués sont plongés dans l'azote liquide, puis réduits en poudre fine. Après homogénéisation dans la solution I à l'aide de l'appareil Ultraturrax, les corps sont soumis à une sonication dans la glace (cinq fois 30 secondes) et centrifugés 30 min à 10 000 x g à 4°C. Le surnageant (environ 3 ml) est déposé sur

un coussin de 1,5 ml de chlorure de césium (Solution II) dans un tube d'ultracentrifugation (Polyallomer, Beckmann), puis centrifugé pendant 20 heures à 28 000 trs/min (100 000 x g) et à 18°C (Ultracentrifugeuse L8M, rotor SW55 Ti, Beckman). Le surnageant est alors éliminé et l'ARN (culot opalescent) est repris dans l'eau. Après les extractions au phénol/chloroforme (1v/1v) et au chloroforme/alcool isoamylique (24v/1v), l'ARN est précipité (3 h à -20°C minimum) en ajoutant 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Un lavage à l'éthanol 70% est ensuite effectué et l'ARN est resuspendu dans de l'eau traitée au DEPC. La concentration est mesurée à 260 nm à l'aide d'une fraction aliquote. Le calcul de la concentration d'ARN se fait d'après la relation: 1 D.O. = 30 µg/ml.

Solution I:

Guanidium isothiocyanate 4M	23,63 g
EDTA 0,5M pH 7,4	100 µl
Acétate de Sodium 0,1M pH 5,5	2,5 ml
β Mercaptoéthanol	2,5 ml
Sarcosyl	1 g
Eau RF	qsp 50 ml

Solution II:

CsCl	24,9 g
EDTA 0,5M pH 7,4	500 µl
Ac Na 0,1M pH 5,5	625 µl
Eau RF	qsp 50 ml

2.2. ARN polyadénylé

L'ARN polyadénylé [poly (A)<sup>+</sup>] est purifié à partir de l'ARN total (préparé comme décrit dans le paragraphe 1.1.) à l'aide d'un kit de purification des ARN messagers (Pharmacia LKB Biotechnology). Le principe de ce kit est basé sur l'utilisation de colonnes à centrifuger, prêtes à l'emploi, contenant de l'oligo(dT)-cellulose.

Le protocole suivi est exactement celui recommandé par les fabricants:

- Dissoudre quelques mg d'ARN total dans 1 ml de tampon d'élution
- Chauffer l'échantillon 5 min à 65°C, puis le refroidir rapidement
- Ajouter 0,2 ml de tampon d'échantillon et mélanger doucement
- Déposer l'échantillon d'ARN sur la colonne à centrifuger préalablement équilibrée en tampon "haute salinité" et le laisser pénétrer sans centrifuger



- Centrifuger 2 min à 350 x g
- Laver la colonne par 0,25 ml de tampon “haute salinité”, et centrifuger 2 min à 350 x g
- Répéter une fois cette étape de lavage
- Laver la colonne par 0,25 ml de tampon “basse salinité”, et centrifuger 2 min à 350 x g
- Répéter deux fois cette étape de lavage
- Pour l'éluion de l'ARN poly(A)<sup>+</sup> hybridé, laver quatre fois la colonne avec des fractions aliquotes de 0,25 ml de tampon d'éluion, préchauffé à 65°C. Centrifuger 2 min à 350 x g après chaque dépôt et recueillir la totalité de l'éluat dans le même tube stérile.

Si l'éluat doit être à nouveau purifié, répéter les différentes étapes en traitant l'éluat comme s'il s'agissait d'ARN total dans du tampon d'éluion. Après avoir dénaturé par la chaleur la totalité de l'éluat, le refroidir, ajouter 0,2 ml de tampon d'échantillon puis le déposer sur une seconde colonne.

- L'éluion est suivie par mesure de l'absorbance à 260 nm. L'ARN est précipité (3 h à -20°C minimum) en ajoutant 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Après centrifugation à 10 000 x g et à 4°C pendant 15 min, le culot est lavé en éthanol 70%, puis resuspendu dans de l'eau traitée au DEPC et stocké à -70°C.

Tampon “haute salinité”

Tris-HCl	10 mM (pH 7,4)
EDTA	1 mM
NaCl	0,5 M

Tampon “basse salinité”

Tris-HCl	10 mM (pH 7,4)
EDTA	1 mM
NaCl	0,1 M

Tampon d'échantillon

Tris-HCl	10 mM (pH 7,4)
EDTA	1 mM
NaCl	3 M

Tampon d'éluion

Tris-HCl	10 mM (pH 7,4)
EDTA	1 mM

Environ 50% de l'ARN récupéré à partir de la première colonne à centrifuger est de l'ARN poly (A)<sup>+</sup>. La seconde étape de chromatographie sur colonne à centrifuger augmentera la proportion d'ARN poly (A)<sup>+</sup> à plus de 90%, mais le rendement sera alors réduit.

### 3. Séparation et transfert des acides nucléiques

#### 3.1. Southern blot

L'ADN digéré par les enzymes de restriction est séparé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (1%). Lorsque la migration est terminée, le gel est coloré par une solution de bromure d'éthidium (BET) et l'ADN est visualisé sous lumière UV à 354 nm afin de vérifier le profil de restriction. Dans certains cas, l'ADN est traité avec 0,25 M HCl, étape nécessaire pour fragmenter les grands fragments d'ADN (>10 kbp) et assurer leur transfert sur membrane. En cas de transfert sur nitrocellulose, (0,45 µm, Schleicher et Schnell, Dassel, Deutschland), l'ADN est dénaturé en NaCl 1,5 M/NaOH 0,5 M (2 x 20 min sous agitation), neutralisé en NaCl 1,5 M/Tris 0,5 M (mêmes conditions) puis transféré passivement par la technique de Southern (1975). Le transfert sur membrane de nylon (Hybond N ou N+, Amersham, Les Ulis, France) est plus efficace avec un système sous-vide "vacugene" (LKB) en milieu alcalin (NaCl 1,5 M/NaOH 0,5 M). Après transfert, la membrane est lavée dans du 2 X SSC afin d'enlever les restes d'agarose. Dans le cas de la nitrocellulose, le matériel est fixé par cuisson de la membrane 2 h à 80°C. Pour une membrane de nylon, la fixation de l'ADN par une exposition de 3 min sous rayons UV (354 nm) est préférable.

#### 3.2. Northern blot

Tout le matériel et toutes les solutions sont traitées au DEPC et il est indispensable de porter des gants pour manipuler. L'ARN est séparé sur gel d'agarose/formaldéhyde. La formaldéhyde étant fortement toxique, le gel est préparé sous hotte chimique.

Pour faire 50 ml de gel, 0,5 g (1%) d'agarose NA (Pharmacia) sont dissous dans 36 ml d'eau et 5 ml de MOPS/EDTA X 10. Quand le mélange est refroidi à 60°C, 9 ml de formaldéhyde à 37% (2,2 M) sont rajoutés (sous hotte) et le gel est coulé immédiatement. Après 1 h minimum de gélification, le gel est soumis à une pré-électrophorèse (60 V, 30 min). Pendant ce temps, la préparation des échantillons a été faite comme suit:

- ajouter 2,2 µl de Tampon A et dissoudre l'ARN (20 µg maximum)
- ajouter 4,8 µl du mélange formaldéhyde 2,2 M/formamide 50%
- chauffer les tubes à 70°C pendant 10 min et refroidir immédiatement après dans la glace
- ajouter 1,5 µl de tampon échantillon puis mélanger

Le tampon d'électrophorèse est redistribué entre les deux compartiments de la cuve, les échantillons sont déposés et l'électrophorèse commence. Lorsque le front de migration atteint les 2/3 du gel (soit environ 9 cm, en général après 1 h à 60 V puis 2 h à 100 V), la migration est stoppée. Le gel est alors coupé en deux: une partie contenant les marqueurs (Boehringer) est colorée au BET, tandis que l'autre partie contenant à la fois les marqueurs et les échantillons est plongée successivement dans des bains de NaOH/NaCl 10 mM (45 min), de Tris 0,5 M pH 7,5 (45 min), puis de 20 X SSC. Le transfert est réalisé en vacugene sur membrane de nitrocellulose (50 min en 20 X SSC). Le filtre est ensuite lavé rapidement en 2 X SSC, séché, puis fixé par 2 h de cuisson à 80°C.

Tampon MOPS-EDTA X 10

MOPS	0,5 M
EDTA pH 7,5	0,01 M

Tampon A

MOPS-EDTA	294 µl
Eau	706 µl

Tampon d'échantillon

Tampon A	322 µl
Sucrose RF	400 mg
Formaldéhyde 37%	178 µl
Formamide	500 µl

Tampon d'électrophorèse

MOPS/EDTA X 1

## 4. Marquage et hybridation des acides nucléiques

### 4.1. Marquage de l'insert TNF $\alpha$ humain

L'insert TNF $\alpha$  humain purifié par la technique GENE CLEAN (voir paragraphe 1.2.3.) a été marqué par l' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP selon le protocole du kit "Multiprime DNA labelling" (Amersham):

- 1  $\mu$ l d'insert (à environ 25 ng/ml) + 27  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O sont chauffés 2 min à 100°C, puis refroidis quelques instants dans de la glace.

- puis 10  $\mu$ l de tampon de réaction,

5  $\mu$ l de solution d'amorces,

5  $\mu$ l d' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (50  $\mu$ Ci,  $\approx$  110 TBq/mmol, Amersham)

et 2  $\mu$ l d'enzyme de Klenow (1 U/ $\mu$ l, Boehringer) sont mélangés et incubés 30 min à 37°C ou pendant la nuit à température ambiante.

- le matériel est ensuite précipité par 1 volume d'Acétate d'ammonium 4 M et 4 volumes d'éthanol absolu (-70°C, 30 min minimum). Après 10 min de centrifugation à 5 000 x g, l'ADN est lavé avec un volume d'éthanol 70% froid, puis repris dans 50  $\mu$ l d'eau ou de TE. L'efficacité du marquage est vérifiée par comptage de la radioactivité d'une fraction aliquote (1  $\mu$ l).

### 4.2. Marquage de l'insert OB5

L'insert OB5 a été amplifié par PCR, puis marqué par l' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP selon le protocole du kit "Ready to go" (Pharmacia):

- 25 à 50 ng d'ADN dissous dans 45  $\mu$ l (maximum) d'eau ou de TE sont chauffés 2 min à 100°C, refroidis quelques instants dans de la glace puis centrifugés brièvement.

Dans un tube contenant le mélange de réactifs, sont ajoutés:

- l'ADN dénaturé (25-50 ng) <45  $\mu$ l

- l' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (50 mCi, Amersham) 5  $\mu$ l

- H<sub>2</sub>O qsp 50  $\mu$ l

L'ensemble est mélangé par une brève centrifugation, et la réaction se déroule pendant 30 min à 37 °C.

En général, l'ADN marqué peut être utilisé immédiatement comme sonde, sans qu'il soit nécessaire d'arrêter la réaction.

#### Mélange de réactifs:

- dATP, dGTP, dTTP
- Enzyme de Klenow (4-8 unités)
- mélange aléatoire d'oligodéoxyribonucléotides (essentiellement des nonamères)

### 4.3. Hybridations

#### 4.3.1. Hybridation en système homologue

Après transfert de l'ADN (Southern blot), la membrane est préhybridée pendant 3 heures à 65°C. La solution de préhybridation est ensuite remplacée par la solution d'hybridation contenant l'ADN marqué à l' $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-dCTP ( $\approx 1 \times 10^6$  cpm/ml final) et l'hybridation se fait à 65°C pendant toute la nuit. Le lendemain, la membrane est lavée 1 x 15 min à température ambiante et 2 x 15 min à 65°C en 2 X SSC, puis en conditions de plus en plus stringentes : 1 X SSC/0,1% SDS pendant 30 min à 65°C, puis 0,1 X SSC/0,1% SDS dans les mêmes conditions. La membrane est mise en exposition avec un film photographique (Kodak X-OMat AR) qui est ensuite révélé.

#### Solution de préhybridation

Formamide		10 ml
Tampon phosphate pH 6,8	1M	2,5 ml
20 X SSC		15 ml
Denhardt X 50		5 ml
ADN de sperme de saumon	1 mg/ml	500 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	qsp	50 ml

#### Solution de Denhardt (X 50)

Ficoll		1%
BSA		1%
Polyvinylpyrrolidone		1%
Eau	qsp	100%

#### Solution d'hybridation

Elle est identique à la solution de préhybridation, à l'exception de la sonde -préalablement dénaturée- qui est rajoutée.

## 20 X SSC

Chlorure de sodium	175,3 g
Citrate de sodium	88,2 g
Eau ultra-pure	800 ml

Ajuster le pH à 7,0 et compléter à 1 litre.

### 4.3.2. Hybridation en système hétérologue

La composition des solutions est identique à celle décrite en système homologue, mais dans ce cas, la préhybridation et l'hybridation sont effectuées à 42°C. Le lendemain, la membrane est lavée 2 x 15 min à température ambiante en 3 X SSC, puis 2 x 30 min à 42°C en 1 X SSC/0,1% SDS. Un film photographique est ensuite mis au contact de la membrane (24 heures minimum), puis il est révélé.

## 5. Criblage

### 5.1. Criblage d'une banque cDNA de *Biomphalaria glabrata*

Une banque cDNA de *B.glabrata* construite en  $\lambda$ gt11 par Dissous et Coll.(1990) a été utilisée pour rechercher la séquence codante de la molécule apparentée au TNF $\alpha$  à l'aide de l'insert TNF $\alpha$  humain marqué à l' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP. Une fraction aliquote de la banque est mise en contact avec des bactéries-hôtes *E. coli*, souche Y1090, rendues compétentes par MgSO<sub>4</sub>, puis est étalée sur milieu nutritif LB-Ampicilline (à 37°C, pendant la nuit). Le lendemain, l'ADN des plages de lyse est transféré sur filtre de nitrocellulose par la technique des "empreintes". L'ADN est ensuite dénaturé 2 min en NaCl 1,5 M/NaOH 0,5 M puis neutralisé 2 min en NaCl 1,5 M/Tris 0,5 M. Les filtres sont alors rincés rapidement en 2 X SSC, égouttés, séchés et l'ADN est fixé par cuisson des filtres à 80°C pendant deux heures. Les filtres sont ensuite préhybridés puis hybridés comme décrit dans le paragraphe 4.3.2.(système hétérologue).

### Milieu LB-Amp (pH 7,5)

Bacto-Tryptone	10 g
Bacto-Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1 L

### Bacto-Agar LB

Bacto-Agar	1,5%
LB	qsp 100%

### Top Agar LB

Agarose NA	0,7%
LB	qsp 100%

Pour chacun de ces milieux:

Autoclaver 20 min

Rajouter l'Ampicilline (50 µg/ml) quand le milieu est à 50°C.

## 5.2. Criblage d'une banque d'expression de *Biomphalaria glabrata*

Le criblage de la banque d'expression de *Biomphalaria glabrata* a été entrepris avec le sérum polyclonal de lapin anti-TNF $\alpha$  humain (neutralisant, Genzyme, USA). Une fraction aliquote de la banque d'ADNc est mise en contact avec les bactéries-hôtes *E. coli*, souche Y1090, rendues préalablement compétentes par MgSO<sub>4</sub>, puis est étalée sur milieu nutritif LB-Ampicilline. Lorsque les plages de lyse commencent à apparaître, soit après environ 2 h d'incubation à 42°C, des filtres de nitrocellulose préalablement imbibés d'IPTG 10 mM puis séchés, sont déposés à la surface des tapis bactériens. L'IPTG des membranes va induire l'expression des protéines de fusion. Après 4 h d'incubation à 37°C, les filtres sont délicatement retirés, lavés en PBS 10 mM/Tween 0,05% (2 x 5 min à température ambiante et sous agitation) et saturés en PBS 10 mM/Lait écrémé 5%. Le sérum, préalablement épuisé contre un lysat bactérien (Y1090), est dilué au 1/100 dans du PBS/Lait, et mis au contact des filtres pendant la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 10 min en PBS-Tween 0,05% et un lavage en PBS seul, les filtres sont incubés 2 h à température ambiante en présence d'un deuxième anticorps (conjugué de chèvre dirigé contre les IgG de lapin : Diagnostic Pasteur, France) couplé à la peroxydase. Une nouvelle série de lavages précède la révélation de la réaction. Celle-ci se fait avec le 4 chloro-1-naphtol, qui donne en présence de la peroxydase une coloration bleue-violette des plages positives. Celles ci sont repiquées avec une pointe de pipette ou un cure-dent stérile et éluées dans 1

ml de tampon SM (une nuit, à 4°C). Après titrage, 500 pfu sont platées sur une boîte de 9 mm de diamètre et recriblées. Un troisième criblage permet de s'assurer de la pureté des plages.

### 5.3. Annexe

#### 5.3.1. Préparation de bactéries Y1090 compétentes

5 ml de milieu LB-Ampicilline sont ensemencés avec une colonie de bactéries Y1090. Après une nuit de culture en incubateur à 37°C, une nouvelle culture est préparée par inoculation de 300 µl de la culture "over night" dans 10 ml de milieu neuf. Lorsque la D.O. 600 nm est de 0,7, les bactéries sont centrifugées et le culot est repris par du MgSO<sub>4</sub> 10 mM de façon à obtenir une D.O. égale à 2. Après une heure d'incubation à 37°C, les bactéries sont compétentes et peuvent être stockées quelques jours à + 4°C.

#### 5.3.2. Préparation d'un lysat bactérien

- Ensemencer 10 ml de milieu LB-Ampicilline avec une colonie de bactéries Y1090 et incuber une nuit à 37°C.
- Relancer la culture dans 50 ml de milieu neuf (une nuit, à 37°C).
- A partir de cette culture, relancer une nouvelle culture de 400 ml pendant 2,5 h.
- Centrifuger à 3000 tours/min pendant 10 min, à 4°C.
- Reprendre le culot bactérien dans 20 ml de PBS.
- Congeler le culot dans l'azote liquide, puis le décongeler à 42°C de façon à faire éclater les cellules.
- Soumettre le culot aux ultra-sons (puissance maximale) pendant 5 min.
- Conserver à -20°C.

#### 5.3.3. Epuisement d'un sérum par un lysat bactérien

- Mettre en contact 1 volume de sérum avec 10 volumes de PBS et 10 volumes de lysat bactérien.



- Incuber une nuit à 4°C sous agitation
- Centrifuger à 5 000 x g pendant 10 min.
- Récupérer le surnageant, le congeler ou le diluer au 1/100 en PBS/Lait comme décrit ci-dessus en cas d'utilisation immédiate.

## 6. Sous-clonage

### 6.1. Sous-clonage en vecteur phagique M13

L'insert TNF $\alpha$  humain cloné dans le vecteur plasmidique PRS1 et amplifié comme décrit dans la section 1.2.1. , est excisé par digestion enzymatique. Une fraction aliquote de la digestion est vérifiée sur gel d'agarose et l'ensemble de la digestion est ligué dans les bras du vecteur M13 mp18 ou M13 mp19 (Pharmacia). Les vecteurs recombinants sont ensuite introduits dans les bactéries *E. coli*, souche TG1, selon le protocole de transformation au TFB.

### 6.2. Sous-clonage en plasmide PCR<sup>TM</sup> II

Les inserts OB5 et OB14 amplifiés par PCR (§ 8.) et purifiés sur colonne "Magic Prep" (§ 1.2.3.), ont été sous-clonés dans le plasmide PCR<sup>TM</sup> II du kit "TA Cloning" (Invitrogen, San Diego, CA, USA) en vue de leur séquençage. Après l'étape de ligation, les vecteurs recombinants pénètrent les bactéries *E. coli*, souche JM 109, rendues compétentes pour la transformation par la méthode au SOC.

## 6.3. Annexe

### 6.3.1. Préparation de bactéries TG1 compétentes

A partir d'une colonie de bactéries TG1 maintenues sur milieu solide M9, une culture est lancée (37°C, sous agitation) en milieu 2TY. Lorsque la D.O. 660 nm est environ égale à 1, une partie de la culture est stockée à 4°C ("cellules fraîches"), tandis que l'autre partie est laissée 15 min dans la glace, puis centrifugée pendant 10 min à 2 000 x g. Le culot est ensuite repris par

500 µl de TFB, puis

20 µl de DMSO,(5 min dans la glace)

20 µl de beta-mercapto éthanol 2,25 M, (10 min dans la glace)

20 µl de DMSO (5 min dans la glace)

afin de rendre les membranes bactériennes perméables.

A cette étape, les bactéries sont compétentes, prêtes pour la transformation; elles peuvent être conservées pendant une nuit dans la glace et à 4°C.

#### TFB

KMES 1M pH 6,2	1 ml
KCl	0,74 g
MnCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,89 g
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,15 g
HACoCl <sub>3</sub>	0,08 g
RbCl	1,21 g
H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml
stérile, filtré 0,2 µ, stocké à 4°C	

#### Milieu 2TY (pH 7,4)

Tryptone	16 g
Yeast extract	10 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1 L

#### Milieu M9

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g	MgSO <sub>4</sub> 1M	2 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g	CaCl <sub>2</sub> 1M	0,1 ml
NaCl	0,5 g	glucose 20%	10 ml
NH <sub>4</sub> Cl	1 g	Thiamine-HCl 1	1 ml
agarose	15 g		
H <sub>2</sub> O	qsp 1 l		

#### 6.3.2. Transformation des bactéries TG1

- mettre en contact le vecteur reliqué (10 µl maximum) et 50 µl de bactéries compétentes dans de la glace, pendant 20 min minimum
- réaliser dans les mêmes conditions un contrôle de compétence en remplaçant simplement le vecteur reliqué par le vecteur sauvage (10 µl à 0,25 ng/µl)
- provoquer un choc thermique en incubant sans transition les tubes dans un bain-marie à 40-41°C pendant 2 min
- ajouter dans chaque tube

20 µl d'IPTG (20 mg/ml dans l'eau)

50 µl d'X Gal (20 mg/ml dans le diméthylformamide)

2,5 ml de Top Agar LB stabilisé à 50°C

- mélanger et plater sur des boîtes LB, puis les incuber à 37°C pendant la nuit
- le lendemain, les plages blanches sont repérées tandis que le contrôle ne doit contenir que des plages bleues.

### 6.3.3. Préparation de bactéries JM 109 compétentes

Une culture de 25 ml en milieu LB est lancée à partir de 250 µl d'une préculture de nuit. Lorsque la D.O.<sub>550 nm</sub> est d'environ 0,5, les bactéries sont refroidies dans la glace pendant 15 min, puis centrifugées 5 min à 2 000 x g. Le culot est alors repris par 2 ml de TFB, puis par

84 µl de DMSO (5 min dans la glace)

84 µl de beta-mercapto éthanol 2,25 M, (10 min dans la glace)

84 µl de DMSO (5 min dans la glace).

A cette étape, les bactéries sont compétentes, prêtes pour la transformation.

### 6.3.4. Transformation des bactéries JM 109

- Mettre en contact pendant 1 à 2 min dans la glace, 50 µl de bactéries et 2 µl de β-mercaptoéthanol
- Ajouter 1 µl de la ligation et laisser en contact pendant 30 min dans la glace
- Provoquer un choc thermique en incubant le mélange pendant 1 min à 42°C et en le remettant immédiatement dans la glace pendant 2 min
- Ajouter 450 µl de SOC préchauffé à 37°C
- Incuber 1 h à 37°C sous agitation
- Etaler sur boîte LB-Kanamycine (50 µg/ml), supplémenté par 25 µl d'X-Gal (40 mg/ml) étalé en surface au moins une heure à l'avance.
- Incuber pendant la nuit à 37°C et repérer les colonies blanches le lendemain.

## SOC

Bacto-tryptone	2 %
Bacto-Yeast extract	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
autoclaver, puis rajouter	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM
stériliser par filtration sur membrane	22 μ

## 7. Séquençage

### 7.1. Séquençage manuel

Cette technique a été utilisée pour séquencer l'insert TNF $\alpha$  humain sous-cloné en phage M13 à partir du plasmide initial PRS1. A partir d'une préculture de nuit de TG1, une culture d'1 h 30 est relancée. 10 ml de celle-ci seront ensemencés par la plage blanche sélectionnée, et incubés à nouveau pour 4 h 30 de culture. Après 10 min de centrifugation, le surnageant est transféré dans un nouveau tube stérile, et le matériel précipité à température ambiante pendant 15 min par 2,5 ml de NaCl 2,5 M/PEG 20%. Après une nouvelle centrifugation, le culot est resuspendu dans 400  $\mu$ l de TE. Les extractions au phénol, phénol/chloroforme et chloroforme sont suivies d'une précipitation de l'ADN en éthanol. Celui-ci, repris dans 20  $\mu$ l d'eau sera quantifié par mesure de la D.O. 260 nm d'une fraction aliquote (relation: 1 D.O. = 30  $\mu$ g/ml).

Les matrices simple-brin de phage M13 ont été séquencées selon la méthode de terminaison de chaînes décrite par Sanger et coll. (1977) à l'aide du kit "Multiwell Microtiter Plate DNA Sequencing System" utilisant des déazadidéoxynucléotides, l' $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]-dCTP, la T7 DNA polymérase ou la Taq polymérase (Amersham). Le protocole suivi est exactement celui recommandé par les fabricants. Après dénaturation pendant 5 min à 95°C, les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide 6%, Urée 8,4 M en tampon TBE pH 7,9. Après une migration de 3 h 30 environ sous 60 Watts, le gel est fixé en Méthanol 10%/Acide acétique 10% pendant 10 min, puis

séché sous vide et autoradiographié à température ambiante (Hyperfilm  $\beta$ max, Amersham).

### 7.2. Séquençage automatique

Cette technique, introduite plus récemment dans le laboratoire, a été utilisée pour le séquençage des clones OB5 et OB14 à partir du plasmide PCR<sup>TM</sup> II. Ce système de séquençage est aussi basé sur la méthode de la terminaison de chaîne par des nucléotides didéoxy (Sanger et coll., 1977), mais au lieu d'incorporer des nucléotides radiomarqués, ce système utilise une amorce marquée à la fluorescéine. Chaque fragment fluorescent d'ADN, au cours de sa migration, passe devant un rayon laser et est enregistré sur un ordinateur. Chaque réaction de terminaison est déposée sur une piste individuelle. Ce type de séquençage a été réalisé avec le kit "AutoRead<sup>TM</sup> Sequencing" (Pharmacia LKB Biotechnology).

### 8. Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

La PCR permet l'amplification spécifique et exponentielle d'une séquence d'ADN double brin, par l'action cyclique d'une ADN polymérase. Cette technique a été utilisée pour amplifier les inserts OB5 et OB14 à partir de maxi-préparations d'ADN phagique. Les deux amorces (primers) utilisées pour amplifier chaque insert sont les séquences  $\lambda$ F et  $\lambda$ R se trouvant dans le phage  $\lambda$ gt 11, de part et d'autre du site Eco R1 contenant l'insert à amplifier.

Le protocole de la réaction PCR est le suivant:

1  $\mu$ l d'ADN (22,5 ng/  $\mu$ l)

5  $\mu$ l de tampon PCR (X 10)

8  $\mu$ l de dNTP mix (1,25 mM)

2,5  $\mu$ l d'amorces (1,25  $\mu$ l  $\lambda$ F à 10  $\mu$ M + 1,25  $\mu$ l  $\lambda$ R à 10  $\mu$ M)

33,5  $\mu$ l d'eau

sont mélangés, recouverts de 2 gouttes d'huile minérale et incubés 4 min à 94°C dans l'appareil à PCR (Perkin Elmer Cetus). 2,5 U (1 µl) de Taq polymérase (ADN polymérase thermorésistante) sont ensuite ajoutés au mélange (déposer l'enzyme sous la phase huileuse) et l'amplification commence.

La PCR est une réaction cyclique où chaque cycle comprend 3 étapes: dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces oligonucléotidiques (annealing) et synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase (extension d'amorces).

Le protocole d'amplification que nous avons utilisé est le suivant:

dénaturation 1 min à 94°C,	)	pendant 30 cycles
annealing 1 min à 55°C,	)	
extension 2,5 min à 72°C,	)	

suivi d'un cycle de 7 min à 72°C.

Lorsque la réaction est terminée, le tube est maintenu à une température de 10°C.

Pour vérifier l'efficacité de la réaction, 1/10 des produits PCR (5 µl) sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose

#### Tampon PCR X 10

Tris pH 8,3	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
Gélatine	0,1 % (p/v)
KCl	500 mM

Séquence λF (Forward) située de 16 à 37 pb en amont du site Eco R1  
5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3'

Séquence λR (Reverse) située de 22 à 44 pb en aval du site Eco R1  
5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3'

## 9. Expression des protéines recombinantes

### 9.1. Préparation de phages recombinants lysogènes

Une culture d'*E. coli*, souche Y1089, est lancée en milieu LB-Ampicilline (50 µg/ml). Lorsque la D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,7, les bactéries sont centrifugées, resuspendues en MgCl<sub>2</sub> 10 mM de manière à obtenir une D.O. égale à 2, et incubées à 37°C pendant une heure. On estime qu'une D.O. égale à 1 correspond à 8 x 10<sup>8</sup> bactéries /ml.

Parallèlement, une culture liquide de phages  $\lambda$  ( $10^{10}/\text{ml}$ ) est lancée.

Les cellules Y1089 et les phages sont alors mis en contact (rapport 1/10) en LB  $\text{MgCl}_2$  pendant 20 min à température ambiante, puis étalées sur des boîtes LB-Amp et incubées à 30°C pendant la nuit. Le lendemain, chaque colonie isolée est repiquée sur deux boîtes LB-Amp qui seront incubées respectivement à 30°C et à 42°C pendant une nuit. Les clones capables de donner des colonies à 30°C mais pas à 42°C sont dits lysogènes pour le bactériophage  $\lambda\text{gt}11$  recombinant.

## 9.2. Préparation de la protéine de fusion

A partir d'une préculture de nuit (LB-Amp/30°C) du phage recombinant sélectionné, deux cultures identiques sont relancées jusqu'à obtenir une D.O.<sub>600 nm</sub> égale à 0,45. Un choc thermique est alors provoqué par incubation des cellules à 42°C pendant 20 min. Une des deux cultures est supplémentée en isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) 10 mM, permettant d'induire la synthèse de la protéine de fusion. Après 1 h d'incubation à 37°C, les cultures sont centrifugées à 3 000 x g pendant 10 min. Les culots sont resuspendus dans du tampon de lyse auquel ont été rajoutés du lysozyme et de la DNase et le mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante. Les tubes sont centrifugés à 2 500 x g pendant 10 min; les surnageants sont stockés tels quels à -20°C tandis que les culots sont d'abord resuspendus dans du tampon échantillon protéique. La protéine recombinante est recherchée à la fois dans le culot et le surnageant. D'autre part, la comparaison des lysats de cultures avec et sans IPTG permet d'identifier facilement la protéine de fusion.

### Tampon de lyse

Tris pH 8	10 mM		
NaCl	0,1 mM		
EDTA	10 mM		
A 10 ml de tampon de lyse, ajouter:		Lysozyme	2,5 mg
		Triton	200 $\mu\text{l}$ (2 %)
		$\text{MgCl}_2$ 1M	100 $\mu\text{l}$ (10 mM)
		DNase 1 mg/ml	10 $\mu\text{l}$ (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

## Tampon échantillon

Tris pH 6,8	62,5 mM
SDS	2 %
$\beta$ -mercaptoéthanol	10 %
Bleu de bromophénol	

## 10. Analyse des séquences nucléiques et protéiques

### 10.1. Analyse des séquences primaires en acides nucléiques et en protéines

L'analyse en séquence primaire est réalisée grâce aux programmes "DNASTAR" (MAPSEQ/PROSCAN/AMINO ACID ALIGN) et "PC Gene" (IntelliGenetics).

### 10.2. Analyse des séquences protéiques en deux dimensions

L'analyse de la répartition des résidus hydrophobes d'une protéine, ou HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) a été décrite par l'équipe de Mornon (Gaboriaud et coll., 1987). Cette méthode permet la représentation bidimensionnelle de la structure d'une protéine et offre des possibilités considérables pour la comparaison de différentes structures protéiques (Lemesle-Varloot et coll., 1990).

Le programme "HCA plot" permet de déterminer rapidement, suivant la répartition des résidus hydrophobes, la parenté d'une protéine à d'autres molécules de structure connue. De plus, il présente l'avantage de mettre en évidence des homologues conformationnelles, particulièrement celles formées par la juxtaposition d'acides aminés normalement éloignés dans la structure primaire.



# BIBLIOGRAPHIE

□

Abdel-Wahab, M.F. In: "Schistosomiasis in Egypt". CRC Press, Inc. 1982 pp 175-188.

Amiri, P.; Locksley, R.M.; Parslow, T.G.; Sadick, M.; Rector, E.; Ritter, D.; McKerrow, J.H. Tumor necrosis factor-alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. Nature 356:604-607;1992.

Arap Siongok, T.K.; Mahmoud, A.A.F.; Ouma, J.H.; Warren, K.S.; Muller, A.S.; Handa, A.K.; Houser, H.B. Morbidity in schistosomiasis mansoni in relation to intensity of infection: study of a community in Machakos, Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg. 25:273-284;1976.

□

Bakhiet M.; Olsson, T.; Eldund, C.; Höjeberg, B.; Holmberg, K.; Lorentzen, J.; Kristensson, K. A *Trypanosoma brucei brucei*-derived factor that triggers CD8+ lymphocytes to interferon- $\gamma$  secretion: purification, characterization and protective effects *in vivo* by treatment with a monoclonal antibody against the factor. Scand. J. Immunol. 37:165-178;1993.

Balkwill, F. Cytokines - soluble factors in immune responses. Current Opinion in Immunology 1:241-249;1988.

Barbosa, F.; Carneiro, E. Penetration of *Schistosoma mansoni* miracidia in abnormal hosts. Rev. Inst. Med. Trop., Sao Paulo 7:99-102;1965.

Barracco, M.A.; Steil, A.A.; Gargioni, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88:73-83;1993.

Barral, A.; Barral-Netto, M.; Yong, E.C.; Brownell, C.E.; Twardzik, D.R.; Reed, S.G. Transforming growth factor-beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3442-3446;1993.

Barral-Netto, M.; Barral, A.; Brownell, C.E.; Skeiky, Y.A.W.; Ellingsworth, L.R.; Twardzik, D.R.; Reed, S.G. Transforming growth factor- $\beta$  in leishmanial infection: A parasite escape mechanism. Science 257:545-548;1992.

- Basch, P.F. Parasitological review: Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. Exp. Parasitol. 39:150-169; 1976.
- Basch, P.F. Relations with snail hosts. In: Schistosomes, development, reproduction and host relations. 1991 pp 172-198 Oxford University Press, New York, Oxford.
- Bayne, C.J.; Buckley, P.M.; DeWan, P.C. Macrophage-like hemocyte of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. J. Parasitol. 66:413-419; 1980 (a).
- Bayne, C.J.; Buckley, P.M.; DeWan, P.C. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 50:409-416; 1980 (b).
- Bayne, C.J.; Stephens, J.A. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata* share epitopes: antibodies to sporocysts bind host snail hemocytes. J. Inv. Pathol. 42:221-223; 1983.
- Bayne, C.J.; Loker, E.S.; Yui, M.A. Interactions between the plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *Schistosoma mansoni* (Trematoda). Parasitol. 92:653-664; 1986.
- Bayne, C.J.; Yoshino, T.P. Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism. Amer. Zool. 29:399-407; 1989.
- Beck, G.; Habicht, G.S. Isolation and characterization of a primitive interleukin-1-like protein from an invertebrate, *Asterias forbesi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7429-7433; 1986.
- Beck, G.; O'Brien, R.F.; Habicht, G.S. Invertebrate cytokines: The phylogenetic emergence of interleukin-1. BioEssays 11:62-67; 1989 (a).
- Beck, G.; Vasta, G.R.; Marchalonis, J.J.; Habicht, G.S. Characterization of interleukin-1 activity in tunicates. Comp. Biochem. Physiol. 92B:93-98; 1989 (b).
- Beck, G.; Habicht, G.S.; Cooper, E.L. A role for IL-1 and TNF in invertebrate host defense. Journal of Leucocyte Biology Suppl. 1:51; 1990 (a).

- Beck, G.; O'Brien, R.F.; Habicht, G.S. Characterization of interleukin 1 from invertebrates. In: Defense Molecules. Alan R. Liss, Inc. 1990 (b) pp 125-132.
- Beck, G.; Habicht, G.S. Purification and biochemical characterization of an invertebrate interleukin 1. Mol. Immunol. 28:577-584;1991.
- Beck, G.; O'Brien, R.F.; Habicht, G.S.; Stillman, D.L.; Cooper, E.L.; Raftos, D.A. Invertebrate cytokines III: Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. Cell. Immunol. 146:284-299;1993.
- Bethea, J.R.; Gillespie, G.Y.; Benveniste, E.N. Interleukin-1 beta induction of TNF-alpha gene expression- Involvement of protein kinase C. J. Cell Physiol. 152 (2):264-273;1992.
- Beutler, B.; Cerami, A. Introduction. In: Tumor necrosis factors: The molecules and their emerging role in medicine. (B.Beutler, ed.), 1992 pp 1-10 Raven Press, Ltd, New York.
- Bilej, M.; Brys, L.; Lucas, R.; Beschin, A.; Vercauteren, E.; De Baetseller, P. TNF-like activity of *Eisenia foetida* coelomic fluid. Dev. Comp. Immunol. 18 (S1): S66; 1994 (a).
- Bilej, M.; Lucas, R.; Brys, L.; Beschin, A.; Magez, S.; De Baetselier, P. Identification of TNF-like activity in earthworms. Eur. Cytokine Netw. 5:99; 1994(b).
- Bilharz, T.M. Fernere beobachtungen uber das die Pfortader des Menschen bewohnende *Distomum haematobium* und sein verhaltniss zu gewissen pathologischen bildungen aus brieflichen mittheilungen an professor v. Siebold vom 29. Marz 1852. Zeitschrift für Wissenschaftliche zoologie, Leipzig, 4:72-76; 1852.
- Blalock, J.E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and the neuroendocrine systems. Physiological Reviews 69:1-32; 1989.
- Bretting, H.; Stanislawski, E.; Jacobs, G.; Becker, W. Isolation and characterization of a lectin from the snail *Biomphalaria glabrata* and a study of its combining site. Biochem. Biophys. Acta 749:143-152; 1983.

Brown, K.M. Mollusca: Gastropoda. In: "Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates". Academic Press, Inc. 1991 pp 285-313.

Butterworth, A.E. Control of schistosomiasis in man. In: "The biology of parasitism". Alan R. Liss, Inc. 1988 pp 43-59.

□

Capron, A.; Biguet, J.; Rose, F.; Vernes, A. Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. II. Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de *S.mansoni*. Ann. Inst. Past. Paris 109:798-810; 1965.

Capron, A.; Dessaint, J.P. Parasites: Leurres de la communication cellulaire. Conférence INSERM, La Sorbonne, Paris, 19/12/1986

Capron, A. Les espoirs de vaccin contre la bilharziose. Pour la science. 178:30-37; 1992 (a).

Capron, A. Maladies parasitaires: des approches intégrées. Biofutur 116:39-42; 1992 (b).

Capron, A.; Dessaint, J.P. Survival strategies of parasites in their immunocompetent hosts. Advances in Neuroimmunology 2:181-198; 1992.

Capron, A. La bilharziose: Du papyrus à l'ordinateur. Le généraliste 1411:8-18; 1993 (a).

Capron, A. Un vaccin contre les bilharzioses. Stratégies et perspectives. Rev. Prat. 43:457-461; 1993 (b).

Capron, A. Le langage moléculaire des parasites. Médecine et Sciences 11:431-439; 1995.

Chaplin, D.D.; Hogquist, K.A. Interactions between TNF and Interleukin 1. In: Tumor necrosis factors: The molecules and their emerging role in medicine. (B.Beutler, ed.), 1992 pp 197-220 Raven Press, Ltd, New York.

Cheng, T.C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. Annals New York Academy of Sciences. 266:343-379; 1975.

Cheng, T.C.; Yoshino, T.P. Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacterial lipids. J. Inv. Pathol. 28:143-146; 1976.

Cheng, T.C.; Chorney, M.J.; Yoshino, T.P. Lysozyme-like activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria. J. Inv. Pathol. 29:170-174; 1977.

Cheng, T.C. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunological challenge. Comp. Pathobiol. 4:59-71; 1978.

Cheng, T.C.; Lie, K.J.; Heyneman, D.; Richards, C.S. Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda). J. Inv. Pathol. 31:57-62; 1978 (a).

Cheng, T.C.; Guida, V.G.; Gerhart, P.L. Aminopeptidase and lysozyme activity levels and serum protein concentrations in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacteria. J. Inv. Pathol. 32:297-302; 1978 (b).

Cheng, T.C.; Mohandas, A. Effect of high dosages of bacterial challenge on acid phosphatase release from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. J. Inv. Pathol. 45:236-241; 1985.

Chernin, E.; Dunavan, C. The influence of host parasite dispersion upon the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect *Australorbis glabratus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. II:455-471; 1962.

Chernin, E. Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. J. of Parasitology 56:287-296; 1970.

Combes, C. La spécificité des Schistosomes. Deuxième symposium sur la spécificité parasitaire des parasites de Vertébrés. 13-17 Avril 1981. Mém. Mus. Nation. Hist. nat. Sér. A, Zoologie 123:235-243; 1982.

Combes, C.; Delay, B.; Jarne, P.; Jourdane, J.; Pointier, J.P. Seminar on "International cooperation in the field of genetic transformation of Invertebrates and resistance to diseases". Washington, December 4-5 1992.

Connors, V.A.; Yoshino, T.P. *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 76:895-902; 1990.

Connors, V.A.; Lodes, M.J.; Yoshino, T.P. Identification of a *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory-secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes. J. Inv. Pathol. 58:387-395; 1991.

Connors, V.A.; De Buron, I.; Granath, W.O. *Schistosoma mansoni*: Interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 80:139-148; 1995.

Cooper, E.L.; Zhang, Z.; Raftos, D.A.; Habicht, G.S.; Beck, G. Development of tunicate cytokines. Dev. Comp. Immunol. 18 (S1): S66; 1994.

Corti, A.; Fassina, G.; Marcucci, F.; Cassani, G. Antigenic regions of tumor necrosis factor alpha and their topographic relationships with structural/functional domains. Molecular Immunology 29 (4):471-479; 1992.

Cousteau, C.; Yoshino, T.P. Surface membrane polypeptides associated with hemocytes from *Schistosoma mansoni*-susceptible and-resistant strains of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). J. Inv. Pathol. 63:82-89; 1994.

Crews, A.E.; Yoshino, T.P. *Schistosoma mansoni*: Effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 68:326-334; 1989.

□

Damian, R.T. Molecular mimicry: Antigen sharing by parasite and host and its consequences. Am. Naturalist 98:129-149; 1964.

De Jong-Brink, M.; Elsaadany, M.; Solis Soto, M. The occurrence of schistosomin, an antagonist of female gonadotropic hormones, is a general phenomenon in haemolymph of schistosome-infected freshwater snails. Parasitol. 103:371-378; 1991.

De Jong-Brink, M. Interference of schistosome parasites with neuroendocrine mechanisms in their snail host causes physiological changes. Advances in Neuroimmunology 2:199-223;1992 (a).

De Jong-Brink, M. Neuro-endocrine mechanisms underlying the effects of schistosome parasites on their intermediate snail host. Inv. Reprod. Dev. 22:127-138;1992 (b).

De Jong-Brink, M.; Hoek, R.M.; Bergamin-Sassen, M.J.M.; Lageweg, W. Schistosomin, an identified cytokine-like molecule, and its role in the interaction between the internal defence system and neuro-endocrine system in the snail, *Lymnaea stagnalis*. Dev. Comp. Immunol. 18 (S1):S68;1994.

Denis, M.; Campbell, D.; Gregg, E.O. Cytokine stimulation of parasitic and microbial growth. Res. Microbiol. 142:979-983;1991.

Dinareello, C.A. Interleukin-1 and its receptor. Critical reviews in Immunology 9:1-20;1989.

Dissous, C.; Dissous, C.; Capron, A. Stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidia by a 80 kDa glycoprotein from *Biomphalaria glabrata*. Molecular and Biochemical Parasitology 21:203-209;1986 (a).

Dissous, C.; Grzych, J.M.; Capron, A. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with fresh water and marine snails. Nature 323:443-445;1986 (b).

Dissous, C.; Dissous, C.A.; Capron, A. Molecular relationship between *Schistosoma mansoni* and its intermediate host *Biomphalaria glabrata*. In: Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites Alan R. Liss, Inc. 1987 pp 383-390.

Dissous, C.; Capron, A. *Schistosoma mansoni* and its intermediate host *Biomphalaria glabrata* express a common 39 kilodalton acidic protein. Molecular and Biochemical Parasitology 32:49-56;1989.

Dissous, C.; Torpier, G.; Duvaux-Miret, O.; Capron, A. Structural homology of tropomyosins from the human trematode *Schistosoma mansoni* and its intermediate host *Biomphalaria glabrata*. Molecular and Biochemical Parasitology 43:245-256;1990.



Dissous, C.; Capron, A. Convergent evolution of tropomyosin epitopes. Parasitol. Today 11:45-46; 1995.

Doenhoff, M.J.; Musallam Bain, J.; McGregor, A. Studies of the host parasite relationship in *Schistosoma mansoni* infected mice: The immunological dependance of parasite egg excretion. Immunol. 35:771-778; 1978.

Donnelly, J.J.; Vogel, S.N.; Prendergast, R.A. Down-regulation of Ia expression on macrophages by sea star factor. Cell.Immunol. 90:408-415; 1985.

Doumenge, J et al. Centre d'études de géographie tropicale (OMS, Atlas of the global distribution of schistosomiasis). Presses universitaires de Bordeaux, Bordeaux; 1987.

Duclermortier, P. Analyse des protéines hématocytaires de *Biomphalaria Glabrata*. Modulation de leur expression au cours de l'infection par *Schistosoma mansoni*. Mémoire de D.E.A. Université de Lille I et Lille II; 1993.

Duvaux-Miret, O.; Dissous, C.; Gautron, J.P.; Pattou, E.; Kordon, C.; Capron, A. The helminth *Schistosoma mansoni* expresses a peptide similar to human  $\beta$ -endorphin and possesses a proopiomelanocortin-related gene. The New Biologist Vol 2 (1):93-99; 1990.

Duvaux-Miret, O. Contribution à l'étude des interactions du trématode *Schistosoma mansoni* avec ses hôtes. Apport de la neuroimmunologie. Thèse d'habilitation à diriger les Recherches. Université de Lille I; 1992.

Duvaux-Miret, O.; Capron, A. Proopiomelanocortin in the helminth *Schistosoma mansoni*. Synthesis of beta-endorphin, ACTH, and alpha MSH. Existence of POMC-related sequences. Annals New York Academy of Sciences 650:245-250; 1992.

Duvaux-Miret, O.; Stefano, G.B.; Smith, E.M.; Capron, A. Neuroimmunology of host-parasite interactions: proopiomelanocortin derived peptides in the infection by *Schistosoma mansoni*. Advances in Neuroimmunology 2:297-311; 1992 (a).

Duvaux-Miret, O.; Stefano, G.B.; Smith, E.M.; Dissous, C.; Capron, A. Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:778-781; 1992 (b).

Duvaux-Miret, O.; Stefano, G.B.; Smith, E.M.; Mallozzi, L.A.; Capron, A. Proopiomelanocortin-derived peptides as tools of immune evasion for the human trematode *Schistosoma mansoni*. Acta Biologica Hungarica 43 (1-4):281-286; 1992 (c).

□

Ebele, S. Monthly variations in the shedding of *Schistosoma haematobium* cercariae by freshwater snails in Zaria-city, Nigeria. Bull. Soc. Franc. Parasit. 80: Suppl. 2:1174; 1990.

Etges, F.J.; Gresso, W. Effect of *Schistosoma mansoni* infection upon fecundity in *Australorbis glabratus*. J. Parasitol. 51:757-760; 1965.

□

Feng, Z.Y.; Louis, J.; Kindler, V.; Pedrazzini, T.; Eliason, J.F.; Behin, R.; Vassali, P. Aggravation of experimental cutaneous leishmaniasis in mice by administration of interleukin-3. Eur. J. Immunol. 18:1245-1251; 1988.

Fiers, W. Tumour Necrosis Factor. In: The natural Immune system : humoral factors (E. Sim, ed.), 1993 pp 65-119 IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.

Files, V.S.; Cram, E.B. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 35:555-560; 1949.

Fischer, A.C. A study of the schistosomiasis of the Stanleyville district of the belgian congo. Tansactions of the royal Society of Tropical medecine and hygiene. 28:277-306; 1934.

Fountain, D.W.; Campbell, B.A. A lectin isolate from mucus of *Helix aspersa*. Comp. Biochem. Physiol. 77B:419-425; 1984.

Franck, S.A. Models of plant-pathogen coevolution. Trends in Genetics 8:213-219; 1992.

Fryer, S.E.; Bayne, C.J. Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): A strain specific time-dependant process. Parasite Immunol. 11:269-278;1989.

Fryer, S.E.; Bayne, C.J. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 76:45-52; 1990.

Furuta, E.; Yamaguchi, K.; Shimozawa, A. Cytokine-like molecules in the land slug. Dev. Comp. Immunol. 18 (6) IX; 1994.

▯

Gaboriaud, C.; Bissery, Y. Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. FEBS Let. 224:149-155; 1987.

Gendron, R.L.; Nestel, F.P.; Lapp, W.S.; Baines, M.G. Expression of tumor necrosis factor alpha in the developing nervous system. Int. J. Neurosci. 60:129-136; 1991.

Georges, W.C.; Fergusson, J.H. The blood of gastropod molluscs. J. Morph. 86:315-327; 1950.

Giard, A. "Oeuvres diverses". Laboratoire d'Evolution, Etres Organ, Paris ; 1911-1913.

Gillis, S. Cytokine receptors. Current Opinion in Immunology 3:315-319; 1991.

Granath, W.O.; Yoshino, T.P. Lysosomal enzyme activities in susceptible and refractory strains of *Biomphalaria glabrata* during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 69:1018-1026; 1983.

Granath, W.O.; Loker, E.S.; Yui, M.A.; Stefens, J.A. Immune-recognition of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Parasite Immunol. 6:519-528; 1984.

Granath, W.O.; Yoshino, T.P. *Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 58:188-193; 1984.

Granath, W.O.; Connors, V.A.; Tarleton, R.L. Interleukin 1 activity in haemolymph from strains of the snails *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the

human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: Presence, differential expression, and biological function. Cytokine 6:21-27;1994.

Granath, W.O.; Agner, A.E.; Deburon, I.; Connors, V.A. Identification and biological activity of Interleukin-1 in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. First International Workshop of Trangenesis of Invertebrate of Medical Agricultural and Aquacultural Importance. Montpellier, April 21-26 1995; pp34-35.

Grzych, J.M.; Dissous, C.; Capron, M.; Torres, S.; Lambert, P.H.; Capron, A. *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. J. Exp. Med. 165:865-878;1987.

□

Haas, W.; Schmidt, R. Characterization of chemical stimuli for the penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae. I. Effective substances, host specificity. Zeitschrift für Parasitenkunde 66:293-307;1982 (a).

Haas, W.; Schmidt, R. Characterization of chemical stimuli for the penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae. II. Conditions and mode of action. Zeitschrift für Parasitenkunde 66:309-319;1982 (b).

Haas, W.; Fuchs, H.; Harbel, B.; Ströbel, M. Miracidium of *Schistosoma mansoni*: chemical signals for approach and attachment to the snail host. Bull. Soc. Franc. Parasit. 80:Suppl. 1:289;1990.

Habicht, G.S.; Beck, G. The role of interleukin 1 in increased vascular permeability of inflammation. In: Leukocyte Emigration and its sequelae (H. Movat, ed.), 1987 pp 51-54 Karger, Basel.

Habicht, G.S.; Beck, G. Interleukin's role in the increased vascular permeability of inflammation. Prog. Leukocyte Biol. 8:319-323;1988.

Harbel, B.; Haas, W. Miracidium of *Schistosoma mansoni*: a macromolecular glycoconjugate as signal for the behaviour after contact with the snail host. Comp. Biochem. Physiol. 101A:329-333;1992.

Hide, G.; Gray, A.; Harrison, C.M.; Tait, A. Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. Molecular and Biochemical Parasitology 36:51-60; 1989.

Holmes, J.C.; Bethel, W.M. Modification of intermediate host behaviour by parasites. In: "Behavioural aspects of parasite transmission". (E.U. Canning and C.A. Wright eds), 1972 pp 123-149 Academic Press, London.

Hordijk, P.L.; Schallig, H.D.F.H.; Ebberinck, R.H.M.; De Jong-Brink, M.; Joosse, J. Primary structure and origin of schistosomin, an anti-gonadotropic neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Biochem. J. 279:837-842; 1991.

Hordijk, P.L.; De Jong-Brink, M.; Ter Maat, A.; Pieneman, A.W.; Lodder, J.C.; Kits, K.S. The neuropeptide schistosomin and haemolymph from parasitized snails induce similar changes in excitability in neuroendocrine cells controlling reproduction and growth in a freshwater snail. Neuroscience Letters 136:193-197; 1992.

Hugues, T.K.; Smith, Jr. E.; Chin, R.; Cadet, P.; Sinisterra, J.; Leung, M.K.; Shipp, M.A.; Scharrer, B.; Stefano, G.B. Interaction of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4426-4429; 1990.

Hurd, H. Physiological and behavioural interactions between parasites and invertebrate hosts. Adv. Parasitol. 29:271-318; 1990.

□

Jeong, K.H.; Lie, K.J.; Heyneman, D. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. Dev. Comp. Immunol. 7:217-228; 1983.

Jones, E.Y.; Stuart, D.I.; Walker, N.P.C. Structure of tumour necrosis factor. Nature 338:225-228; 1989.

Joseph, A.L.; Boros, D.L. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. J. Immunol. 151:5461-5471; 1993.

Jourdane, J. Distribution binomiale des probabilités d'infestation du mollusque dans le couple *Schistosoma mansoni*-*Biomphalaria glabrata*. Haliotis 10:74; 1980.

Jourdane, J.; Théron A. Larval development. In: The biology of Schistosomes. From genes to latrines. (D. Rollinson and A.J.G. Simpson eds) 1987 pp 83-113 Academic Press, London.

□

Kassim, O.O.; Richards, C.S. *Schistosoma mansoni*: Lysozyme activity in *Biomphalaria glabrata* during infection with two strains. Exp. Parasitol. 46:213-217; 1978.

Katsurada, F. *Schistosoma japonicum*, a new parasite of man, by which an endemic disease in various areas of Japan is caused. Annotationes zoologicae Japonenses. 5:146-160; 1904.

Kendall, S.B. Some factors influencing the development and behaviour of trematodes in their molluscan host. In: Host-Parasite relationships in Invertebrate hosts. (A.E.R. Taylor, ed.), 1964 pp 51-73. Symposium of British Society for Parasitology (Second) London, November 8 1973, Blackwell, Oxford.

Kinkhabwala, M.; Sehajpal, P.; Skolnik, E.; Smith, D.; Sharma, V.K.; Vlassara, H.; Cerami, A.; Suthanthiran, M. A novel addition to the T-cell repertory. Cell surface expression of tumor necrosis factor/cachectin by activated normal human T cells. J. Exp. Med. 171:941-946; 1990.

Köhler, P.; Voigt, W.P. Nutrition and metabolism. In: Parasitology in focus. Factors and trends. (H. Mehlhorn ed.), 1988 pp 412-453 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.

Kondo, M.; Takeshita, T.; Ishii, N.; Nakamura, M.; Watanabe, S.; Arai, K.I.; Sugamura, K. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor  $\gamma$  chain between receptors for IL-2 and IL-4. Science 262:1874-1877; 1993.

Kongshavn, P.A.L.; Ghadirian, E. Enhancing and suppressive effects of tumour necrosis factor/cachectin on *Trypanosoma musculi* growth. Parasite Immunol. 10:581-587; 1989.

□

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227:680-685; 1970.

Landsperger, W.J.; Stirewalt, M.A.; Dresden, M.H. Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. Biochem. J. 201:137-146;1982.

Lawson, J.R.; Wilson, R.A. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilisation. Parasitol. 81:337-348;1980.

Lemesle-Varloot, L.; Henrissat, B.; Gaboriaud, C.; Bissery, V.; Morgat, A.; Mornon, J.P. Hydrophobic cluster analysis; procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. Biochimie 72:555-559; 1990.

Lie, K.J.; Heyneman, D. Studies on resistance in snails: interference by nonirradiated echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. J. Inv. Pathol. 29:118-125;1977 (a).

Lie, K.J.; Heyneman, D.; Richards, C.S. *Schistosoma mansoni*: temporary reduction of natural resistance in *Biomphalaria glabrata* induced by irradiated miracidia of *Echinostoma paraensei*. Exp. Parasitol. 43:54-62;1977 (b).

Lie, K.J.; Jeong, K.H.; Heyneman, D. Inducement of miracidia-immobilizing substance in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. Int. J. Parasitol. 10:183-188; 1980.

Lie, K.J. Swellengrebel lecture. Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. A discussion of the interference theory. Tropical and Geographical Medicine 34:111-122;1982.

Liu, C.C.; Steffan, M.; King, F.; Young, J.D.E. Identification, isolation, and characterization of a novel cytotoxin in murine cytolytic lymphocytes. Cell 51:393-403;1987.

Liu, C.C.; Detmers, P.A.; Jiang, S.; Young, J.D.E. Identification and characterization of a membrane-bound cytotoxin of murine cytolytic lymphocytes that is related to tumor necrosis factor/cachectin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3286-3290;1989.

Lodes, M.J.; Yoshino, T.P. Characterization of excretory-secretory proteins synthesized *in vitro* by *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. J. Parasitol. 75:853-862;1989.

Lodes, M.J.; Yoshino, T.P. The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. J. Inv. Pathol. 56:75-85; 1990.

Lodes, M.J.; Connors, V.A.; Yoshino, T.P. Isolation and functional characterization of snail hemocyte-modulating polypeptide from primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology 49:1-10; 1991.

Lodes, M.J.; Yoshino, T.P. Polypeptides synthesized *in vitro* by *Biomphalaria glabrata* hemocytes bind to *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. J. Inv. Pathol. 61:117-122;1993.

Loker, E.S.; Bayne, C.J. *In vitro* encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31:999-1005; 1982.

Loker, E.S.; Bayne, C.J. Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria*. In: Immune mechanisms in invertebrate vectors.(A.M. Lackie, ed.), 1986 56 pp 199-220 Zoological Society of London Symposia, Oxford University Press, Oxford.

Loker, E.S.; Bayne, C.J.; Yui, M.A. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. Exp. Parasitol. 62:149-154; 1986.

□

MacInnis, A.J. Responses of *Schistosoma mansoni* miracidia to chemical attractants. J. Parasitol. 51:731-746; 1965.

Malek, E.A.; Cheng, T.C. Parasite induced pathology. In: "Medical and economic malacology" (E.A. Malek and T.C. Cheng eds), 1974 pp 204-241 Academic Press, London.

Malek, E.A. In: "Snail-transmitted parasitic diseases". Volume I. CRC Press, Inc. 1980 pp 164-177.



- Manson, P. Report of case of bilharzia from the west Indies. J. Trop. Med. Hyg. 5:384;1902.
- Martin, C.; Timm, J.; Rauzier, J.; Gomez-Lus, R.; Davies, J.; Gicquel, B. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. Nature 345:739-743; 1990.
- Mason, P.R. Stimulation of the activity of *Schistosoma mansoni* miracidia by snail-conditioned water. Parasitol. 75:325-338; 1977.
- Mazingue, C.; Cottrez-Detoeuf, F.; Louis, J.; Kweider, M.; Auriault, C.; Capron, A. *In vitro* and *in vivo* effects of interleukin 2 on the protozoan parasite *leishmania*. Eur. J. Immunol. 19: 487-491; 1989.
- Mc Crady, J. Observations on the food and reproductive organs of *Ostrea virginiana*, and with some account of *Bucephalus cuculus*. Proc. Boston Soc. Natural History 16:170-192; 1874.
- Mc Kerrow, J.H.; Ritter, D. Scistosomes and host TNF. Parasitology today vol 8 (12): 411-412; 1992.
- Meier, M.; Meier-Brook, C. *Schistosoma mansoni*: effect on growth, fertility and development of distal male organs in *Biomphalaria glabrata* exposed to miracidia at different ages. Zeitschrift für Parasitenkunde 66:121-131; 1981.
- Meuleman, E.A. Host-parasite interrelationships between the freshwater pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and the trematode *Schistosoma mansoni*. Netherlands Journal of Zoology 22:355-427; 1972.
- Meuleman, E.A.; Bayne, C.J.; Van der Knaap, W.P.W. Immunological aspects of snail-trematode interactions. Dev. Comp. Immunol. Alan R. Liss, Inc. 1987 pp 113-127.
- Miller, K.J.; Kennedy, E.P.; Reinhold, V.N. Osmotic adaptation by gram negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharids. Science 231:48-51; 1986.
- Minchella, D.J.; Loverde, P.T. A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. Am. Naturalist 118:876-881; 1981.

Moné, H.; Combes, C. Analyse expérimentale de l'effet "decoy" (ou effet leurre) exercé par les mollusques non cibles sur le système hôte-parasite *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) - *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Acta Oecologica/Oecologica Applicata 7 (3):281-286; 1986.

Monroy, F.; Hertel, L.A.; Locker, E.S. Carbohydrate-binding plasma proteins from the gastropod *Biomphalaria glabrata*: strain specificity and the effects of trematode infection. Dev. Comp. Immunol. 16:355-366; 1992.

Monteil, J.F.; Matricon-Gondran, M. Structural and cytochemical study of the hemocytes in normal and trematode-infected *Lymnaea truncatula*. Parasitol. Res. 79:675-682; 1993.

Moore, C.A.; Gelder, S.R. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca Bivalvia). Trans. Am. Microsc. Soc. 104:242-249; 1985.

Mouahid, A.; Moné, H.; Chaib, A.; Théron, A. Cercarial shedding patterns as an approach to detect parasite associations. Bull. Soc. Franc. Parasit. 80: Suppl. 2:1142; 1990.

□

Nassi, H.; Pointier, J.P.; Golvan, Y.J. Bilan d'un essai de contrôle de *Biomphalaria glabrata* en Guadeloupe à l'aide d'un trématode stérilisant. Annales de Parasitologie 54 (2):185-192; 1979.

Nedwin, G.E.; Naylor, S.L.; Sakaguchi, A.Y.; Smith D.; Jarret-Nedwin, J.; Pennica, D.; Goeddel, D.V.; Gray, P.W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factors genes : structure, homology and chromosomal localization. Nucleic Acids Research 13 (17):6361-6373; 1985.

Newton, W.L. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 38:362-366; 1952.

Newton, W.L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. Exp. Parasitol. 2:242-257; 1953.

Newton, W.L. Tissue response to *Schistosoma mansoni* in second generation snails from a cross between two strains of *Australorbis glabratus*. J. Parasitol. 40:352-355; 1954.

Noble, E.R; Noble, G.A. "Parasitology, the biology of animal parasites". Lea and Febiger, 1971 Philadelphia.

Noda, S.; Loker, E.S. Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the snail host *Biomphalaria glabrata*. Parasitology 98:35-41; 1989.

Noguchi, M.; Nakamura, Y.; Russel, S.M.; Ziegler, S.F.; Tsang, M.; Cao, X.; Leonard, W.J. Interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. Science 262:1877-1880; 1993.

Nojima, H.; Sato, A. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*: emergence of schistosome cercariae from snails with darkness and illumination. Exp. Parasitol. 53:189-198; 1982.

□

Olafsen, J.A. Invertebrate lectins: biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. In: Immunity in Invertebrates. (M.Brehélin ed.), 1986 pp 94-111 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Olsson, T.; Bakhiet, M.; Höjeberg, B.; Ljungdahl, A.; Edlund, C.; Andersson, G.; Ekre, H.P.; Fung-Leung, W.; Mak, T.; Wigzell, H.; Fiszer, U.; Kristensson, K. CD8 is critically involved in lymphocyte activation by a *T. brucei brucei*-released molecule. Cell 72:715-727; 1993.

OMS. Série de Rapports Techniques N° 830. Deuxième rapport du comité OMS d'experts. Lutte contre la Schistosomiase. Genève, 1993.

Ottaviani, E. The blood cells of the freshwater snail *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata). Dev. Comp. Immunol. 7:209-216; 1983.

Ottaviani, E.; Franchini, A. Ultrastructural study of hemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus*. (L.) (Gastropoda, Pulmonata) Acta zool. (Stockh.). 69:157-162; 1988.

Ottaviani, E.; Petraglia, F.; Montagnani, G.; Cossarizza, A.; Monti, D.; Francheschi, C. Presence of ACTH and  $\beta$ -endorphin immunoreactive molecules in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) and their possible role in phagocytosis. Regulatory peptides 27:1-9; 1990.

Ottaviani, E.; Caselgrandi, E.; Franchini, A.; Francheschi, C. CRF provokes the release of norepinephrine by hemocytes of *Viviparus ater* (Gastropoda, Prosobranchia): further evidence in favour of the evolutionary hypothesis of the "mobile immune brain". Biochem. Biophys. Res. Comm. 193:446-452; 1993 (a).

Ottaviani, E.; Franchini, A.; Francheschi, C. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 195:984-988; 1993 (b).

Ottaviani, E.; Franchini, A.; Caselgrandi, E.; Cossarizza, A.; Francheschi, C. FEBS Lett. 351:19-21; 1994.

Ottaviani, E.; Caselgrandi, E.; Francheschi, C. Cytokines and evolution: *in vitro* effects of IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  on an ancestral type of stress response. Biochem. Biophys. Res. Comm. 207:288-292; 1995.

□

Paemen, L.R.; Porchet-Hennere, E.; Masson, M.; Leung, M.K.; Hugues, T.K.; Stefano, G.B. Glial localization of Interleukin-1 $\alpha$  in invertebrate ganglia. Cell. Molec. Neurobiol. 12:463-472; 1992.

Pan, C.T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14:931-976; 1965.

Paperna, I. The effect of pre-existing trematode infection on the establishment of *Schistosoma haematobium* larvae in bulinid snails. Ghana Medical Journal 6:89-90; 1967.

Paperna, I. Susceptibility of *Bulinus (Physopsis) globosus* and *Bulinus truncatus rohlfsi* from different localities in Ghana to different local strains of *Schistosoma haematobium*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 62:13-26; 1968.

- Paran, I.; Kesseli, R.; Michelmore, R. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. Genome 34:1021-1027; 1991.
- Peitsch, M.C.; Jongeneel, C.V. A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. International Immunology 5 (2):233-238; 1993.
- Pitchford, R.J.; Meyling, A.H.; Meyling, J.; Du Toit, J.F. Cercarial shedding patterns of various schistosome species under outdoor conditions in the Transvaal. Ann. Trop. Med. Parasitol. 63:359-371; 1969.
- Pointier, J.P.; Théron, A.; Imbert-Establet, D.; Borel, G. Eradication of a sylvatic focus of *Schistosoma mansoni* using biological control by competitor snails. Biological Control 1, 244-247; 1991.
- Pointier, J.P.; Guyard, A. Biological control of the snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Martinique, French West Indies. Trop. Med. Parasitol. 43:98-101; 1992.
- Prah, S.K.; James, C. The influence of physical factors on the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. I. Effect of temperature and U.V light. J. Helminthol. 51:73-85; 1977.
- Price, P.W. Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, 1980.
- Prendergast, R.A.; Suzuki, M. Invertebrate protein stimulating mediators of delayed hypersensitivity. Nature 227:277-279; 1970.
- Prendergast, R.A.; Luty, G.A.; Scott, A.L. Directed inflammation : the phylogeny of lymphokines. Dev. Comp. Immunol. 7:629-632; 1983.
- Prentice, M.A.; Jordan, P.; Bartholomew, R.K.; Grist, E. Reduction in transmission of *Schistosoma mansoni* by a four-year focal mollusciciding programme against *Biomphalaria glabrata* in St. Lucia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75:789-798; 1981.

Prentice, M.A. Displacement of *Biomphalaria glabrata* by the snail *Thiara granifera* in field habitats in St. Lucia, West Indies. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 77:51-59; 1983.

Prowse, R.H.; Tait, N.N. *In vitro* phagocytosis by amoebocytes from the haemolymph of *Helix aspersa* (Müller) I. Evidence for opsonic factor(s) in serum. Immunol. 17:437-443; 1969.

□

Raftos, D.A.; Cooper, E.L.; Habicht, G.S.; Beck, G. Invertebrate cytokines: tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin 1-like molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9518-9522; 1991 (a).

Raftos, D.A.; Stillman, D.L.; Cooper, E.L. Interleukin-2 and phytohaemagglutinin stimulate the proliferation of tunicate cells. Immunol. Cell Biol. 69:225-234; 1991 (b).

Raftos, D.A.; Cooper, E.L.; Stillman, D.L.; Habicht, G.S.; Beck, G. Invertebrate cytokines II: Release of Interleukin-1-like molecules from tunicate hemocytes stimulated with zymosan. In: Lymphokine and Cytokine Research, Mary Ann Liebert, Inc. 1992 vol.11 n°4 pp 235-240.

Rasmussen, K.R.; Hillyer, G.V.; Kemp, W.M. Isolation and partial characterization of an antigen shared between *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, and *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 71:792-798; 1985.

Rasmussen, O. Biological control of *Biomphalaria pfeifferi* by *Helisoma duryi*. Proc. 3rd. Intl. Congr. Parasitol. Munich, Sec. GI, 1598; 1974.

Ratanarat-Brockelman, C. Isolation of nematode inhibitor from hemolymph of the snail *Helix aspersa*. Biol. Bull. (Woods Hole) 152:406-414; 1977.

Rennie, J. Parasites et évolution. Pour la Science 174:68-77; 1992.

Renwranz, L. Eine untersuchung molekularer und zellulärer bestanteile der hämolympe von *Helix pomatia* unter besonderer berücksichtigung immunobiologisch aktiver komponenten. Zool. Jahrb Physiol. 83:283-333; 1979.

Richards, C.S. Genetics of a molluscan vector of schistosomiasis. Nature 227:806-810;1970.

Richards, C.S.; Merritt, J.W.; Jr. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21:425-434;1972.

Richards, C.S.

Genetic aspects of host-parasite relationships. (A.E.R. Taylor, R. Mullen, eds), 1976 pp 45-54 Blackwell Scientific Publications, London.

Richards, C.S. *Schistosoma mansoni*: Susceptibility reversal with age in the snail host *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 42:165-168;1977.

Richards, C.S. Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni*. Malacologia 25:493-502;1984.

Richards, C.S. Knight, M.; Lewis, F.A. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. Parasitol. Today 8:171-174; 1992.

Rivera-Marrero, C.A.; Hillyer, G.V. Isolation and partial characterization of shared antigens of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* and their evaluation by the ELISA and the EITB. J. Parasitol. 71:547-555;1985.

Rock, C.S. Lowry, S.F. Current research review. Tumor necrosis factor- $\alpha$ . J. Surg. Res 51:434-445;1991.

Rollinson, D.; Southgate, V.R. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. In: "The Biology of Schistosomes, from genes to latrines." (D.Rollinson and A.J.G.Simpson eds), 1987 pp 1-49 Academic Press, London.

Ron, D.; Chen, C.H.; Caldwell, J.; Jamieson, L.; Orr, E. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the  $\beta$  subunit of G proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:839-843;1994.

Rosenblum, M.G.; Donato, N.J. Tumor necrosis Factor  $\alpha$  : a multifaceted peptide hormone. Critical reviews in Immunology 9:21-44; 1989.

Rothwell, N.J. The endocrine significance of cytokines. J. Endocrinol. 128:171-173; 1991.

Ruiz-Tiben, E.; Palmer, J.R.; Ferguson, F.F. Biological control of *Biomphalaria glabrata* by *Marisa cornuarietis* in irrigation ponds of Puerto Rico. Bull. W.H.O. 41:329; 1969.

Russel, S.M.; Keegan, A.D.; Harada, N.; Nakamura, Y.; Noguchi, M.; Leland, P.; Friedmann, M.C.; Miyajima, A.; Puri, R.K.; Paul, W.E.; Leonard, W.C. Interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. Science 262:1880-1883; 1993.

□

Sambon, L.W. Description of some new species of animal parasite. Proc. Zool. Soc., London, 19, 282; 1907.

Sanger, F.; Coulson A.R.; Hong, G.F.; Hill, D.F.; Petersen, G.B. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\lambda$  DNA. J. Mol. Biol. 162:729-733; 1982.

Schallig, H.D.F.H. Neuro-endocrine interactions between schistosome parasites and their intermediate hosts, freshwater snails, studied in the combination *Trichobilharzia ocellata-Lymnaea stagnalis*. Ph.D Thesis Vrije Universiteit Amsterdam, Febodruk, Enschede; 1991.

Schallig, H.D.F.H.; Hordijk, P.L.; Oosthoek, P.W.; De Jong-Brink, M. Schistosomin, a peptide present in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* infected with *Trichobilharzia ocellata*, is produced only in the snail's central nervous system. Parasitol. Res. 77:151-156; 1991 (a).

Schallig, H.D.F.H.; Sassen, M.J.M.; Hordijk, P.L.; De Jong-Brink, M. *Trichobilharzia ocellata*: influence of infection on the fecundity of its intermediate snail host *Lymnaea stagnalis* and the cercarial induction of the release of schistosomin, a snail neuropeptide antagonizing female gonadotropic hormones. Parasitol. 102:85-91; 1991 (b).



Schallig, H.D.F.H.; Sassen, M.J.M.; De Jong-Brink, M. *In vitro* release of the anti-gonadotropic hormone schistosomin from the central nervous system of *Lymnaea stagnalis* is induced with a methanolic extract of cercariae of *Trichobilharzia ocellata*. Parasitol. 104:309-314; 1992.

Schiff, C.J. Molluscan defence mechanisms: Immunity or population biology? Parasitol. Today 10:188-190; 1994.

Shipp, M.A.; Stefano, G.B.; Switzer, S.N.; Howard, F.D.; Sinistera, J.; Scharrer, B.; Reinherz, E.L. Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11. Nature 347: 394-396; 1990.

Schnell, S.; Becker, W.; Winkler, A. Amino acid metabolism in the freshwater pulmonate *Biomphalaria glabrata* infected with the trematode *Schistosoma mansoni*. Comp. Biochem. Physiol. 81B:1001-1008; 1985.

Sher, A. Parasitizing the cytokine system. Nature 356:565-566; 1992.

Shozawa, A.; Suto, C.; Kumada, N. Superoxide production by the haemocytes of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, stimulated by miracidia of *Schistosoma mansoni*. Zoological Science 6:1019-1022; 1989.

Silva, J.S.; Twardzik, D.R.; Reed, S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). J. Exp. Med. 174:539-545; 1991.

Sminia, T.; Van der Knaap, W.P.W.; Edelen-Bosch, P. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. Dev. Comp. Immunol. 3:37-44; 1979.

Sminia, T.; Van der Knaap, W.P.W. Immunorecognition in Invertebrates with special reference to molluscs. In: Immunity in Invertebrates. (M.Brehélin ed), 1986 pp 112-124 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Sminia, T.; Van der Knaap, W.P.W. Cells and molecules in molluscan immunology. Dev. Comp. Immunol. 11:17-28; 1987 (a).

Sminia, T.; Van der Knaap, W.P.W. The forgotten creatures: Immunity in invertebrates. Dev. Comp. Immunol. Alan R. Liss, Inc. 1987 (b) pp 157-162.

Smith, E.M.; Blalock, J.E. A molecular basis for interactions between the immune and neuroendocrine systems. Intern. J. Neuroscience 38:455-564;1988.

Smith, E.M. Hormonal activities of Cytokines. In: Neuroimmunoendocrinology (J.E. Blalock, ed.), 1992 52: pp 154-159 Chem Immunol. Basel, Karger.

Sonsino, P. On a new parasite of cows, *Bilharzia bovis*. Rendiconti dell'Accademia della Scienze Fisiche e Matematiche, Napoli 15:84-87;1876.

Spray, F.J.; Granath, W.O.; Jr. Comparison of haemolymph proteins from *Schistosoma mansoni* (Trematoda)-susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). Comp. Biochem. Physiol. 91:619-624;1988.

Spray, F.J.; Granath, W.O.; Jr. Structural analysis of hemolymph proteins from *Schistosoma mansoni* (Trematoda)-susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). Comp. Biochem. Physiol. 94:543-553;1989.

Spray, F.J.; Granath, W.O. Differential binding of hemolymph proteins from schistosome-resistant and-susceptible *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* sporocysts. J. Parasitol. 76:225-229;1990.

Stefano, G.B. The evolvement of signal systems: conformational matching a determining force stabilizing families of signal molecules. Comp. Biochem. Physiol. 90C:287-294;1988.

Stefano, G.B. Role of opioid neuropeptides in immunoregulation. Progress in neurobiology 33:149-159;1989.

Stefano, G.B.; Cadet, P.; Scharrer, B. Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: evidence for a subtype of delta receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6307-6311;1989 (a).

Stefano, G.B.; Leung, M.K.; Zhao, X.; Scharrer, B. Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:626-630;1989 (b).

Stefano, G.B.; Smith, E.M.; Hugues, T.K. Opioid induction of immunoreactive interleukin-1 in *Mytilus edulis* and human immunocytes: an interleukin-1-like substance in invertebrate neural tissue. J. Neuroimmunol. 32:29-34; 1991.

Stefano, G.B.; Melchiorri, P.; Negri, L.; Hugues, T.K.; Scharrer, B. (D-Ala<sup>2</sup>) Deltorphin I binding and pharmacological evidence for a special subtype of delta opioid receptor on human and invertebrates immune cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9316-9320; 1992 (a).

Stefano, G.B.; Smith, D.E.; Smith, D.; Hugues, T.K. MSH can deactivate both TNF stimulated and spontaneously active immunocytes. In: Molluscan neurobiology (H. Boer and A.T. Maat, eds), 1992 (b) pp 206-208 Amsterdam, Elsevier, North Holland.

Stirewalt, M.A. *Schistosoma mansoni*: cerceria to schistosomule. Advances in Parasitology. 12:115-182; 1974.

Stunkard, H.W. Possible snail host of human schistosomes in the United States. J. Parasitol. 32:539-552; 1946.

Sturrock, B.M.; Sturrock, R.F. Laboratory studies of the host-parasite relationship of *Schistosoma* and *Biomphalaria glabrata* from St. Lucia, West Indies. Ann. Trop. Med. Parasitol. 64:357-363; 1970.

□

Théron, A.; Moné, H. Chronobiological aspects of the host-parasite relationships between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*: cercarial production and infectivity, and growth kinetics of the host. J. Inv. Pathol. 44:209-213; 1984.

Thompson, S.N. Physiological alteration during parasitism and their effects on host behaviour. In: Parasitism and host behaviour. (C.J. Barnard and J.M. Behnke eds), 1990 pp 64-94 Taylor and Francis, London.

Thornhill, J.A.; Jones, J.T.; Kusel, J.R. Increased oviposition and growth in immature *Biomphalaria* after exposure to *Schistosoma mansoni*. Parasitol. 93:443-450; 1986.

Torpiér, G.; Capron, M.; Capron, A. Structural changes of the tegumental membrane complex in relation to developmental stages of *Schistosoma mansoni*

(Platyhelminthes: Trematoda). Journal of Ultrastructural Research 61:309-324; 1977.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354; 1979.

Trotta, P.P. Cytokines: An overview. American Journal of Reproductive Immunology 25:137-141; 1991.

□

Ulmer, M.J. Site-finding behaviour in helminths in invertebrate hosts. In: "Ecology and Physiology of Parasites" (A. M. Fallis ed.), 1971 pp 123-159 University of Toronto Press, Toronto.

Upatham, E.S. Interference by unsusceptible aquatic animals with the capacity of the miracidia of *Schistosoma mansoni* Sambon to infect *Biomphalaria glabrata* (Say) under field-stimulated conditions in St Lucia, West Indies. J. Helminthol. 46:227-283; 1972.

□

Van der Knaap, W.P.W.; Meuleman, E.A.; Sminia, T. Alterations in the internal defense system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Parasitol. Res. 73:57-65; 1987.

Van der Knaap, W.P.W.; Loker, E.S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol. Today 6:175-182; 1990.

Van der Knaap, W.P.W.; Adema, C.M.; Sminia, T. Invertebrate blood cells: morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Comp. Haematol. Int. 3:20-26; 1993.

Vermund, S.H.; Bradley, D.J.; Ruiz-Tiben, E. Survival of *Schistosoma mansoni* in the human host: estimates from a community-based prospective study in Puerto Rico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:1040-1046; 1983.

Voge, M.; Bruckner, D.; Bruce, J.I. *Schistosoma mekongi* sp. n. from man and animals compared with four geographic strains of *Schistosoma japonicum*. Journal of Parasitology. 64:577-584; 1978.

□

Webbe, G. Molluscicides in the control of schistosomiasis. In: Plant Molluscicides, (Mott ed.), 1987 pp 1-26.

Weston, D.; Kemp, W.M. *Schistosoma mansoni*: comparison of cloned tropomyosins shared between adult parasites and *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 76:358-370; 1993.

Weston, D.; Allen, B.; Thakur, A.; Loverde, P.T.; Kemp, W.M. Invertebrate host-parasite relationships: convergent evolution of a tropomyosin epitope between *Schistosoma sp.*, *Fasciola hepatica*, and certain pulmonate snails. Exp. Parasitol. 78:269-278; 1994.

Williams, C.J.; Gilbertson, D.E. Altered feeding response as a cause for the altered heartbeat rate and locomotor activity of *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 69:671-676; 1983.

Wilson, R.A.; Denison, J. The parasitic castration and gigantism of *Lymnaea truncatula* infected with larval stages of *Fasciola hepatica*. Zeitschrift für Parasitenkunde 61:109-119; 1980.

Wride, M.A.; Sanders, E.J. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-cross-reactive proteins during early chick embryo development. Developmental dynamics 198:225-239; 1993.

Wright, C.A. Snail susceptibility or trematode infectivity? J. Nat. Hist. 8:545-548; 1974.

□

Xu, H.; Miller, S.; Van keulen, H.; Wawrzynski, M.R.; Rekosh, D.M.; Loverde, P.T. *Schistosoma mansoni* tropomyosin: cDNA characterization, sequence, expression and gene product localization. Exp. Parasitol. 69:373-392; 1989.

□

Yamamori, T.; Sarai, A. Coevolution of cytokine receptor families in the immune and nervous system. Neuroscience Research 15:151-161; 1992.

Yoshinari, M.; Amano, T.; Nakazawa, M.; Ikejima, T.; Oshima, T.; Minami, M. Anti-TNF- $\alpha$  suppressed the egg laying and egg maturation of *Schistosoma mansoni* stimulated TNF- $\alpha$  *in vitro*. Heighth International Congress of Parasitology. Izmir-Turkey, October 10-14 1994; vol 2: 424 [Po 49.07 (555)].

Yoshino, T.P.; Cheng, T.C. Snail host-like antigens associated with the surface membranes of *Schistosoma mansoni* miracidia. J. Parasitol. 64:752-754; 1978.

Yoshino, T.P.; Bayne, C.J. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol. 5:317-328; 1983.

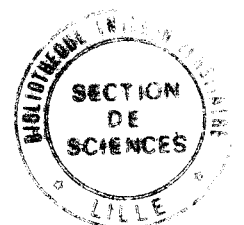
Yoshino, T.P.; Granath, W.O.;Jr. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. Cell Tissue Res. 232:553-564; 1983.

Yoshino, T.P.; Granath, W.O.;Jr. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes: functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. J. Inv. Pathol. 45:174-186; 1985.

Yoshino, T.P.; Boswell, C.A. Immune Mechanisms in Invertebrate vectors (A. Lackie ed.) 1986 pp 221-238, Clarendon Press.

Yoshino, T.P.; Lodes, M.J. Secretory protein biosynthesis in snail hemocytes: *in vitro* modulation by larval schistosome excretory-secretory products. J. Parasitol. 74:538-547; 1988.

Yoshino, T.P.; Lodes, M.J.; Rege, A.A.; Chappell, C.L. Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 79:23-31; 1993.



# TABLE DES MATIERES

ABRÉVIATIONS	10
RÉSUMÉ	13
INTRODUCTION	15
- I Introduction au parasitisme et à la relation hôte-parasite	16
- II La schistosomiase	18
I. Généralités	19
II. Répartition géographique des schistosomiasés humaines	21
III. Cycle évolutif de <i>Schistosoma mansoni</i>	24
IV. Transmission	31
- IV.1 Adaptation des schistosomes aux habitudes comportementales des hôtes définitifs	31
- IV.2 Facteurs écologiques impliqués dans la transmission	32
- IV.3 Facteurs humains impliqués dans la transmission	33
V. Prophylaxie	35
- V.1 La prophylaxie médicale	35
V.1.1 La chimiothérapie	35
V.1.2 La stratégie vaccinale	37
- V.2 La prophylaxie sanitaire	38
- V.3 La lutte antivectorielle	39
V.3.1 Procédés chimiques : les molluscicides	39
V.3.2 Procédés physiques : les grands travaux	40
V.3.3 Procédés biologiques : prédateurs et compétiteurs	41
V.3.4 Bilan et perspectives de la lutte antivectorielle	42
- III Les modèles mollusques-trématodes	43
I. Généralités	44
II. Le système de défense interne des mollusques	44
- II.1 Les cellules de défense	46
- II.2 Les facteurs humoraux	50
III. Les interactions mollusques-trématodes	53
- III.1 Introduction	53
- III.2 Interactions mollusques-trématodes incompatibles	53
- III.3 Notions de compatibilité et de spécificité	55
- III.4 Interactions mollusques-trématodes compatibles	59



- IV	Le couple <i>B.glabrata-S.mansoni</i>	60
	I. Bases génétiques de l'interaction <i>B. glabrata/S. mansoni</i>	61
	II. Aspects physiologiques de l'interaction <i>Bg/Sm</i>	63
	- II.1 Modifications de la reproduction	63
	- II.2 Modifications de la croissance	64
	- II.3 Autres modifications	65
	III. Aspects immunologiques	67
	- III.1 Mimétisme et déguisement moléculaires	67
	- III.2 Hypothèse d'interférence entre parasite et mollusque	70
	III.2.1 Expression de molécules d'hôte	70
	III.2.2 Emission de molécules parasitaires impossibles à identifier par le mollusque	71
	III.2.3 Emission de molécules parasitaires capables d'entraîner une modulation des mécanismes immunitaires du mollusque	72
- V	Les cytokines d'invertébrés	78
	I. Généralités sur les cytokines et leurs propriétés	79
	II. Les cytokines d'invertébrés	80
	- II.1 Molécules apparentées à l'IL1	81
	- II.2 Molécules apparentées à d'autres cytokines	83
	III. Cytokines et relation hôte-parasite	84
	BUT DU TRAVAIL	87
	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	89
	I. Détection chez <i>Bg</i> d'une immunoréactivité vis-à-vis du TNF $\alpha$	90
	II. Recherche d'une activité biologique TNF $\alpha$	90
	III. Immunodétection de molécules apparentées au TNF $\alpha$	92
	IV. Caractérisation des molécules apparentées au TNF $\alpha$	95
	V. Quantification de l'immunoréactivité vis-à-vis du TNF $\alpha$	98
	VI. Discussion à cette étape du travail	105
	VII. Recherche de séquences nucléotidiques homologues à celles du TNF $\alpha$ humain	107
	- VII.1 Séquences ARN	107
	- VII.2 Séquences ADN	110
	VIII. Criblage de la banque cDNA d'expression par les anticorps anti-TNF $\alpha$	111
	IX. Séquençage de l'ADNc des clones OB5 et OB14	114

X. Recherches d'homologies	114
XI. Expression et caractérisation des protéines de fusion $\beta$ -Gal/OB5 et $\beta$ -Gal/ OB14	123
XII. Discussion sur la deuxième partie de ce travail	127
 DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 130
 MATÉRIEL ET MÉTHODES	 142
- Première partie : Biologie et Biochimie	143
1. Animaux	143
2. Préparation des différents extraits	143
2.1 Extraits bruts	143
2.2 Extrait fractionné	144
3. Dosage des protéines	144
4. Dosage radioimmunologique	145
5. Activité biologique	146
6. Immunocytochimie	147
7. Electrophorèse des protéines en western blot	149
8. Marquage métabolique d'hémocytes	149
9. Immunoprécipitation des antigènes de <i>Bg</i> radiomarqués	150
10. Dosages en ELISA	151
- Deuxième partie : Biologie moléculaire	153
1. Préparation de l'ADN	153
1.1 ADN génomique	153
1.2 ADN plasmidique bactérien	154
1.2.1 ADN des plasmides contenant l'insert TNF $\alpha$ humain	154
1.2.2 ADN du plasmide PCRII contenant les inserts OB5/14	155
1.2.3 Purification d'un fragment d'ADN issu d'un plasmide	156
1.3 ADN phagique (mini-préparation)	157
2. Préparation de l'ARN	158
2.1 ARN total	158
2.2 ARN polyadénylé	159
3. Séparation et transfert des acides nucléiques	161
3.1 Southern blot	161
3.2 Northern blot	161
4. Marquage et hybridation des acides nucléiques	163
4.1 Marquage de l'insert TNF $\alpha$ humain	163

4.2	Marquage de l'insert OB5	163
4.3	Hybridations	164
4.3.1	Hybridation en système homologue	164
4.3.2	Hybridation en système hétérologue	165
5.	Criblage	165
5.1	Criblage d'une banque cDNA de <i>Bg</i>	165
5.2	Criblage d'une banque d'expression de <i>Bg</i>	166
5.3	Annexe	167
5.3.1	Préparation de bactéries Y1090 compétentes	167
5.3.2	Préparation d'un lysat bactérien	167
5.3.3	Epuisement d'un sérum par un lysat bactérien	167
6.	Sous-clonage	168
6.1	Sous-clonage en vecteur phagique M13	168
6.2	Sous-clonage en plasmide PCRII	168
6.3	Annexe	168
6.3.1	Préparation de bactéries TG1 compétentes	168
6.3.2	Transformation des bactéries TG1	169
6.3.3	Préparation de bactéries JM 109 compétentes	170
6.3.4	Transformation des bactéries JM 109	170
7.	Séquençage	171
7.1	Séquençage manuel	171
7.2	Séquençage automatique	172
8.	Réaction de polymérase en chaine (PCR)	172
9.	Expression des protéines recombinantes	173
9.1	Préparation de phages recombinants lysogènes	173
9.2	Préparation de la protéine de fusion	174
10.	Analyse des séquences nucléiques et protéiques	175
10.1	Analyse des séquences primaires en acides nucléiques et en protéines	175
10.2	Analyse des séquences protéiques en 2 dimensions	175
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>176</b>
	<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>206</b>

<u>Figure 1</u>	20
Représentation du plus vieux document parasitologique connu donnant une description de la schistosomiase (Papyrus d'Ebers datant de plus de 3500 ans)	
<u>Figure 2</u>	22
Répartition géographique des différentes bilharzioses d'après l'Organisation Mondiale de la Santé	
<u>Figure 3</u>	25
Représentation des Schistosomes parmi les plathelminthes	
<u>Figure 4</u>	26
Cycle biologique de <i>Schistosoma mansoni</i>	
<u>Figure 5</u>	28
Représentation schématique d'un mollusque <i>Biomphalaria glabrata</i> disséqué ( <i>Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora, Planorbidae</i> )	
<u>Figure 6</u>	36
Représentation schématique du cycle de <i>Schistosoma mansoni</i> et points d'intervention et de contrôle possibles	
<u>Figure 7</u>	45
Représentation des Gastéropodes parmi les mollusques	
<u>Figure 8</u>	47
Représentation schématique des cellules effectrices dans le système interne de défense des mollusques	
<u>Figure 9</u>	49
Représentation schématique de l'hétérogénéité morphologique de la population d'hémocytes circulants des gastéropodes	

<u>Figure 10</u>	58
Spécificité Mollusques-Trématodes dans les différentes schistosomiases	
<u>Figure 11</u>	91
Détection d'une immunoréactivité vis-à-vis du TNF $\alpha$ dans un extrait total de <i>Bg</i> fractionné sur colonne G50	
<u>Figure 12</u>	93
Immunodétection de molécules apparentées au TNF $\alpha$	
<u>Figure 13</u>	96
Identification par western blot de molécules apparentées au TNF $\alpha$	
<u>Figure 14</u>	99
Immunoprécipitation des antigènes hématocytaires de <i>Bg</i> marqués à la $^{35}\text{S}$ Méthionine	
<u>Figure 15</u>	101
Analyse quantitative de l'immunoréactivité vis-à-vis du TNF $\alpha$ dans les différents tissus du mollusque <i>Biomphalaria glabrata</i>	
<u>Figure 16</u>	103
Analyse cinétique de l'expression des molécules TNF immunoréactives dans l'hémolymphe de mollusques infectés par <i>S. mansoni</i>	
<u>Figure 17</u>	108
Représentation du plasmide PRS1 contenant l'insert TNF $\alpha$ entre les sites de restriction Pst1 et EcoR1	
<u>Figure 18</u>	109
Séquence de l'insert TNF sous cloné dans le phage M13 et déduction de sa séquence en acides aminés.	

<u>Figure 19</u>	112
Analyse des clones OB5 et OB14 après digestion par EcoR1: Détermination de la taille des inserts	
<u>Figure 20</u>	113
Recherche d'homologies entre les inserts des clones OB5 et OB14 par des hybridations croisées	
<u>Figure 21</u>	115
Séquence d'ADNc du clone OB5 et séquence protéique correspondante	
<u>Figure 22</u>	116
Séquence d'ADNc du clone OB14 et séquence protéique correspondante	
<u>Figure 23</u>	117
Comparaison des clones OB5 et OB14 vis-à-vis du TNF $\alpha$ humain	
<u>Figure 24</u>	119
Autre comparaison du clone OB5 vis-à-vis du TNF $\alpha$ humain	
<u>Figure 25</u>	120
Représentation en deux dimensions (HCA) des clones OB5 et OB14 vis-à-vis du TNF $\alpha$ humain	
<u>Figure 26</u>	124
Analyse sur gel de polyacrylamide des cultures induites ou non induites des clones OB5 et OB14	
<u>Figure 27</u>	125
Mise en évidence de la réactivité des Ac anti-TNF $\alpha$ avec les protéines de fusion $\beta$ -Gal/OB5 et $\beta$ -Gal/OB14	