

55316
1997
113

n° d'ordre : 2016

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse de Doctorat
Sciences de la Vie et de la Santé
(arrêté du 30 mars 1992)

Christine Sénécaut-Pierrot

Caractérisation moléculaire et étude de l'expression de l'élastase de *Schistosoma mansoni*. Rôle potentiel en tant que cible et régulateur de la réponse immune



présentée le 30 mai 1997 devant la commission d'examen :

Président:	Professeur S. Ball
Directeur de Thèse:	Professeur A. Capron
Rapporteurs:	Docteur C. Braun-Breton Docteur M. Duterque Docteur Y. Rouillé
Examineurs:	Professeur G. Spik Docteur J. Khalife

Ce travail a été réalisé

**au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
INSERM U167
Institut Pasteur de Lille**

sous la direction du Professeur A. Capron

**et plus particulièrement dans le groupe de recherche dirigé
par le Docteur J. Khalife**

*à Nicolas,
pour l'amour que je lui porte*

A Monsieur le Professeur Capron,

Vous m'avez accueillie chaleureusement dans votre laboratoire et vous m'avez permis d'y réaliser ce travail au sein d'un programme de recherche de grande qualité. Que ce manuscrit soit le témoignage de ma respectueuse admiration et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Ball,

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

A Madame le Docteur Braun-Breton,

Vous avez accepté tout de suite d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie sincèrement de l'intérêt porté à ma thèse ainsi que de votre présence dans ce jury.

A Madame le Docteur Duterque,

Vous avez accepté avec beaucoup de sympathie d'être rapporteur de ce travail, malgré des délais très brefs. Je vous en remercie vivement.

A Monsieur le Docteur Rouillé,

Vous avez accepté avec beaucoup de gentillesse d'apporter un regard critique à ce travail. Je vous remercie beaucoup d'en être rapporteur.

A Madame le Professeur Spik,

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Docteur Khalife,

Je te remercie Jamal d'avoir accompagné ce travail pendant presque 4 ans. J'ai eu beaucoup de chance de travailler avec toi et de bénéficier de tes compétences, de ta gentillesse et surtout de ta confiance.

Ce travail de thèse a été réalisé grâce à l'aide précieuse de nombreuses personnes que je tiens à associer à ces remerciements.

Au groupe BMIR, Claude, Cécile, Catherine et Jamal. Pour tous les bons moments partagés quotidiennement, pour tous les services rendus, particulièrement pendant la rédaction de ce manuscrit (!), et surtout, Claude, pour ta collaboration technique souvent très matinale et les heures passées (en tête-à-tête) à l'animalerie!

Au groupe SVH au sein duquel j'ai démarré ce travail. Et plus particulièrement à Thérèse, Jocelyne et bien sûr Raymond qui a toujours accepté avec gentillesse de commenter mon travail, y compris ce manuscrit.

Aux filles des Hybridomes, qui m'ont très gentiment accueillie sous leurs hottes, et plus particulièrement à Sophia qui m'a initiée aux joies de la biologie cellulaire avec beaucoup de savoir faire et d'encouragements. Je n'oublierai pas tous les conseils et la disponibilité de Josette. Quant à Karine, très sincèrement merci pour tout, tu sais que tu peux compter sur moi.

Un grand merci à toutes celles et ceux qui au quotidien m'ont fait partagé leur expérience, donné beaucoup de conseils et d'encouragements; ces petits "trucs" facilitent tellement la tâche! Plus particulièrement je remercie Jinli Liu, Jean-Pierre Kusnierz, Jean-Paul Papin, Christian Lagroux ainsi que Monique et Suzanne.

Merci aussi à Jackline Derick, relayée avec talent par Chantal Kikonzolo pour les recherches bibliographiques.

Je tiens à remercier tout particulièrement Jean-Marc pour les supports iconographiques (dont la page de couverture) toujours réalisés avec professionnalisme, rapidité et gentillesse.

Merci aussi à mes amis d'HEI qui se sont toujours intéressés à mon travail, même si finalement la biologie et l'immunologie du schistosome restent obscurs à leurs yeux!

Je voudrais également associer à ces remerciements toutes les personnes grâce auxquelles ces années de thèse resteront un merveilleux souvenir:

Je pense particulièrement à Ricardo, Juanita, Karine, Cécile, Catherine, Loïc, Rodolfo, P'tit Manu, Franck, Sophie, Pascal, Monica, Esteban.... mais j'oublie certainement beaucoup d'entre-vous, j'espère que vous me pardonneriez.

Je pense aussi à tous les membres de notre groupe de théâtre, Pierre-Yves, Catherine, Caroline, Sophie, Faouzi, Loïc(x2), Jean-Pierre, Dominique et Karine (encore!).

Je finirai par une attention toute particulière pour Nathalie et Hécator, qui ont partagé au quotidien rires, larmes, peines, joies... pendant 3 ans dans notre petit bureau, et qui n'ont pas manqué de me soutenir par mail et téléphone interposés depuis qu'ils m'ont "abandonnée"! Je suis tellement touchée par votre amitié, Merci.

Finalement, cette thèse n'aurait certainement pas vu le jour sans toi, Hervé, qui a su comprendre, approuver et encourager mon enthousiasme pour mon travail. L'amour que vous me portez, Nicolas et toi, m'aura beaucoup aidée.

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes:

Publications

Pierrot, C., Capron, A. & Khalife, J. (1995) Cloning and characterization of two genes encoding *Schistosoma mansoni* elastase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 113-117.

Pierrot, C., Godin, C., Liu, J.L., Capron, A. & Khalife, J. (1996) *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during parasite life-cycle. *Parasitology* **113**, 519-526.

Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. (1997) Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease. *Parasitology*, sous presse.

Communications

Khalife, J., Pierrot, C., Cocude, C., Godin, C. & Capron, A. *Schistosoma mansoni*: clonage, expression des antigènes cibles et modificateurs de la réponse immune. Etude de la régulation de leur expression. Colloque Lille-Université Libre de Bruxelles, Lille, 30 mai 1995.

Pierrot, C., Godin, C., Liu, J.L., Capron, A. & Khalife, J. Molecular characterization of *Schistosoma mansoni* elastase. British Society for Parasitology Spring Meeting, University of Wales, Bangor, UK, 1-3 April 1996.

Cocude, C., Pierrot, C., Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. Molecular characterization of two *Schistosoma mansoni* serine proteases. Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, 15-19 September 1996.

Pierrot, C., Cocude, C., Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. *Schistosoma mansoni*: Expression stade spécifique de deux serine protéases. Colloque Lille-Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, 9 janvier 1997.

Pierrot, C., Cêtre, C., Cocude, C., Capron, A. & Khalife, J. Immune response polarization: Role of *Schistosoma mansoni* proteases. British Society for Parasitology Spring Meeting, UMIST, Manchester, UK, 8-10 April 1997.

Cocude, C., Pierrot, C., Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. Molecular characterization of a novel *Schistosoma mansoni* Kallikrein-like protease. British Society for Parasitology Spring Meeting, UMIST, Manchester, UK, 8-10 April 1997.

Au cours de cette thèse j'ai également participé aux travaux suivants:

Khalife, J., **Pierrot, C.**, Godin, C. & Capron, A. Role of AP1 in Transcriptional regulation of *S. mansoni* Calreticulin. British Society for Parasitology Spring Meeting, University of Wales, Bangor, UK, 1-3 April 1996 (Absrt P4).

Petitprez, K., Grzych, J.M., **Pierrot, C.**, Capron, A. & Khalife, J. Molecular cloning and expression of an anti-idiotypic antibody mimicking a protective oligosaccharide of the parasite *Schistosoma mansoni* (soumis pour publication).

Cêtre, C., Cocude, C., **Pierrot, C.**, Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. *In vivo* expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni* (soumis pour publication).

Sommaire

Résumé.....	10
Abréviations	11
Introduction - Généralités.....	12
La schistosomiase ou bilharziose.....	13
Les protéases	43
Matériels et Méthodes	79
Résultats.....	100
Discussion - Perspectives.....	129
Références Bibliographiques.....	145
Annexes	175
Article 1	177
Article 2	183
Article 3	192
Table des Matières	222
Liste des Figures et Tableaux.....	227

Résumé

Les protéases de parasites sont des enzymes intéressantes à beaucoup d'égards; elles ont notamment déjà prouvé leur potentiel dans le cadre de stratégies chimio- ou immunothérapeutiques. Chez *Schistosoma mansoni*, de nombreuses protéases ont été décrites et nous avons choisi de nous intéresser à la seule sérine protéase caractérisée chez ce parasite, l'élastase de cercaire, connue pour sa participation active dans la pénétration des larves chez l'hôte définitif. Notre travail s'est divisé en trois parties:

1) Nous avons montré par des approches moléculaires et immunologiques que l'expression de l'élastase est étroitement régulée au cours du développement de *S. mansoni*. Dans la mesure où un décalage existe entre la présence du transcrit et celle de la protéine correspondante, cette régulation semble apparaître aux niveaux transcriptionnel ainsi que traductionnel.

2) Afin de vérifier si la composante transcriptionnelle de cette régulation pouvait s'expliquer par la présence de régions promotrices particulières, nous avons cloné et séquencé le gène de l'élastase. Nous avons ainsi identifié des séquences consensus pour des facteurs de transcription décrits chez les eucaryotes, potentiellement régulés par des cytokines inflammatoires. De plus, cette étude nous a conduits à mettre en évidence la présence d'un second gène codant pour cette enzyme, celui-ci semblant être un pseudogène.

3) La dernière partie de notre travail consistait en une approche plus appliquée et concerne le rôle éventuel de l'élastase dans le cadre très large d'une stratégie de lutte contre le parasite. Ainsi, nous avons montré le potentiel de cette protéase en tant que cible du système immunitaire de l'hôte. En effet, le rat est capable de produire des anticorps anti-élastase présentant une cytotoxicité *in vitro* vis-à-vis des larves du parasite en présence de cellules effectrices. Des premiers résultats semblent également indiquer que cette molécule pourrait intervenir dans la polarisation de la réponse immune en faveur de l'hôte.

Abréviations utilisées

ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNg	Acide DésoxyriboNucléique génomique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTF	Cercarial Transforming Fluids
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNP-Alb	Dinitrophenyl Albumine (humaine)
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EL, ELm	Elastase sous forme préproenzyme, sous forme mature
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
hsp	heat-shock protein
IL	Interleukine
IFN	Interféron
IPTG	Isopropyl B-D Thiogalactoside
i.v.	intra-veineux
kDa	kilo Dalton
kpb	kilo paire de bases
MEM	Minimum Eagle's Medium
min	minute
MMP	Matrix MetalloProtease
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPD	Ortho Phénylène Diamine
OVA	Ovalbumine
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
pb	paire(s) de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phényl Méthyl Sulfonide
PZQ	Praziquantel
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SCID	Severe Combine ImmunoDeficiency
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEA	Soluble Egg Antigen
Sm28GST	Glutathion S-Transférase de 28kDa de <i>S. mansoni</i>
SRP	Schistosomula Released Products
SWAP	Soluble Worm Antigen Preparation
TNF	Tumor Necrosis Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
X-Gal	5 Bromo 4 Chloro 3 Indoyl B D Galactopyranoside

INTRODUCTION

GENERALITES

La schistosomiase ou bilharziose

La schistosomiase ou bilharziose (du nom de Théodor Bilharz qui, le premier, décrit le parasite en 1851) est une infection parasitaire à transmission aquatique. Cette maladie représente la seconde endémie parasitaire dans le monde après le paludisme, et constitue un problème majeur de santé publique dans de nombreux pays tropicaux et subtropicaux. On estime en effet à 500 000 le nombre de personnes qui meurent chaque année des suites d'une bilharziose. De plus, la maladie aurait également des conséquences notables sur le développement physique et les performances intellectuelles des enfants d'âge scolaire (Wiest, 1996).

Les agents responsables de l'infection sont les schistosomes, vers plats hémato-phages. Ils décrivent un cycle évolutif indirect passant par un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce, et un hôte définitif mammifère. Les diverses pathologies causées par les schistosomes sont essentiellement liées à la localisation des différentes espèces du parasite au sein de l'hôte définitif.

La lutte contre la bilharziose est essentiellement basée sur les différents moyens d'interrompre le cycle du parasite, à quelque stade que ce soit. Ainsi, de nombreux organismes internationaux ont mis en place des programmes destinés à la prévention, à la surveillance épidémiologique, au traitement et à la recherche d'un vaccin efficace. Les recherches effectuées dans ce domaine ont déjà permis de mieux connaître le parasite, ainsi que la réponse immune générée lors d'une infection, ce qui a conduit au développement de différentes stratégies vaccinales. Actuellement ces stratégies s'orientent de plus en plus vers un contrôle de la pathologie.

1. Le Parasite

1.1. Généralités

Les schistosomes sont des vers appartenant à l'embranchement des Plathelminthes (vers plats non-segmentés), à la classe des Trématodes, sous-classe des digènes (deux hôtes), à la famille des Schistosomatidae et au genre *Schistosoma* qui rassemble 18 espèces. Parmi elles, cinq espèces peuvent infecter l'homme. La distinction entre les espèces est basée sur des critères morphologiques, biochimiques, parasitologiques et pathogéniques (Tableau I).

TABLEAU I: *Espèces de schistosomes infectant l'homme. Principaux caractères distinctifs (D'après Larivière, 1993)*

schistosomes	organe touché	nbre d'oeufs pondus/jour	forme des oeufs	hôte intermédiaire	hôtes définitif (≠ de l'homme)
<i>S. mansoni</i>	intestin	100-300	éperon latéral	<i>Biomphalaria</i>	rongeurs
<i>S. haematobium</i>	vessie	20-200	éperon terminal	<i>Bulinus</i>	-
<i>S. intercalatum</i>	rectum	inconnu	éperon terminal	<i>Bulinus</i>	rongeurs
<i>S. japonicum</i>	intestin	500-3500	rond	<i>Oncomelania</i>	bovins/rongeurs/ porcs/chiens...
<i>S. mekongi</i>	intestin	inconnu	rond	<i>Tricula</i>	bovins/rongeurs/ porcs/chiens...

La plupart des espèces respecte une spécificité d'hôte, excepté *Schistosoma japonicum* et *Schistosoma mekongi* qui parasitent homme et bétail. Il existe également un nombre important d'espèces zoophiles parmi lesquelles *Schistosoma bovis* et *Schistosoma mattheei* qui infectent le bétail, ce qui entraîne des pertes économiques importantes.

1.2.Cycle

Le cycle parasitaire s'effectue entre un hôte définitif mammifère et un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce (Fig. 1).

La pénétration de la forme infestante du parasite, la **furcocercaire** (issue du mollusque), dans l'hôte définitif commence par une étape de fixation à la peau par deux ventouses munies d'épines. Par des mouvements vibratoires et la sécrétion d'enzymes protéolytiques au niveau des glandes céphaliques, la cercaire va traverser les couches supérieures de la peau en quelques minutes. Au cours de la pénétration, elle va perdre sa queue bifide qui lui permettait de nager en quête de son hôte. C'est la première des modifications que subit le parasite, alors appelé **schistosomule**.

Tout en poursuivant ses processus de maturation, le schistosomule quitte le derme, atteint la lumière d'une veine ou d'un vaisseau lymphatique, et est entraîné par le flux sanguin jusqu'au cœur puis aux poumons. Le stade pulmonaire du schistosomule va durer 3 à 4 jours durant lesquels le parasite s'étire (passant d'une longueur de 300 μm à près de 900 μm) afin de se faufiler dans les fins capillaires pulmonaires. Par la suite, le schistosomule sera entraîné vers l'aorte, les artères mésentériques et la veine porte, jusqu'au foie, son lieu de maturation.

Le jeune parasite va alors se différencier en **schistosome** et subir une maturation sexuelle. S'il est de sexe mâle, il acquiert la morphologie caractéristique du schistosome mâle, sa face ventrale formant un canal gynécophore dans lequel se loge la femelle. Il s'accouple ainsi à une femelle schistosome qui peut, alors seulement, atteindre sa maturité sexuelle. Chez l'homme, les vers peuvent demeurer accouplés pendant plusieurs années. La longueur des vers varie de 6 à 26 mm; la femelle plus fine que le mâle est généralement plus longue. Les vers appariés se déplacent ensuite à contre-courant du flux sanguin grâce à leurs deux ventouses latérales et vont gagner leur lieu de ponte. La majorité des espèces de schistosomes infectant l'homme va se nicher dans les veines proches de l'intestin. L'espèce *S. haematobium*, quant à elle, a un tropisme particulier pour le système urogénital.

Les femelles matures vont produire des **oeufs** en continu; on estime que la femelle de *S. mansoni* pond jusqu'à 300 oeufs par jour. Les oeufs de *S. mansoni* sont ensuite disséminés dans divers organes internes, notamment le foie, où à la faveur du rétrécissement des vaisseaux sanguins, ils se trouvent bloqués. Les oeufs sont alors la cible d'une forte

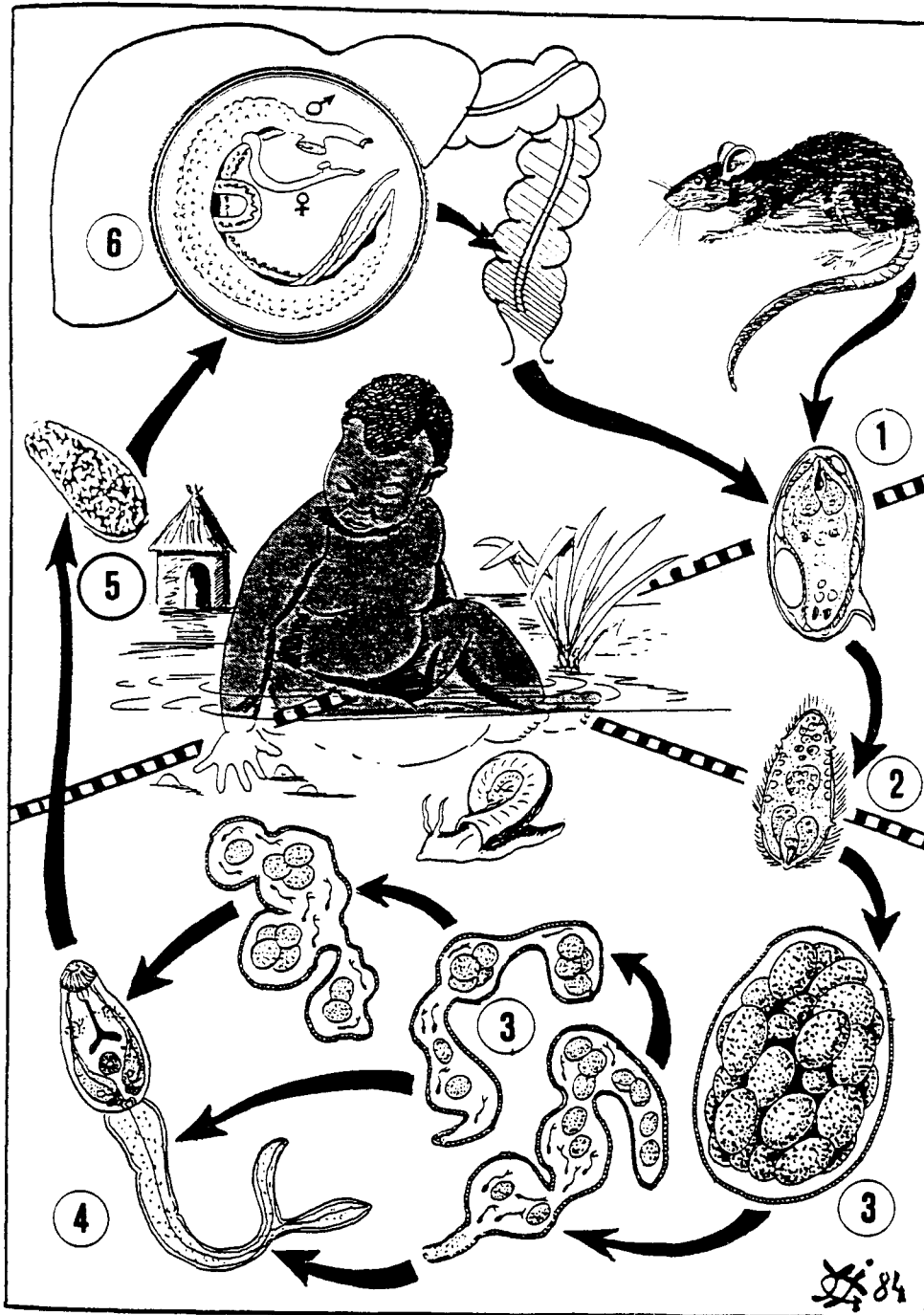


Figure 1: Cycle de vie de *Schistosoma mansoni* (d'après Golvan, Y.J., Ed. Flammarion, 1969).

réaction inflammatoire désignée sous le terme de réaction granulomateuse. Ils sont ainsi responsables de la pathologie liée à l'infection et permettent la poursuite du cycle parasitaire. En effet, les oeufs qui franchissent les muqueuses de l'appareil urinaire (*S. haematobium*) ou intestinal (*S. mansoni* et *S. japonicum*), par la sécrétion de substances protéolytiques, sont excrétés dans les urines ou les selles et sont ainsi libérés dans l'eau.

Les oeufs vont alors donner naissance, quand certaines conditions de milieu sont réunies (pH neutre, luminosité suffisante, hydrométrie, salinité modérée et température proche de 30°C), à une forme larvaire libre, le **miracidium**. Celui-ci est extrêmement mobile car doté de cils vibratils lui permettant de se déplacer en quête de son hôte intermédiaire, vraisemblablement attiré par des facteurs chimiotactiques. Les mollusques-hôtes sont spécifiques de chaque espèce (cf Tableau I), cette spécificité étant déterminée par des facteurs génétiques.

A l'intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en **sporocyste** primaire et rejoint l'hépatopancréas de l'hôte intermédiaire. Il passe alors, en 3 à 8 semaines, du stade sporocyste primaire et secondaire à celui de furcocercaire par multiplication asexuée et polyembryonie. Un seul miracidium peut ainsi aboutir à la production de 100 000 cercaires. Les mollusques infestés stimulés par la lumière et la chaleur, larguent alors chaque jour dans l'eau environnante des milliers de cercaires qui ne peuvent survivre plus de 48h en attente de l'hôte définitif.

1.3.Biologie

1.3.1. Caractères originaux des schistosomes

Les schistosomes dans leur ensemble sont des parasites surprenants à plusieurs égards:

- Tout d'abord, leur génome, bien que très partiellement connu, présente des originalités telles que l'existence de très petits introns; ceci sera développé dans le paragraphe suivant.
- D'autre part, l'habitat sanguin du schistosome est une autre originalité. En effet, chez la quasi-totalité des trématodes, les cercaires émises s'enkystent dans ou sur un support comestible, et deviennent des vers adultes lorsqu'elles sont ingérées par

un vertébré; la transmission à l'homme se fait donc par ingestion (cas des douves). Par contre, les cercaires de schistosomes pénètrent directement à travers la peau humaine, et le fait que les parasites deviennent adultes dans l'appareil circulatoire peut apparaître comme une conséquence de ce mode de contamination.

- Contrairement à l'immense majorité des trématodes, les schistosomes ont des sexes séparés et présentent un très fort dimorphisme sexuel. Cependant, il semble que le schistosome soit malgré tout capable d'hermaphrodisme (Basch *et al.*, 1990) ou de parthénogénèse (Basch *et al.*, 1984).
- Le comportement sexuel des schistosomes est également surprenant: d'une part l'accouplement est permanent, le mâle portant la femelle dans son canal gynécophore, d'autre part il semble que les couples ainsi formés soient fidèles (Tchuem Tchuente *et al.*, 1996).

Une autre particularité des schistosomes réside dans leur "ponctualité", phénomène traduisant l'extrême adaptation du parasite à son hôte définitif. En effet, l'étude des "profils d'émergence" des cercaires montre que la forme infestante du schistosome va quitter son hôte intermédiaire à une heure de la journée qui coïncide le mieux possible avec le moment où son hôte définitif fréquente le milieu aquatique (Combes, 1993). Il s'agira du milieu de la journée (pic à 11h) pour *Schistosoma mansoni* lorsque les activités de l'homme (travail, tâches ménagères ou loisirs) le mènent au contact de l'eau, alors que les cercaires de l'espèce *S. bovis* seront présentes dans l'eau à l'heure où le bétail vient s'abreuver (pic à 9h). Cette chronobiologie cercarienne est génétiquement déterminée chez le schistosome (Théron & Combes, 1988) et ne dépend pas de l'activité propre du mollusque.

1.3.2. Génétique du schistosome

Le génome nucléaire du schistosome comprend environ $2,7 \cdot 10^8$ pb (Simpson *et al.*, 1982). Il est composé de 4-8% de séquences hautement répétées et de 60% de séquences présentes en copie unique, et il est particulièrement riche en bases A et T (66%). Les schistosomes possèdent 7 paires de chromosomes autosomes et une paire de chromosomes sexuels (ZZ pour le mâle et ZW pour la femelle). Par la technique de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), on ne distingue pas de polymorphisme entre les souches d'une même espèce isolées de zones géographiques distinctes (Simpson *et al.*, 1995).

Les connaissances sur le génome du schistosome sont assez fragmentaires. Cependant, au vu du cycle complexe du parasite, impliquant de nombreux changements morphologiques, physiologiques et biochimiques, il est admis que le génome du schistosome doit être particulièrement adaptatif, en termes de régulation de l'expression des gènes, et de réponse aux différents stress. En dehors des gènes constitutifs, on peut donc s'attendre à l'existence de deux groupes de gènes: un premier groupe régulé par le stress (thermique, osmotique ou oxydatif) et un second régulé au cours du développement du parasite. Cette régulation peut se traduire tout d'abord en termes d'organisation des gènes. Ainsi il a été décrit chez *S. mansoni* la présence d'introns de très petite taille (entre 30 et 50pb) (Craig *et al.*, 1989; Duvaux-Miret *et al.*, 1991; Roche *et al.*, 1994). A l'opposé, certains gènes du schistosome présentent des introns d'une taille supérieure à 3kpb. C'est le cas de la glutathion peroxydase (Roche *et al.*, 1994), de l'HGPRTase (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) (Craig *et al.*, 1989) et de la glutathion *S*-transférase Sm28 (Mc Nair *et al.*, 1993). Enfin d'autres gènes tels que ceux codant pour des protéines de la coquille d'oeuf (Henkle *et al.*, 1990; Bobek *et al.*, 1988; 1989) ou celui de la hsp 70 (Neumann *et al.*, 1992), ne possèdent pas d'intron.

Bien que les très petits introns décrits ne présentent pas les 11 pyrimidines successives nécessaires au mécanisme d'épissage décrit chez les eucaryotes, les séquences consensus de jonction (GT en 5' et AG en 3') existent, et doivent permettre l'édition normale des ARN. D'autre part, des mécanismes d'épissage alternatif ont été rapportés (Davis *et al.*, 1988; Shoemaker *et al.*, 1992a) ainsi que des mécanismes d'épissage en *trans*. Deux auteurs (Davis *et al.*, 1988; Shoemaker, 1994) ont rapporté l'existence de messagers d'un même gène de tailles différentes résultant d'une initiation de la transcription à deux sites différents.

Peu d'études concernent la régulation de l'expression des gènes du schistosome par des facteurs de transcription. Cependant, les régions promotrices de plusieurs gènes ont montré des séquences homologues à des motifs de reconnaissance de facteurs de transcription décrits chez les eucaryotes (Faisst *et al.*, 1992) (Tableau II).

L'évaluation fonctionnelle des différents sites décrits est actuellement limitée par l'absence de lignée cellulaire de schistosome. Cependant, Khalife *et al.* (1995) ont montré, dans un système hétérologue, que le site AP1 situé dans la région 5' du gène de la calréticuline était fonctionnel *in vitro*. Par ailleurs, Zemzoumi *et al.* (1995) ont, d'une part, montré l'interaction de facteurs nucléaires de *S. mansoni* avec la CCAAT box décrite sur le

gène de la Sm28GST et, d'autre part, cloné la sous-unité NF-YA du facteur liant cette CCAAT box (Zemzoumi *et al.*, 1996). Récemment, l'implication des deux CCAAT box et du site AP1 dans l'activité promotrice de ce gène a été confirmée *in vitro* (Serra *et al.*, 1996).

TABLEAU II: Quelques gènes de schistosome pour lesquels des sites potentiellement régulateurs ont été décrits.

gène	espèce	sites décrits	référence
Gp22	<i>S. mansoni</i>	SP1, CCAAT box en tandem, c/EBP homologue	El Sherbeini <i>et al.</i> , 1991
hsp 70	<i>S. mansoni</i>	HSE, CCAAT box inversée	Neumann <i>et al.</i> , 1992
protéines de coquille d'oeuf	<i>S. mansoni</i> <i>S. haematobium</i> <i>S. japonicum</i>	} CCAAT box	Bobek <i>et al.</i> , 1988 Bobek <i>et al.</i> , 1989 Henkle <i>et al.</i> , 1990
calréticuline	<i>S. mansoni</i>	CCAAT box inversée, AP1	Khalife <i>et al.</i> , 1993
Sm28GST	<i>S. mansoni</i>	CCAAT box, AP1	McNair <i>et al.</i> , 1993 Zemzoumi <i>et al.</i> , 1995
α -tubuline	<i>S. mansoni</i>	CCAAT box	Duvaux-Miret <i>et al.</i> , 1991

1.3.3. Antigènes du schistosome

L'identification d'antigènes présents chez les schistosomes, en particulier chez *S. mansoni*, a été motivée à l'origine par la recherche de protéines à potentiel vaccinal. Sont présentés ici, de façon non exhaustive différents antigènes de schistosome, le potentiel vaccinal de certains d'entre-eux sera exposé dans un paragraphe suivant.

1.3.3.1. Epitopes carbohydrates

L'importance des antigènes de nature carbohydrate dans les infections par les helminthes et particulièrement dans la schistosomiase, a été largement décrite. Des études à partir d'infections expérimentales et humaines par *S. mansoni*, couplées à l'utilisation d'anticorps monoclonaux ont permis de caractériser une glycoprotéine de 38 kDa (Dissous *et al.*, 1982; 1984) présente à la surface des schistosomules. Cet antigène fortement

immunogénique s'est révélé posséder un épitope (protecteur) commun non seulement avec un oligosaccharide de *B. glabrata*, mais aussi avec l'hémocyanine d'un mollusque marin (*Megathura crenulata*) ou KLH (pour "Keyhole Limpet Haemocyanin") (Dissous *et al.*, 1986). Or il a été décrit que les structures oligosaccharidiques pouvaient jouer un rôle essentiel dans l'adaptation osmotique des microorganismes (Miller *et al.*, 1986). Il est donc tentant d'interpréter cette conservation de l'épitope glycanique de la 38kDa au cours de l'évolution, en termes d'adaptation du schistosome aux brusques modifications d'osmolarité, notamment entre le stade larvaire aquatique et le stade schistosomule dans les tissus de l'hôte définitif.

1.3.3.2. Enzymes

Dans ce paragraphe, nous ne décrivons que certaines des enzymes essentielles à la survie du parasite.

Enzymes du métabolisme glucidique: le métabolisme glucidique concerne des transporteurs, des enzymes de glycolyse et des protéines intervenant dans le cycle de Krebs. Ces enzymes ont également été décrites comme immunogènes potentiels. Une G3PDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) a été clonée chez *S. mansoni* (Goudot-Crozel *et al.*, 1989). On note également chez *S. mansoni* la lactate deshydrogénase et la triose-phosphate isomérase (Shoemaker *et al.*, 1992b), pour lesquelles des formes membranaires ont été décrites.

Enzymes de détoxication: les enzymes de détoxication exprimées par le parasite sont nombreuses et interviennent dans la protection contre les dérivés oxydatifs. Ces dérivés sont générés par les radicaux libres issus du métabolisme cellulaire ou émis par le système immunitaire (Callahan *et al.*, 1988). Ainsi, ont été isolées chez *S. mansoni* deux glutathion *S*-transférases de 26 et 28 kDa (Trottein *et al.*, 1990; Balloul *et al.*, 1987a), une glutathion peroxydase (Williams *et al.*, 1992) ainsi que des superoxyde dismutases (Simurda *et al.*, 1988; Da Silva *et al.*, 1992). De plus, chez *S. mansoni* une partie de l'ADNc codant pour une glutathion réductase (correspondant au site de fixation au glutathion) a été récemment clonée dans notre laboratoire (E. Serra, communication personnelle). Cependant il semble que les Trématodes ne possèdent pas de catalase, enzyme intervenant dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène.

Protéases: de très nombreuses protéases ont été identifiées chez les helminthes. Ce sujet fera l'objet d'un chapitre ultérieur.

1.3.3.3. Protéines de structure

Les antigènes de structure ont également été décrits comme impliqués dans l'immunité anti-schistosome. Pearce *et al.* (1986) ont caractérisé une molécule de 97kDa, la Sm 97, qui a été ensuite identifiée à une paramyosine (Lanar *et al.*, 1986). Cette protéine a une structure en hélice- α et constitue le cœur des filaments de myosine. D'autres molécules de structure, la myosine, la tropomyosine et l' α -tubuline ont également été identifiées chez *S. mansoni* (Newport *et al.*, 1987, Xu *et al.*, 1989; Duvaux-Miret *et al.*, 1991). Un homologue de la chaîne lourde de la β -myosine, la molécule irv-5 a été identifiée et s'est révélée être un candidat vaccinal majeur (Amory-Soisson *et al.*, 1992).

1.3.3.4. Protéines de choc thermique

La synthèse de protéines de choc thermique (hsp, pour "heat shock protein") peut résulter de diverses modifications d'environnement, telles que les variations de température et d'osmolarité rencontrées par le schistosome au cours de son cycle biologique. Les hsp sont des composants fortement immunogéniques, bien qu'elles soient très homologues à celles de l'hôte (Newport, 1988a). Des hsp 70 ont été caractérisées chez *S. mansoni* et *S. japonicum* (Hedstrom *et al.*, 1987; Scallon *et al.*, 1987), et dans le second cas, leur implication dans la formation du granulome a été suggérée. Chez *S. mansoni*, une protéine de plus petite taille (40 kDa), présente dans les oeufs et les miracidiums, a également été identifiée comme une hsp (Nene *et al.*, 1986).

2. Régions endémiques et pathologies

2.1. Répartition géographique

Les schistosomiasés sont endémiques dans 74 pays sur les continents africain, américain et asiatique. 600 millions de personnes sont exposées au risque d'infection et 200 millions sont infectées. Les schistosomes étant exigeants vis-à-vis de leurs hôtes intermédiaires mollusques d'eau douce, les zones du globe susceptibles d'abriter une endémie bilharzienne (Figure 2) sont celles qui offrent simultanément au moins une espèce de mollusque vecteur compatible, des conditions d'hygiène humaine déficientes ainsi que des conditions hydriques convenables (eau douce, température supérieure à 20°C).

S. haematobium, agent de la bilharziose vésicale, est endémique dans 54 pays d'Afrique et de Méditerranée orientale et on estime à 90 millions le nombre de personnes infectées. *S. mansoni* à localisation intestinale, concerne 53 pays situés en Afrique, dans la péninsule arabique, en Amérique du Sud et dans les Caraïbes. *S. japonicum* et *S. mekongi*, responsables d'une bilharziose intestinale, sévissent en Asie. L'espèce *japonicum* est notamment présente en Chine, aux Philippines, au Japon et en Indonésie, alors que *S. mekongi* a été identifié au Cambodge et au Laos (presqu'île du Mékong). *S. intercalatum*, à localisation rectale chez l'homme, est quant à lui, un parasite strictement africain. Sa présence a été détectée au Tchad, en Ouganda, au Zaïre, au Gabon et au Cameroun.

Cohabitation de plusieurs espèces: *S. mansoni*, *S. haematobium*, et *S. intercalatum* coexistent dans plusieurs pays d'Afrique centrale et occidentale. Cette cohabitation peut avoir plusieurs conséquences importantes (Tchuem Tchuente *et al.*, 1996). Tout d'abord, elle peut exercer une influence sur l'épidémiologie du parasite. Ainsi, l'existence d'un mécanisme de compétition entre deux espèces de parasite capables d'infecter le même hôte peut entraîner un phénomène d'exclusion. Un facteur important limitant la distribution de *S. intercalatum* en Afrique pourrait provenir d'une telle exclusion entre cette espèce et *S. mansoni* (Tchuem Tchuente, 1995) ou *S. haematobium*. D'autre part, cette compétition entre les différentes espèces pourrait en partie expliquer la localisation différente des schistosomes africains chez

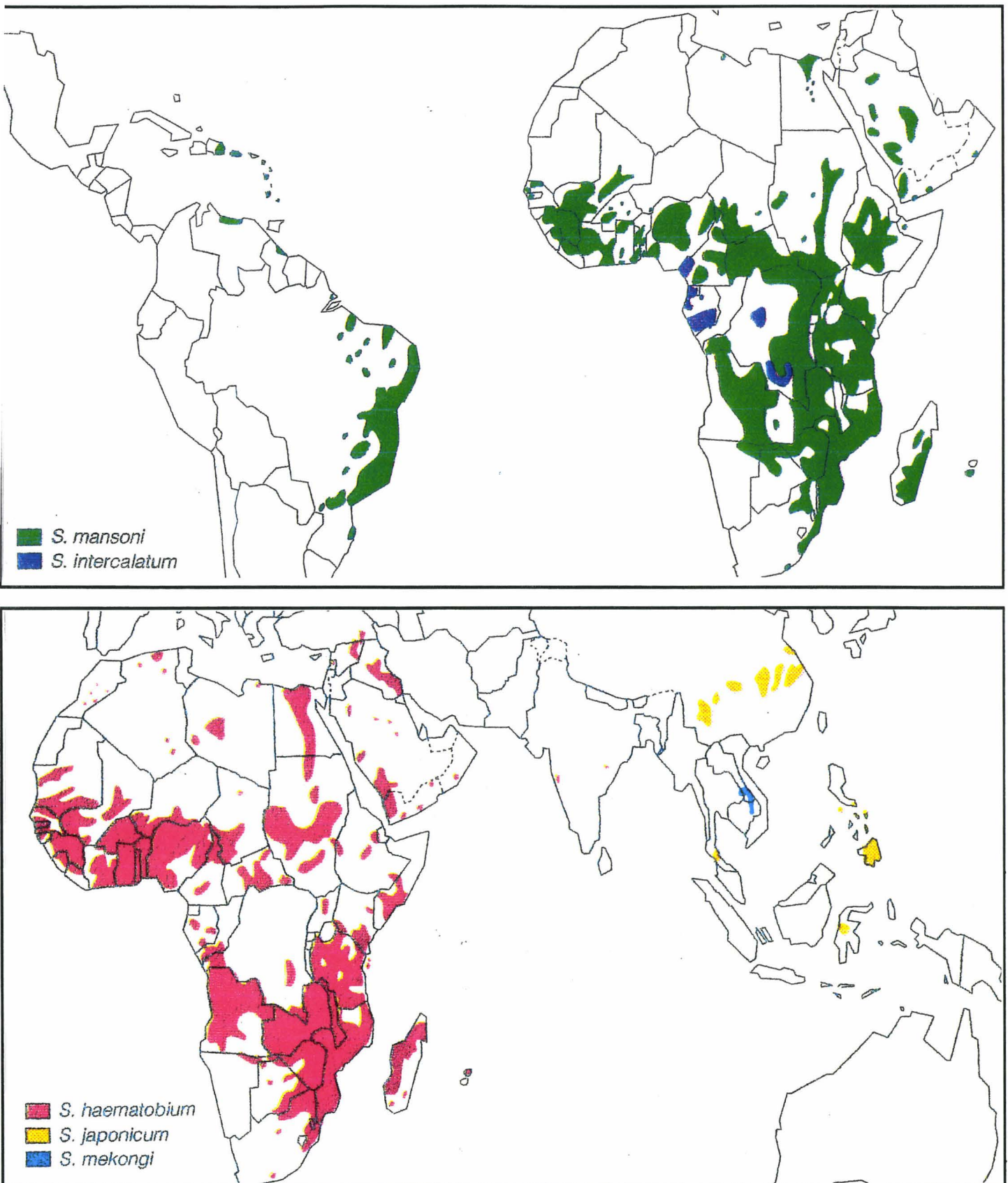


Figure 2: Répartition géographique des différentes espèces de schistosomes (d'après WHO, 1993)

leur hôte humain: *S. mansoni* est retrouvé dans l'intestin, *S. haematobium* dans la vessie et *S. intercalatum* dans le rectum.

Des appariements interspécifiques au sein d'un même hôte peuvent entraîner l'apparition d'hybrides qui vont influencer l'hétérogénéité génétique des populations naturelles avec des conséquences possibles sur le pouvoir infectieux. Ainsi, l'évolution des prévalences des porteurs d'oeufs hybrides entre 1984 et 1992 au Gabon est en faveur d'un développement de l'espèce hybride (Richard-Lenoble *et al.*, 1993).

Facteurs humains: dans certains pays, les programmes de lutte institués depuis quelques années ont fait diminuer la prévalence et la morbidité des bilharzioses. Ainsi, l'augmentation du niveau de vie, corrélée à la construction de latrines et d'adductions d'eau, ainsi que l'apparition d'eau filtrée pour l'utilisation quotidienne entraînent une régression de l'incidence de la schistosomiase. Ceci a été observé aux Antilles, en Chine et surtout au Japon, où cette régression a été rendue possible par le développement socio-économique.

A l'inverse, dans de nombreux pays, le développement et l'utilisation des ressources hydrauliques (barrages, cultures rizicoles, réserves d'eau...) ont provoqué la multiplication de biotopes aquatiques où sont venus proliférer des hôtes intermédiaires. Ainsi, l'aménagement du delta et de la basse vallée du fleuve Sénégal pour la culture de la canne à sucre a permis la multiplication de *Biomphalaria* dans les canaux d'irrigation. La bilharziose intestinale, jusque-là inconnue, s'est alors développée d'une manière explosive: à Richard-Toll, le dépistage des premiers cas a été réalisé en 1988, et 30 mois plus tard, 60% de la population était atteinte.

Additionné à tous ces facteurs, le flux migratoire des populations va également modifier la répartition géographique des aires d'endémies; on assiste donc à une épidémiologie en constant remaniement.

2.2.Pathologies associées aux bilharzioses

Au sein d'une population infectée, les manifestations cliniques sont extrêmement variables. Elles sont associées à l'intensité de l'infection, à la souche du parasite infestant, à la fréquence des réinfections, au statut immunitaire de l'individu infecté ainsi qu'à des facteurs génétiques de l'hôte. Les prévalences d'infection les plus élevées et l'intensité des infections les plus importantes sont observées chez les enfants âgés de 5 à 15 ans, le nombre

d'oeufs excrétés et l'intensité des lésions diminuant au cours du temps (Larivière, 1993). Cependant, il s'avère, d'après une enquête échographique sur une population infectée par *S. japonicum*, que les adultes excrétant le moins d'oeufs (âgés de 40 à 49 ans) sont également ceux qui ont la plus forte prévalence de fibrose hépatique avancée (Wiest, 1996).

Selon la localisation des vers et la circulation des oeufs, on distingue des atteintes urogénitales (*S. haematobium*), l'infection à terme pouvant toucher les reins et provoquer des déficiences graves, et des atteintes hépato-intestinales (*S. mansoni* et *S. japonicum*).

Dans les pays en voie de développement, d'autres maladies fréquemment associées aux schistosomiasés, telles que l'hépatite B, la salmonellose ou encore la shigellose (pour *S. mansoni*) et le cancer de la vessie (pour *S. haematobium*), viennent encore aggraver le tableau clinique. De manière générale, l'altération de la réponse immunitaire provoquée par le parasite entraîne, chez la souris, une diminution de la capacité d'élimination d'autres pathogènes (Actor *et al.*, 1993; 1994).

La bilharziose intestinale à *S. mansoni* est la forme la plus répandue des bilharzioses. Après l'infestation, la maladie évolue en deux phases: une phase d'invasion souvent latente mais parfois assez marquée avec des troubles généraux, et une phase d'état avec des troubles intestinaux.

Phase d'infestation: lors du bain en eau contaminée par des mollusques infestés, chez un sujet non immunisé, la pénétration transcutanée des cercaires s'effectue en quelques minutes. Il s'ensuit une réaction cutanée allergique appelée "dermatite du nageur" (prurit puis érythème).

Phase d'invasion: au bout de quelques semaines ou mois (phase de migration de schistosomules), la phase d'invasion se manifeste par des réactions immuno-allergiques. Apparaissent alors des troubles souvent attribués à une fatigue de voyage: fièvre, associée ou non à des symptômes plus ou moins marqués (urticaire, oedème, sueurs, toux, troubles digestifs...). A ce stade on observe une hyperéosinophilie sanguine mais le diagnostic ne peut être affirmé que par analyse sérologique. Sans traitement cette phase peut persister plusieurs semaines, alors qu'elle régresse rapidement sous thérapeutique spécifique.

Phase d'état: elle correspond à l'installation des vers adultes dans leur site définitif et à la ponte des oeufs. Cette phase apparaît au minimum 2 mois après l'infestation, mais peut ne se

manifester que beaucoup plus tard. Les formes les plus “bénignes” se traduisent par une gêne intestinale (forme chronique intestinale) due à la présence des oeufs. Les lésions provoquées par le passage de la muqueuse intestinale peuvent conduire à des diarrhées sanglantes et à la formation de polypes. Les formes sévères de la maladie sont liées à la présence des oeufs dans le foie.

Complications: les complications aiguës sont fréquentes: appendicite, occlusion intestinale et surtout hypertension portale due aux oeufs bloqués dans les capillaires hépatiques, altérant la circulation sanguine. Cette hypertension portale peut être responsable d'une fuite de plasma sanguin dans la cavité abdominale (ascite) ou dans les tissus (oedèmes). Les oeufs sont également la cible d'une réaction inflammatoire avec un afflux de cellules mononuclées (granulome primaire). A la maturité, le granulome est composé en majorité d'éosinophiles et en proportion plus faible de lymphocytes T et B, de macrophages, de mastocytes, de neutrophiles et de fibroblastes (Weinstock & Boros, 1983). Les granulomes vont ensuite évoluer vers une fibrose qui devient progressivement irréversible. Lorsqu'elle est massive, elle génère une circulation collatérale et des varices. Le risque majeur réside alors dans la rupture de ces varices associée à des hémorragies.

3. Lutte contre les schistosomiasés

Si on observe le cycle de vie des schistosomes il apparaît théoriquement possible de contrôler les bilharzioses en interrompant ce cycle en l'un de ses points. Les moyens de lutte peuvent être rassemblés en trois groupes: prophylaxie sanitaire, lutte anti-vectorielle, prophylaxie médicale.

3.1. Prophylaxie sanitaire

Ayant pour but d'interrompre le cycle du parasite, la prophylaxie sanitaire a été pendant longtemps la seule méthode pratique de lutte contre les schistosomiasés. Elle 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 contaminés. Ce programme d'éducation sanitaire, bien qu'indispensable, doit toutefois s'intégrer dans un projet beaucoup plus vaste de développement économique des pays concernés, pour aboutir à un réel succès. Cependant toutes les démarches d'assainissement devront prendre en compte l'impact qu'elles auront sur les potentialités de transmission de la maladie (cf. §2.1).

Une stratégie globale, incluant à la politique d'assainissement, d'une part le dépistage et le 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 dispositions très difficiles à mettre en place sur le terrain, elle n'a pu s'étendre à tous les pays concernés par la schistosomiasé (Capron, 1993).

3.2. Lutte anti-vectorielle

Cette stratégie constitue une autre façon d'interrompre le cycle parasitaire, et consiste en la lutte vis-à-vis des mollusques vecteurs.

3.2.1. Utilisation de molluscicides

L'emploi de molluscicides a été l'une des premières méthodes utilisées pour lutter contre les mollusques vecteurs. Dès le début du siècle, de nombreux composés chimiques, tels que le sulfate de cuivre ou d'ammonium, l'oxyde de calcium ou encore l'arsenate, ont été utilisés. Depuis, de nombreuses molécules ont été testées, les plus récentes étant le niclosamide (bayluscide ou mollutox) et le frescon (N-tritylmorpholine). Utilisés à grande échelle dans différents pays comme l'Égypte ou le Vénézuéla, mais aussi parfois de façon plus restreinte comme à l'Île Ste Lucie dans les Caraïbes, 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 localisée. Actuellement, des études se poursuivent pour que l'emploi de ces produits puisse se faire à grande échelle, sans entraîner aucun risque écologique (Capron, 1993).

De nombreux travaux de recherche ont été également consacrés aux molluscicides végétaux, cependant aucun produit de ce type n'a été utilisé à grande échelle.

3.2.2. Réalisation de grands travaux

Localement, certaines actions ont été menées afin de 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 du nombre de mollusques. En Chine, par exemple, où sévit *S. japonicum*, d'énormes travaux de drainage réalisés périodiquement ont permis, par la destruction des mollusques, de réduire les foyers de bilharziose dans plusieurs régions (Butterworth, 1988).

3.2.3. Procédés biologiques: les prédateurs et les compétiteurs

Outre les moyens chimiques ou physiques, des méthodes biologiques ont été également envisagées. L'utilisation de prédateurs de mollusques a parfois permis de lutter contre les bulins; cependant, leur utilisation dans certains foyers a été catastrophique,

entraînant une élimination de nombreuses espèces sans avoir aucun effet sur celle visée (Combes *et al.*, 1992).

D'autre part, des compétiteurs biologiques tels que des mollusques non vecteurs ont été expérimentalement introduits dans certains foyers. Néanmoins, malgré quelques essais encourageants (Porto Rico, Antilles, Ile Ste Lucie), cette méthode est limitée par l'inefficacité des mollusques compétiteurs dans certains écosystèmes, ce qui rend leur introduction impossible dans certains foyers.

Finalement, force est de constater qu'aucune stratégie de lutte antivectorielle n'est satisfaisante même si de nombreuses équipes sont convaincues que les espoirs les plus prometteurs dans ce domaine résident dans la manipulation génétique des mollusques vecteurs. Aussi actuellement, la méthode de lutte contre la schistosomiase la plus efficace consiste en une prophylaxie médicale.

3.3. Prophylaxie médicale

3.3.1. Chimiothérapie

Les bilharzioses n'ont jamais été faciles à traiter car les premiers médicaments ont souvent été très toxiques et peu efficaces. L'hycanthone a représenté en son temps un indéniable progrès, mais il est maintenant largement supplanté et a disparu de la liste des médicaments essentiels. Actuellement, le praziquantel (PZQ) est le composé le plus utilisé devant l'oxamniquine.

Le PZQ est le seul composé actif sur toutes les espèces de schistosomes infectant l'homme. Le taux de guérison, déterminé par l'arrêt définitif de l'émission d'oeufs dans les selles, est estimé à environ 90% dans le cas de la schistosomiase à *S. mansoni*. En raison de son action anti-inflammatoire non-spécifique, le PZQ entraîne également une régression des lésions viscérales peu développées. Bien que ses effets sur le parasite soient connus, le mode d'action de cette molécule reste encore mal déterminé. Le PZQ provoque *in vitro* une contraction musculaire paralysante, une dépolarisation membranaire et un influx de calcium suivi par une rupture du tégument du ver adulte entraînant une mort rapide du parasite. Il agit également, à un moindre degré, sur les schistosomules et les oeufs en transit dans les tissus.

De plus, le PZQ semble modifier le profil des antigènes de surface du schistosome, exposant notamment certaines enzymes (la phosphatase alcaline pour *S. mansoni* et la glutathion *S*-transférase de 26 kDa pour *S. japonicum*) qui deviennent alors plus accessibles au système immunitaire (Fallon & Doenhoff, 1994; McTigue *et al.*, 1995).

L'efficacité de ce traitement est cependant associée à de nombreux effets secondaires et, bien que reconnue non tératogène, la prescription du PZQ est à éviter chez la femme enceinte. D'autre part, ce médicament semble diminuer l'immunité acquise à la réinfection (Moloney *et al.*, 1987) et son coût élevé en restreint l'usage en médecine de masse dans les zones d'endémie.

Une nouvelle observation vient également porter une ombre sur l'utilisation du PZQ comme médicament de référence contre les schistosomes; il s'agit de l'apparition d'une population de parasites résistants à cette molécule. En effet, de telles résistances ont été mises en évidence en laboratoire (Fallon & Doenhoff, 1994; Ismail *et al.*, 1994) ainsi que dans certains foyers d'infection naturelle (Sénégal, Egypte) où l'on observe un taux de guérison plus faible (60%) suite au traitement par le PZQ (Fallon *et al.*, 1995). De tels phénomènes de résistance ont également été observés pour l'oxamniquine (Fallon *et al.*, 1996). Une explication possible de cette résistance repose sur l'observation que le système immunitaire de l'hôte joue un rôle fondamental sur l'effet *in vivo* du PZQ sur les parasites (Fallon *et al.*, 1992). En effet, on a vu que le PZQ induit une exposition de plusieurs molécules (essentiellement des glycoprotéines) à la surface du parasite et donc au système immunitaire de l'hôte. La réponse anticorps dirigée contre ces molécules agit alors en synergie avec le PZQ. Ceci pourrait donc expliquer la résistance observée au Sénégal, dans la mesure où les sérums de ces patients se sont révélés être dépourvus de ces anticorps anti-antigènes de surface (Redman *et al.*, 1996).

L'oxamniquine est la deuxième molécule utilisée dans le traitement de la bilharziose. Elle a une action paralysante sur le ver, provoquant ainsi son reflux dans la circulation portale intra-hépatique où les mâles sont détruits. Les femelles semblent survivre mais cessent alors de pondre. Cette molécule, uniquement active sur *S. mansoni*, a l'avantage d'être quatre fois moins chère que le PZQ.

Cependant, quelle que soit l'efficacité d'un traitement chimiothérapeutique, celui-ci ne prévient pas les réinfections chez les jeunes enfants, très fréquentes en zone d'endémie.

Pour ces raisons, la lutte contre la bilharziose s'oriente désormais vers une stratégie visant à l'élaboration d'une prophylaxie médicale basée sur l'utilisation d'un vaccin. Cette approche vaccinale devra probablement être associée avec un traitement préalable au PZQ.

3.3.2. Stratégie vaccinale

Complémentaires de la chimiothérapie, les stratégies vaccinales n'ont pas pour but d'éradiquer la maladie, mais de la limiter. Dans l'infection par les schistosomes, deux caractéristiques sont essentielles et permettent d'envisager la conception d'un vaccin anti-bilharzique:

- Les schistosomes ne se multiplient pas dans les tissus de leur hôte définitif. Une immunité partielle non stérilisante, acquise de façon naturelle ou suite à une vaccination, peut donc avoir un impact considérable sur la charge en vers et donc sur l'incidence de la pathologie et la transmission de la maladie.
- Les oeufs sont les principaux responsables de la pathologie. Ainsi, une immunisation qui réduirait la fécondité des vers femelles ou qui diminuerait la réaction granulomateuse autour des oeufs, accompagnée ou non par une réduction du nombre de vers adultes, entraînerait une diminution de la morbidité des populations touchées, limiterait les formes aiguës de la maladie et contrôlerait sa transmission.

Sur la base de ces concepts, plusieurs stratégies de vaccination ont été établies; on note parmi elles, les infestations par des cercaires atténuées (par irradiation), l'injection avec ou sans adjuvant de préparations d'antigènes bruts obtenues à partir d'oeufs (SEA, Soluble Egg Antigen) ou de vers adultes (SWAP, Soluble Worm Antigen Preparation) voire l'immunisation avec des antigènes purifiés ou recombinants.

Parmi les antigènes recombinants, seuls 6 ont été retenus par l'OMS comme candidats vaccinaux contre l'infection par *S. mansoni* (Bergquist, 1995) (Tableau III).

TABLEAU III: *Antigènes de Schistosoma mansoni à potentiel vaccinal retenus par l'OMS. Caractéristiques et pourcentages de protection observés (d'après Bergquist, 1995).*

Antigène	Taille (kDa)	Stade évolutif	Fonction	Protection (%)			Réf.
				Souris	Rat	Autre	
Paramyosine (Sm97)	97	schistosomule/ver adulte	protéine du muscle	30			Pearce <i>et al.</i> , 1988
IrV-5	62	tous stades	protéine du muscle	50-70	95	25 (babouin)	Amory-Soisson <i>et al.</i> , 1992
Sm23	23	tous stades	antigène membranaire	45-80			Reynolds <i>et al.</i> , 1992
FABP-14 (Sm14)	14	schistosomule	antigène membranaire	65		90-100 (lapin)	Tendler <i>et al.</i> , 1995
TPI	28	tous stades	antigène membranaire	40-50			Shoemaker <i>et al.</i> , 1992b
Glutathion S-Transférase (Sm28GST)	28	schistosomule/ver adulte	enzyme	30-40	40-60	40 (babouin)	Balloul <i>et al.</i> 1987b,c; Boulanger <i>et al.</i> , 1991; Xu <i>et al.</i> , 1993

- **La paramyosine:** Il s'agit d'une protéine de 97kDa isolée à partir des antigènes de vers adultes. L'immunisation de souris à l'aide de la paramyosine recombinante en présence de BCG comme adjuvant, induit une protection de l'ordre de 39% (Pearce *et al.*, 1988).
- **La protéine IrV-5 (irradiation-associated vaccine antigen):** Cette protéine de 62kDa homologue de la myosine, a été isolée à partir d'antigènes de surface de schistosomules à l'aide de sérums provenant de souris vaccinées à l'aide de cercaires irradiées. Un taux élevé de protection (60 à 80%) est obtenu chez la souris après trois injections intra-péritonéales ou sous-cutanées de la protéine recombinante (Amory-Soisson *et al.*, 1992), mais les résultats obtenus chez le babouin sont beaucoup plus variables.
- **La Sm23:** La structure proposée de cet homologue d'une super-famille de protéines membranaires de 23kDa suggère la présence de 4 domaines transmembranaires et de 2 domaines extracellulaires hydrophiles (Reynolds *et al.*,

1992). La Sm23 est un antigène protecteur puisque des expériences d'immunisation à l'aide d'un peptide synthétique contenant les épitopes de cellules B et T confèrent 45 à 80% de protection en termes de réduction du nombre de vers chez la souris.

- **La Sm14 ou FABP-14 (Fatty Acid Binding Protein):** Cet antigène membranaire (Moser *et al.*, 1991), présent au stade schistosomule, protège la souris à 65% et le lapin à 95%. La Sm14 de *S. mansoni* présente de fortes homologies avec la protéine Fh12 de *Fasciola hepatica*, parasite responsable d'atteintes hépatiques. Ainsi, l'immunisation de souris avec la protéine Fh12 protège contre l'infection par *S. mansoni* (Tendler *et al.*, 1995). De telles réactions croisées permettent d'envisager une vaccination contre plusieurs parasites co-endémiques.
- **La Triose Phosphate Isomérase (TPI):** Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme du glucose. Elle a été identifiée à l'aide d'un anticorps monoclonal qui reconnaissait un antigène de 28 kDa à tous les stades du développement parasitaire (Harn, 1985). Cette protéine a été clonée et la TPI recombinante exprime l'activité enzymatique. Chez la souris, les taux de protection varient de 30 à 60% (Shoemaker *et al.*, 1992b)
- **La Sm28GST:** Le candidat vaccinal le mieux caractérisé, et avec lequel les études d'immunisation et de protection ont été les plus poussées, est une glutathion S-transférase de 28 kDa de *S. mansoni* (Capron *et al.*, 1995a).

La Sm28GST recombinante induit une immunité protectrice chez le modèle rat et hamster (Balloul *et al.*, 1987a; Grezel *et al.*, 1993), chez le babouin (Balloul *et al.*, 1987b; Boulanger *et al.*, 1991) et chez la souris (Boulanger *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1993). Les taux de protection conférés contre l'infection varient de 50-70% chez le rat à 30-45% chez la souris et 38% chez le babouin. Ces expériences d'immunisation chez les babouins et les souris à l'aide de la Sm28GST recombinante ont mis en évidence un effet protecteur différent, qui n'avait jusque-là encore jamais été observé: il s'agit d'une réduction de la fécondité des vers femelles qui se traduit par une diminution des oeufs excrétés chez les animaux immunisés, et une réduction de la charge tissulaire en oeufs (Boulanger *et al.*, 1991). Il a été démontré à l'aide d'anticorps monoclonaux que cet effet était associé à l'activité enzymatique de la Sm28GST (Xu *et al.*, 1991). Or cette activité s'est révélée être portée en partie par les domaines N- et C-terminaux de la protéine (Trottein *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1993). Ainsi, l'utilisation du peptide C-terminal (peptide 190-211), conjugué à

l'ovalbumine, induit la production d'anticorps capables d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST, entraîne une réduction partielle du nombre de vers suite à une infection expérimentale, et surtout, se traduit par une réduction marquée de la charge en oeufs dans les tissus et de leur viabilité. La relevance de ces observations lors d'une infection humaine est suggérée par la capacité des IgA sériques d'individus infectés à inhiber la fécondité des couples de vers adultes maintenus en culture (Grzych *et al.*, 1993).

La réponse cellulaire T contre la Sm28GST joue un rôle important de par son implication dans la réduction du nombre d'oeufs dans le foie et dans la diminution de la pathologie hépatique (mesurée par le taux de collagène contenu dans le foie des souris infectées). Dans ce modèle, les souris immunisées avec une seule dose de rSm28GST développent des réponses CD4+ Th1 et CD8+ spécifiques de l'antigène, et les effets protecteurs peuvent être complètement abolis par l'administration d'anticorps anti-IFN γ (Pancré *et al.*, 1994). Cette cytokine semble donc être impliquée dans l'immunité protectrice obtenue après immunisation avec la rSm28GST.

Bien que nécessairement associée aux autres aspects évoqués dans ce paragraphe, la stratégie vaccinale semble donc être la méthode la plus prometteuse dans une optique de lutte contre la bilharziose. Les avancées réalisées dans ce domaine depuis presque 20 ans sont dues notamment aux nombreux travaux ayant permis d'approfondir la réponse immune de l'hôte suite à une infection par *S. mansoni*.

4. Réponse immune développée au cours d'une infection à *S. mansoni*.

Dans le but de l'élaboration d'une stratégie vaccinale, mais également dans celui de mieux comprendre les effets d'une infection à *S. mansoni* sur l'hôte, la réponse immune développée par l'hôte a fait l'objet de nombreux travaux. Cette réponse a été particulièrement étudiée dans deux modèles animaux couramment utilisés en laboratoire: le rat, hôte semi-permissif pour *S. mansoni*, et la souris, hôte permissif. Quant aux travaux réalisés chez l'homme, ils consistent en des analyses épidémiologiques menées sur des populations vivant en régions endémiques.

4.1. La réponse anticorps et les phénomènes d'ADCC: les mécanismes effecteurs chez le rat et chez l'homme

L'une des approches entreprises pour déterminer les mécanismes immunitaires développés par l'hôte suite à une infection par *S. mansoni* est basée sur des études réalisées chez le rat.

Le rat est un hôte semi-permissif pour *S. mansoni*, ce qui en fait un modèle d'étude intéressant. En effet, le parasite n'effectue pas son cycle dans sa totalité: les vers n'atteignant pas leur maturité, ils ne pondent pas d'oeufs et ils sont expulsés entre 3 et 4 semaines après l'infestation. Le rat devient alors fortement résistant à la réinfection, et des études ont permis de montrer que l'immunité à la réinfection est principalement basée sur des phénomènes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC pour Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity), qui font intervenir des cellules pro-inflammatoires non lymphoïdes telles que les macrophages (Capron *et al.*, 1975), les éosinophiles (Capron *et al.*, 1981), et les plaquettes (Joseph *et al.*, 1983), et des anticorps anaphylactiques (IgG2a et IgE) (Grzych *et al.*, 1982; Verwaerde *et al.*, 1987). La relevance de ces mécanismes a été confirmée *in vivo* par la protection obtenue après transfert passif des anticorps monoclonaux IgG2a et IgE. Ces interactions nécessitent l'expression de récepteurs cellulaires Fc pour les anticorps et la présence d'isotypes particuliers d'anticorps. Cependant, il a été démontré l'existence de

sous-classes d'anticorps capables de bloquer l'immunité protectrice précédemment décrite. Ainsi, un anticorps monoclonal d'isotype IgG2c, de même spécificité que celui d'isotype IgG2a est capable d'inhiber la cytotoxicité observée *in vitro* ainsi que l'immunité protectrice obtenue par transfert passif (Grzych *et al.*, 1984).

Ces travaux réalisés chez le rat ont trouvé toute leur dimension, lorsque, sur la base d'études épidémiologiques effectuées en régions endémiques, le même type de mécanismes immunitaires ont été mis en évidence chez l'homme.

Ainsi, des phénomènes d'ADCC mettant en jeu des IgG et des éosinophiles, ont été décrits chez l'homme (Butterworth *et al.*, 1975a, 1975b; Khalife *et al.*, 1989). Et récemment, le récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI) a été décrit sur les éosinophiles (Soussi-Gouni *et al.*, 1995). De même, plusieurs études immuno-épidémiologiques ont permis de montrer non seulement le rôle des anticorps IgE dans l'acquisition progressive d'une immunité protectrice, mais également l'existence d'anticorps bloquants. Ainsi des premières études réalisées au Kenya ont montré la présence d'anticorps IgM capables de bloquer la cytotoxicité dépendante des éosinophiles médiée par les IgG. De plus, une corrélation positive entre l'intensité de réinfection et le taux d'IgM et IgG2 spécifiques d'épitopes carbohydrates présents dans les antigènes d'oeufs a été observée (Khalife *et al.*, 1986; Butterworth *et al.*, 1987; Dunne *et al.*, 1988). De tels anticorps bloquants pouvant intervenir dans la susceptibilité ont été également décrits par d'autres équipes, aussi bien lors d'infections à *S. haematobium* (Hagan *et al.*, 1991) qu'à *S. mansoni* (Rihet *et al.*, 1992; Demeure *et al.*, 1993). Ces études ont mis en évidence le rôle bloquant d'anticorps d'un autre isotype: les IgG4.

Concernant les composantes, non plus de la susceptibilité observée chez les jeunes enfants, mais de la réponse immune protectrice, des études réalisées en Gambie par Hagan *et al.* (1991) ont suggéré le rôle important des IgE. En effet, une corrélation négative a été observée entre l'intensité de réinfection par *S. haematobium*, et des taux élevés d'IgE spécifiques, indiquant donc l'implication de ces anticorps dans la protection. Deux études épidémiologiques s'appliquant à une infection par *S. mansoni* chez des populations kenyanes (Dunne *et al.*, 1992) et brésiliennes (Rihet *et al.*, 1991; Demeure *et al.*, 1993), sont venues soutenir ces observations: elles montrent, en effet, que la résistance à la réinfection dépend du rapport entre le taux d'IgE spécifiques des antigènes du parasite, protecteurs, et celui d'IgG4 bloquants.

Dans le cas d'infections à *S. mansoni*, les anticorps IgA ont également été associés à la résistance. Aussi, bien que la réponse IgA sérique contre les antigènes totaux soit seulement associée de manière non significative à l'acquisition âge-dépendante d'une immunité (Dunne *et al.*, 1992), la réponse IgA contre la glutathion S-transférase de 28 kDa (Sm28GST) augmente significativement avec l'âge des individus. Ces anticorps sont par ailleurs capables d'inhiber l'activité enzymatique de la protéine, réduisant la fécondité des vers femelles et la viabilité des oeufs produits (Grzych *et al.*, 1993).

Ainsi, l'immunité humorale protectrice chez l'homme ne peut être véritablement associée à un type d'anticorps précis, mais plutôt à un rapport entre certains anticorps, les uns protecteurs, les autres bloquants.

La réponse cellulaire T impliquée dans la résistance à une infection humaine à *S. mansoni* a également été étudiée, et il semble que cette réponse soit plutôt de type Th2 (selon les profils caractéristiques décrits par Mosmann & Coffman (1989)). Ceci est en accord avec les observations précédentes concernant la réponse humorale, dans la mesure où une production d'IgE et une éosinophilie sont directement contrôlées respectivement par l'IL-4 (Finkelman *et al.*, 1986) et l'IL-5 (Coffman *et al.*, 1989). Ainsi, Couissinier-Paris & Dessein (1995) ont pu mettre en évidence que des clones CD4⁺ de cellules T spécifiques du parasite dérivés de PBMC d'un sujet vivant en région endémique, mais résistant à l'infection, sécrétaient de l'IL-4 et de l'IFN- γ avec une prédominance d'IL-4. De plus, deux études ont montré une association entre de faibles taux d'infection (DeJesus *et al.*, 1993) ou de réinfection (Roberts *et al.*, 1993) et une prolifération lymphocytaire T vis-à-vis d'antigènes d'oeufs et de vers adultes. Une faible production d'IFN- γ a été observée alors que la production d'IL-5 est significative. Dans l'une de ces études (Roberts *et al.*, 1993), il a de plus été rapporté une corrélation âge-dépendante significative entre cette production d'IL-5 en réponse à une stimulation par les antigènes d'oeufs, et de faibles taux de réinfection.

Un autre aspect de l'immunité décrite dans les populations humaines est apporté par les travaux de Abel *et al.* (1991) montrant la présence d'un gène codominant contrôlant la susceptibilité à l'infection par *S. mansoni*.

4.2.L'immunité protectrice chez la souris

La souris est un hôte permissif pour *S. mansoni*, le parasite y effectue son cycle entier ce qui se traduit par la ponte des oeufs et la formation des granulomes. L'utilisation de cet animal de laboratoire est donc propice aux protocoles de protection, et à l'étude de la réponse granulomateuse.

En 1986, Mangold & Dean (1986) ont observé une protection chez la souris, après un transfert passif de sérums provenant de souris fortement résistantes suite à plusieurs injections de cercaires irradiées. Cette protection s'est révélée dépendante des IgG contenues dans les sérums. D'autre part, la réponse IgA sérique spécifique des antigènes de schistosome (stade ver adulte, furcocercaire ou oeuf) ainsi que la production d'IgA au niveau des muqueuses intestinales augmentent après la ponte des oeufs (Poulain-Godefroy *et al.*, 1996); néanmoins il est difficile d'évaluer l'effet de ces IgA sur l'évolution de l'infection par le parasite.

Il semble cependant que l'immunité protectrice chez la souris fait essentiellement appel à des mécanismes cellulaires indépendants d'anticorps. En effet, l'étude de la réponse cellulaire T au cours d'une infection expérimentale a permis d'associer une protection à une réponse de type Th1, la pathologie causée principalement par le dépôt des oeufs étant, quant à elle, augmentée par une réponse Th2. Ainsi, on observe durant la phase précoce de l'infection une réponse Th1 qui laisse place à un profil de cytokines de type Th2 induit par les oeufs. Cette relation causale entre les oeufs de schistosomes et la réponse Th2 est suggérée par l'apparition simultanée d'IL-4 et d'IL-5 produites par des cellules Th2 lorsque les vers commencent à pondre (Pearce *et al.*, 1991), contrairement aux résultats observés lors d'une infection expérimentale monosexuée de *S. mansoni* au cours de laquelle il n'y a évidemment pas de production d'oeufs (Grzych *et al.*, 1991).

L'exposition de souris à des cercaires irradiées a permis d'approfondir les connaissances sur les mécanismes immunitaires développés chez la souris. Dans ce modèle, l'immunité est associée à la production d'IFN- γ produit par des lymphocytes T CD4+ de type Th1, générés au niveau de la peau puis recrutés au niveau des poumons. Le phénomène d'attrition observé lors d'une infection suite à ce protocole d'immunisation pourrait être dû à la sécrétion de cytokines par ces cellules Th1 qui, induisant la formation d'agrégats cellulaires autour des parasites dans les poumons, bloquerait leur migration (Smythies *et al.*,

1992). Malgré la forte inflammation locale qui parfois détruit le système vasculaire, il n'y a pas d'évidence quant à de potentiels effets cytotoxiques sur les parasites eux-mêmes (Crabtree & Wilson, 1986).

Parallèlement aux mécanismes effecteurs mis en place par l'hôte pour éliminer les organismes pathogènes, ceux-ci élaborent des stratégies de défense qui leur permettent de se maintenir en place.

4.3.Stratégies d'échappement à la réponse immune développées par le parasite

Dans le cas des parasites en général, et des schistosomes en particulier, les stratégies d'échappement ou de détournement de la réponse immune de l'hôte sont particulièrement élaborées, et font appel à des composantes très variées.

L'un des premiers aspects de la régulation de la réponse immune par le parasite, est l'existence d'anticorps bloquants, dont la production est induite par le parasite chez le rat. Ces anticorps sont en effet capables d'inhiber la formation des complexes cellules effectrices / anticorps / schistosomule (cf. §4.1).

Afin de se protéger contre la réponse immune de l'hôte à laquelle il est constamment exposé, le parasite a développé d'autres mécanismes de contrôle. Il s'agit de mécanismes de mimétisme moléculaire ou de "détournement" des composantes de la réponse de l'hôte. Ainsi, le schistosomule va rapidement acquérir des antigènes de l'hôte. Le phénomène de mimétisme moléculaire peut se faire par acquisition passive de protéines telles que celles du CMH ou de groupes sanguins. Les schistosomes sont alors capables d'échapper à la détection du système immunitaire et deviennent donc résistants à ses effecteurs (Damian, 1987). Le mimétisme moléculaire peut se traduire également par l'expression de structures antigéniques analogues à celles de l'hôte (Capron, 1995b). Chez *S. mansoni*, l'augmentation de la production des oeufs par les vers femelles, suite à l'injection de $TNF\alpha$, chez les souris SCID (où cette production est généralement très faible) semble indiquer que le parasite est capable non seulement d'exprimer des protéines possédant des homologues avec les récepteurs présents chez l'hôte, mais aussi de détourner la réponse de l'hôte à son avantage (Amiri *et al.*, 1992).

Le schistosome est également capable de fixer ou d'exprimer certains facteurs tels que le SCIP-1 (pour "schistosome complement inhibitor"), ou des protéases (m28) (Marikovsky *et al.*, 1988b) qui altèrent l'efficacité des réactions de défense non-spécifique médiées par les voies du complément (Fishelson, 1995). L'expression de serpins (pour "serine protease inhibitor") permet également au parasite de neutraliser certains composants de la réaction inflammatoire, tels que l'élastase produite par les neutrophiles qui est inactivée par la protéine parasitaire Smp156 (Ghendler *et al.*, 1994).

La composante cellulaire est également une cible pour le parasite. Ainsi, un produit métabolique des vers adultes, le SDIF (pour "schistosome-derived inhibitory factor"), possède la propriété d'inhiber fortement, et de façon sélective, la prolifération lymphocytaire T *in vitro* et *in vivo* (Dessaint *et al.*, 1977; Mazingue *et al.*, 1987). De plus, les schistosomes produisent à tous les stades de leur développement des quantités significatives de dérivés du précurseur POMC (ProOpioMelanoCortine), conduisant à une immunosuppression des immunocytes de l'hôte intermédiaire ainsi que des monocytes de l'hôte définitif (Duvaux-Miret *et al.*, 1992).

Les protéases du parasite peuvent également dégrader les IgG fixées sur les schistosomules, donnant naissance à un des peptides possédant des fonctions immunomodulatrices *in vitro* sur les macrophages (Auriault *et al.*, 1981a). Ainsi, ces peptides ont notamment la propriété de diminuer fortement le relargage d'enzymes lysosomales mais n'affecte pas la production d'IL-1. De plus, la cytotoxicité macrophage dépendante est également diminuée en présence de ces peptides, dont la composante essentielle est un tri-peptide (TKP) (Auriault *et al.*, 1983a). Cependant, les protéases de *S. mansoni* ont également été impliquées dans une augmentation de la réponse IgE non spécifique chez le rat (Verwaerde *et al.*, 1986).

Au cours de ce chapitre, nous avons donc présenté les caractéristiques de la schistosomiase et les différents moyens de la contrôler. Dans plusieurs des thèmes traités on peut noter le rôle des protéases du schistosome. En effet, ces molécules jouent un rôle fondamental dans le cycle du parasite : elles sont notamment sécrétées afin d'assurer sa migration au sein de son hôte définitif, ce qui en fait des cibles potentielles pour le système immunitaire. Elle permettent également au parasite de se nourrir. Outre ces activités protéolytiques, chez *S. mansoni*, les protéases sont impliquées dans des phénomènes d'échappement à la réponse immune par le parasite. Aussi, nous nous sommes particulièrement attachés à l'étude de ces molécules, dont beaucoup ont été caractérisées au cours du cycle du parasite. Le second chapitre concernera donc les protéases et plus précisément celles de *S. mansoni*, ainsi que leurs rôles. Auparavant, nous introduirons quelques généralités sur ces enzymes.

Les Protéases

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Ces enzymes sont très largement répandues à travers les règnes végétaux et animaux. Elles peuvent avoir des rôles très variés, selon qu'elles sont retrouvées chez les plantes, les organismes pathogènes ou chez les mammifères.

Chez ces derniers, l'action des protéases au niveau physiologique est constamment régulée par des inhibiteurs "naturels". En dehors des fonctions physiologiques de base, telles que la digestion, les protéases sont également des composantes de la réponse immune. Chez les organismes pathogènes, les protéases sont très souvent impliquées dans l'invasion et la migration, et représentent parfois des facteurs de virulence. Ainsi l'action des protéases est souvent liée à une balance entre un aspect bénéfique ou non pour l'organisme considéré. C'est notamment le cas des bactéries chez qui les protéases sont impliquées dans la virulence; en même temps, les protéases de l'hôte vont contribuer à l'élimination de la bactérie par l'intermédiaire des cellules effectrices, composantes de la réponse immunitaire.

Chez les parasites, les protéases jouent des rôles très importants, car elles sont impliquées aussi bien dans l'invasion et la migration du parasite chez son hôte, mais également, il a été montré chez ces pathogènes que les protéases pouvaient participer à des phénomènes d'échappement à la réponse immune de l'hôte, ainsi que de modulation de cette réponse. Ce phénomène a été essentiellement décrit chez le parasite *Schistosoma mansoni*, chez qui de nombreuses protéases ont été caractérisées.

1. Définition et classification des protéases

1.1. Histoire et définition

L'histoire de l'étude des protéases débute dans les années 1890 en Allemagne, lorsque des chercheurs étudiant la composition chimique de tissus (foie, muscle) ont observé des variations de composition après conservation ou incubation des tissus à 37°C, ces variations étant indépendantes de l'action de bactéries (Salkowski, 1890). L'hypothèse émise alors, qu'une activité enzymatique pouvait être responsable de ces variations a été confirmée quelques années plus tard (Schweining, 1894; Biondi, 1896). Depuis, les travaux concernant les protéases ont été très nombreux et justifiés par l'importance qu'ont les protéases dans des domaines extrêmement variés; sont apparus alors progressivement les termes de "autolyse", "cathepsine" ("digérer" en grec), "trypsine"... Très rapidement une nomenclature a été nécessaire et actuellement, la classification repose essentiellement sur les différences de mode d'action des protéases.

On regroupe sous le terme "protéase" à la fois les **exoprotéases** et les **endoprotéases**. Les exoprotéases (ou "peptidases") sont nommées ainsi en rapport à leur capacité de clivage d'un ou deux acides aminés en fin de chaîne polypeptidique. Les endoprotéases (ou "protéinases") sont, quant à elles, définies par leur action de clivage au sein d'une chaîne polypeptidique (Barret, 1977). Ces deux classes de protéases ont, en fait, des actions synergiques et complémentaires dans les systèmes protéolytiques physiologiques. Cette classification exo/endoprotéases peut paraître un peu trop réductrice dans la mesure où de nombreux cas d'activité exoprotéasique ont été montrés chez des endoprotéases. Inversement, de façon moins nette, il semble également que certaines exoprotéases soient douées d'activité endoprotéasique, dans le cas de substrats polypeptidiques de faible poids moléculaires (Barret, 1977).

Malgré ces restrictions, cette classification présente l'avantage d'être très claire et utile.

1.2. Les *exo-* et *endoprotéases*

1.2.1. Les *exoprotéases*

Les *exoprotéases* ou *peptidases* peuvent être séparées facilement en deux sous-familles, selon qu'elles catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques situées côté N- ou C-terminal. Parfois, ces enzymes sont nommées selon l'acide aminé qu'elles clivent ("leucine aminopeptidase"). Elles sont spécifiques d'un seul ou, occasionnellement, de deux acide(s) aminé(s) (dans ce cas elles sont appelées "dipeptidyl peptidases"). Les *peptidases* jouent notamment un rôle dans la digestion de fragments peptidiques préalablement coupés par des *endoprotéases*. De plus, les *peptidases* interviennent dans le "processing" et l'activation de nombreuses protéines telles que les prohormones ou les proenzymes (zymogènes).

1.2.2. Les *endoprotéases*

Les *endoprotéases* ou *protéinases* sont couramment divisées en 4 sous-familles caractérisées par les acides aminés participant à leurs sites catalytiques respectifs. De cette façon, on définit les "métallo", "thiol" (ou "cystéine"), "carboxy" (ou "aspartyl") et "sérine" *protéases*. La famille des **métalloprotéases** est nommée ainsi en référence au cation divalent présent au niveau du site actif, dont la fonction est la liaison au substrat. Cette famille inclue les collagénases de vertébrés, les carboxy et amino peptidases et les élastases de macrophage et de *Pseudomonas*. Les **thiol ou cystéine protéases** possèdent, quant à elles, une cystéine en chaîne latérale impliquée dans la liaison au substrat. C'est une famille de taille importante; elle inclut notamment des enzymes de plantes telles que la papaïne, et également des cathepsines lysosomales, agissant à des pH allant de 5,5 à 7,5. La nomenclature des **aspartyl ou carboxy protéases** provient des deux acides aspartiques présents au niveau du site actif. C'est un groupe d'enzymes relativement restreint, incluant par exemple les pepsines et les protéases de certains virus et notamment du VIH. Leur pH optimum est situé entre 2,5 et 4,5. La dernière famille, la plus importante, correspond aux **sérine protéases** et fait l'objet du paragraphe suivant.

D'un point de vue nomenclature, du fait de la non spécificité (ou encore de la spécificité non restrictive) de substrat observée chez les *endoprotéases*, il est parfois plus simple de considérer la sensibilité de ces enzymes aux inhibiteurs synthétiques. Cependant,

dans quelques cas, il existe une relative spécificité de substrat: la très grande résistance à la protéolyse de l'élastine ou de la fraction hélicale du collagène justifie les termes élastase ou collagénase. Néanmoins, une fois encore, les élastases ne dégradent pas uniquement l'élastine, et peuvent appartenir aux quatre sous-familles d'endoprotéases: par exemple, l'élastase de neutrophiles est une sérine protéase et l'élastase de macrophages est une métalloprotéase.

Dans la mesure où l'objet de notre étude concernera une élastase de la famille des sérine protéases, nous détaillerons plus particulièrement certaines caractéristiques de ces enzymes dans les paragraphes suivants.

1.3. Les sérine protéases

Les sérine protéases sont une classe d'endoprotéases caractérisées par la présence d'une sérine en chaîne latérale participant au site catalytique, et indispensable à la liaison au substrat. Cependant, il a été montré que le site actif des sérine protéases était composé, non seulement de cette sérine, mais également de deux autres acides aminés, un acide aspartique et une histidine. Le rapprochement tri-dimensionnel de ces trois acides aminés (H, S, D), par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, contribue à la formation d'une "poche" catalytique (Kraut, 1977). Ceci a été confirmé pour l'acide aspartique du site catalytique de la trypsine par une stratégie de remplacement de cet acide aminé par une lysine (Graf *et al.*, 1987).

Les sérine protéases sont très largement répandues, elles constituent la classe d'endoprotéases la plus importante, et possèdent des fonctions très variées. Ainsi, parmi les sérine protéases figurent des enzymes telles que la plupart des facteurs de coagulation, les enzymes digestives comme les trypsines et chymotrypsines et des produits de sécrétion de cellules inflammatoires comme l'élastase de neutrophiles et les protéases des lymphocytes T cytotoxiques. Les sérine protéases sont parfois divisées en sous familles, telles que la sous-famille des trypsines, regroupant plusieurs enzymes homologues du point de vue de leur séquence, et très proches en termes de structure tri-dimensionnelle.

De nombreuses études cinétiques ont permis de déterminer la séquence de réactions qui se produisent lorsque les sérine protéases catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques. La figure 3 illustre schématiquement cette séquence de réactions. On peut noter que ces réactions correspondent à un équilibre entre une étape d'acylation (voie supérieure) et

l'inverse exacte, correspondant à une étape de déacylation (voie inférieure). Ces deux voies seraient parfaitement symétriques si on avait $X=Y=OH$, cependant, en général HX représente une amine ou un alcool et HY de l'eau. Ainsi, la réaction catalysée par les sérine protéases correspond le plus souvent à un transfert ou un échange de groupement acyl.

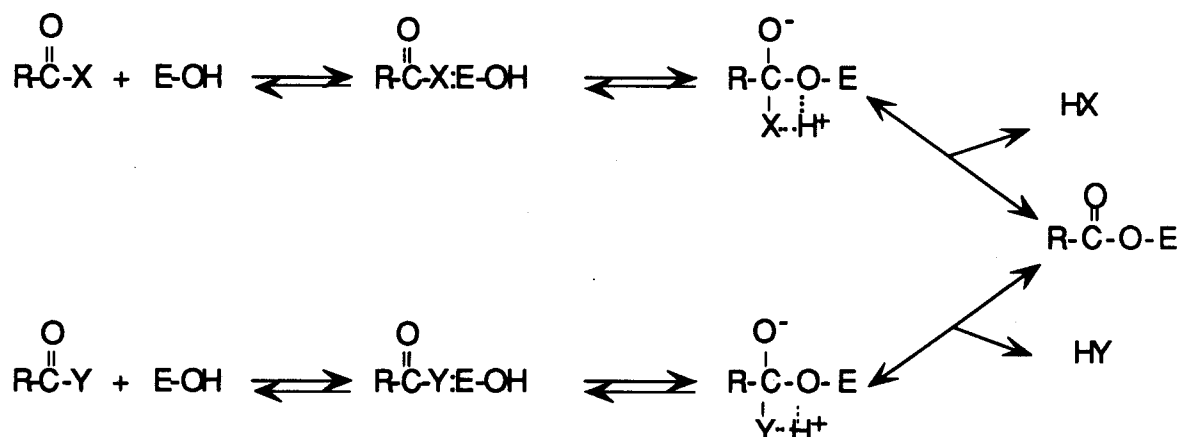


Figure 3: Réactions en chaîne catalysées par les sérine protéases (d'après Kraut, 1977).

1.4. Les élastases

Les élastases sont caractérisées par leur capacité à dégrader les fibres d'élastine matures. Elles ont été décrites chez les micro-organismes, dans les venins de serpents et dans de nombreuses cellules et tissus de mammifères, tels que le pancréas, les leucocytes et les macrophages. Les élastases peuvent appartenir aux quatre sous-familles d'endoprotéases et ont des spécificités de substrat diverses, l'élastine mise à part. Les inhibiteurs "naturels" principaux contribuant à la régulation de l'action des élastases sont l' $\alpha 2$ -macroglobuline et l' $\alpha 1$ -protéinase inhibiteur (Werb *et al.*, 1982).

L'élastine: l'élastine est un composant du tissu connectif de nombreux tissus et organes. L'élastine est non seulement le constituant majeur de la paroi des vaisseaux sanguins, mais elle procure également l'élasticité aux poumons, aux cartilages et à la peau. Le précurseur de l'élastine (monomère tropoélastine) est très susceptible à la dégradation par de nombreuses protéinases; cependant, le taux de renouvellement des fibres d'élastine matures chez les mammifères adultes est très lent et la demi-vie de l'élastine se mesure en décades notamment

dans les poumons d'individus sains. La dégradation de l'élastine peut apparaître dans des circonstances physiologiques telles que la croissance, des blessures, le remodelage de tissus ou la grossesse. Le taux de dégradation et de fragmentation de l'élastine est accéléré dans de nombreuses conditions cliniques, et les agents détruisant l'élastine (les élastases) vont nécessairement jouer un rôle important dans des maladies chroniques telles que l'emphysème pulmonaire, l'athérosclérose et l'arthrite. L'élastine est riche en résidus Ala, Gly, Val et, dans une moindre mesure, Leu; ces résidus sont donc souvent la cible des élastases. Cependant, toutes les élastases ne sont pas spécifiques des mêmes sites de clivage au sein de l'élastine.

Les protéinases qui peuvent utiliser l'élastine comme substrat sont d'origine procaryote ou eucaryote; dans la suite de ce paragraphe, nous présentons quelques unes d'entre-elles, leurs rôles seront plus particulièrement développés par la suite.

Les élastases microbiennes: dans les années 1900, les premières élastases ont été décrites chez des bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Bacillus anthracis*) (Oakley *et al.*, 1963). Depuis, l'activité de ces élastases a souvent été reliée à la virulence des bactéries.

Des élastases ont également été décrites chez les champignons (*Actinomyces*, *Dermatophytes*) et les parasites (*Schistosoma*, *Leishmania*...), chez qui les élastases sont notamment impliqués dans l'invasion de l'hôte.

Les élastases dans les venins de serpent: l'activité protéolytique associée à la pathogénèse des venins de serpents a été décrite depuis plus d'un siècle, mais il a fallu attendre 1976 pour que, parmi les protéases impliquées dans cette activité, des élastases soient caractérisées (Bernick & Simpson, 1976). Cependant, tous les serpents ne possèdent pas une élastase dans leur venin, et il semble que la présence de cette activité protéasique soit reliée avec la morsure du serpent, car elle n'est pas inhibée par l'administration d'anti-venins (Tu, 1977).

Les élastases de mammifères: ce sont chez les mammifères que les élastases ont été le plus largement décrites. En effet, deux élastases (type I et type II) sont présentes au niveau du pancréas (parmi 15 enzymes protéolytiques caractérisées) et participent activement à la digestion intestinale. Il s'agit de sérine protéases différenciées essentiellement par leurs masses moléculaires et leur spécificité de clivage au sein de l'élastine (type I: Ala-, type II: Val-). De plus, deux autres élastases ont été identifiées dans les neutrophiles (Janoff &

Scherer, 1968) et les macrophages (Banda & Werb, 1981), cellules effectrices composantes de la réponse immunitaire. L'élastase de neutrophiles est une sérine protéase basique, glycosylée à hauteur de 23%, localisée dans les granules (Starkey, 1977) et coupant préférentiellement les résidus Val-. L'élastase de macrophages est, quant à elle, une métalloprotéase, sécrétée sous forme inactive, comme beaucoup d'autres protéines tissulaires. Du fait de cette différence d'appartenance aux sous-familles d'endoprotéases, l'élastase de macrophages ne coupe pas les mêmes résidus (Leu-). En outre, l'élastase de macrophages se distingue des autres élastases de mammifères non seulement par sa résistance à l' α 1-protéinase inhibiteur, mais également par sa capacité à dégrader et inactiver cet inhibiteur.

Chez les mammifères, il existe également des cas où une dégradation d'élastine a été observée, sans qu'une production d'élastase n'ait été démontrée. Par exemple, durant son implantation, l'embryon traverse l'épithélium utérin et s'ancre dans les tissus de l'utérus. Les trophoblastes (cellules entourant l'oeuf) participent à cet ancrage, par l'intermédiaire de la dégradation de collagène, d'élastine et de plusieurs glycoprotéines (Werb *et al.*, 1980).

2. Rôles des protéases

Les protéases sont des enzymes possédant des fonctions nombreuses et variées. Ce paragraphe ne se veut pas exhaustif en ce qui concerne les rôles des protéases, mais plutôt illustratif de l'importance de ces molécules dans divers processus, regroupés en trois parties: fonctions physiologiques, phénomènes d'invasion, migration et virulence des microorganismes, et implication dans les réponses immunes et inflammatoires. Une dernière partie concernera plus précisément les rôles des protéases chez les parasites.

2.1. Fonctions physiologiques

2.1.1. Processus physiologiques impliquant des protéases

Chez les mammifères, les protéases sont indispensables dans de nombreux processus physiologiques tels que la digestion intestinale, la dégradation et le renouvellement de la matrice extracellulaire ou encore la formation de caillots par l'intermédiaire de la cascade de coagulation. Dans ces processus, l'activité protéolytique des protéases est indispensable et peut intervenir de deux façons: soit cette activité est responsable directement d'une dégradation de tissus, soit elle permet l'activation d'autres protéines par clivage de peptides d'activation; c'est notamment le cas des hormones, synthétisées sous forme de prohormones. C'est également le cas des protéases elles-mêmes, et l'activation successive de ces molécules est à la base de la régulation de cascades physiologiques telles que celle de la coagulation.

La cascade de coagulation: il s'agit d'une chaîne de réactions aboutissant à la formation de fibrine polymérisée insoluble constituant un caillot. Cette chaîne peut se décomposer en deux voies: la voie extrinsèque qui est initiée par la présence d'une blessure, et la voie intrinsèque qui sera activée par des facteurs issus de la voie extrinsèque. Le déroulement de ces deux voies correspond à l'activation successive de plusieurs facteurs qui sont, pour nombre d'entre-eux des sérine protéases. Celles-ci vont, par l'intermédiaire de leur activité protéolytique, activer le facteur suivant. Ainsi la thrombine, facteur intervenant en fin de chaîne puisque son action principale est la conversion du fibrinogène en fibrine par protéolyse, est également une sérine protéase (Davie *et al.*, 1991).

La digestion intestinale: chez les mammifères, le pancréas exocrine synthétise, stocke et sécrète environ 15 enzymes et proenzymes pour la digestion intestinale. Ces protéines sécrétées représentent plus de 80% des protéines synthétisées par cette glande. Une fraction majoritaire des sécrétions pancréatiques consiste en la famille d'au moins 7 sérine protéases: les chymotrypsines A et B, deux trypsines, les élastases 1 et 2, et la kallikréine. En tant que protéines sécrétées, ces sérine protéases sont synthétisées initialement sous la forme de préproenzymes nécessitant un clivage enzymatique sélectif d'un peptide d'activation en position amino-terminale afin d'obtenir l'enzyme sous sa forme active (McDonald *et al.*, 1982).

La dégradation de la matrice extracellulaire: (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Cawston *et al.*, 1995) cette dégradation métabolique est assurée par plusieurs protéases dont 14 métalloprotéases (MMP pour "Matrix MétalloProteinase"), le plasminogène, l'élastase et la cathepsine G des neutrophiles ainsi que d'autres cathepsines. Les MMP sont une famille de protéases qui interviennent activement dans le remodelage de la matrice extracellulaire nécessaire notamment au cours de la croissance chez les mammifères. Ainsi, leur rôle a été évoqué dans de nombreux processus tels que l'ovulation, le développement et la différenciation de l'embryon, l'invasion par les trophoblastes, la parturition, le développement et le remodelage du squelette et le développement d'organes tels que les glandes salivaires, les germes dentaires et les ovaires. La démonstration de l'implication des MMP dans tous ces processus est basée non seulement sur l'identification des protéines ou de leurs inhibiteurs, mais aussi sur l'étude de l'expression de leurs transcrits à certains stades de développement.

Rôles physiologiques chez les microorganismes: chez les microorganismes, les protéases peuvent également jouer des rôles physiologiques; elles sont en effet largement impliquées dans la nutrition des bactéries. Ainsi beaucoup de bactéries saprophytes telles que *Pseudomonas*, *Serratia* et *Bacillus*, produisent des protéases possédant une très large spécificité de substrat afin de subvenir à leurs besoins nutritionnels. Si la production de ces protéases est limitée, la croissance des bactéries sur des milieux ne comportant que des polypeptides de grande taille ou même de protéines, est très ralentie (Travis *et al.*, 1995).

De même, de nombreuses hémoglobinasés ou cathepsines indispensables à la nutrition et à la survie des parasites ont été décrites (McKerrow, 1989).

2.1.2. Régulation et dérégulation des fonctions physiologiques des protéases

Régulation: un premier mécanisme de régulation *in vivo* de l'action des protéases repose sur le mode d'expression de ces enzymes. En effet, elles sont souvent produites sous forme de proenzymes; leur activation dépend alors du clivage du peptide d'activation. Ce clivage se produit sous l'action d'une protéase exogène, une action autolytique supplémentaire, nécessaire à l'activation ayant été également décrite (Nagase *et al.*, 1990).

Néanmoins, la régulation naturelle de l'action des protéases est essentiellement assurée par des inhibiteurs. Ceux-ci ne sont en général pas spécifiques d'une protéase en particulier. Cependant, les inhibiteurs peuvent être regroupés en familles parmi lesquelles la super famille des serpines (pour "Serine Protease Inhibitors"). Il s'agit de la plus importante famille d'inhibiteurs et certains de ses composants sont présentés dans le tableau IV. Outre les membres de cette famille, on trouve parmi les inhibiteurs les plus importants l' α 2-macroglobuline.

TABLEAU IV: *Quelques membres de la super famille des serpines et leurs fonctions dans la régulation de l'action physiologique des protéases (d'après Potempa *et al.*, 1994). (★) : fonction non connue.*

Inhibiteur	Enzyme cible	Fonction
α 1-protéinase inhibiteur	élastase de neutrophile	remodelage matrice extracellulaire
α 1-anti-chymotrypsine	cathepsine G, chymase	remodelage matrice extracellulaire, conversion des prohormones, modulation de la réponse inflammatoire
α 2-anti-plasmine	plasmine	fibrinolyse
inhibiteurs 1 & 2 de l'activateur de plasminogène	urokinase activateur de plasminogène activateur de plasminogène tissulaire	remodelage matrice extracellulaire, migration des cellules, fibrinolyse, coagulation sanguine
anti-thrombine III	thrombine	coagulation sanguine
kallistatine	kallikréine	? (★)
leucocyte inhibiteur	élastase de neutrophile	protéolyse intracellulaire

Les inhibiteurs agissent en formant des complexes avec les protéases (complexes difficilement dissociables), ceci en bloquant le site actif (c'est le cas de l' $\alpha 2$ -macroglobuline) ou non. Ces complexes inhibiteur/protéase vont alors se fixer sur des récepteurs spécifiques de l'inhibiteur (et plus particulièrement de la conformation que prend l'inhibiteur lorsqu'il est complexé à la protéase) présents à la surface de cellules phagocytaires. Le complexe sera alors internalisé et délivré aux lysosomes pour être détruit. Dans le cas du complexe $\alpha 1$ -anti trypsine/élastase de neutrophiles, il a de plus été montré que la liaison de ce complexe à son récepteur active une voie de transduction du signal aboutissant à une augmentation de l'expression de l' $\alpha 1$ -anti trypsine et donc à une élimination de la protéase plus rapide (Perlmutter *et al.*, 1990).

Dans le cas des MMP, une autre étape de contrôle a été identifiée: il s'agit du contrôle de la synthèse et de la sécrétion de ces protéases par l'intermédiaire de cytokines. Cependant une même cytokine peut avoir des rôles antagonistes selon les cellules sécrétrices visées (Cawston *et al.*, 1995)

Dérégulation des fonctions physiologiques des protéases: au vu des fonctions essentielles des protéases dans de nombreux processus physiologiques, on comprend aisément qu'un dysfonctionnement dans leur activité, lié à un déséquilibre de la balance protéase/inhibiteur, puisse avoir des conséquences catastrophiques. Ainsi, l'inactivation de l' $\alpha 1$ -protease inhibitor (pouvant être causée notamment par l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa*, cf.paragraphe suivant) aboutit à une protéolyse incontrôlée et une dégradation des tissus (emphysème pulmonaire, periodontite...). De même, l'inactivation de l' $\alpha 1$ -anti trombine III conduit à la formation anormale de caillots sanguins. L'apparition de maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde peut également être liée à une variation de l'expression, soit des MMP (baisse de leur expression) soit de l'un de leur inhibiteur le TIMP (pour "tissue inhibitor of metalloprotease"), dont l'augmentation est observée dans les liquides synoviaux de patients (Cawston *et al.*, 1987). Une expression anormale des MMP peut également contribuer à des processus destructeurs tels que l'invasion de tumeurs, l'athérosclérose et vraisemblablement l'emphysème pulmonaire du à la fumée de cigarette.

2.2. Rôle des protéases dans les phénomènes d'invasion et de migration - Implication dans la virulence

Les microorganismes produisent de nombreuses protéases afin de subvenir à leurs besoins. Cependant, bien que cette action représente une fonction physiologique pour la bactérie ou le parasite, elle est à la base de la pathogénicité de ces microorganismes pour l'hôte. En effet, les protéases de bactéries ont pour substrat principal des protéines de l'hôte; de même, les cathepsines des parasites dégradent l'hémoglobine de l'hôte à des fins nutritionnelles. Par cette action, ces protéases se retrouvent impliquées à la fois dans l'invasion des microorganismes, leur migration au sein des tissus de l'hôte, et elles ont également été décrites comme composantes de la virulence.

Dans ce paragraphe, nous allons illustrer ces différentes fonctions par quelques exemples choisis parmi de nombreux travaux publiés dans ce domaine.

2.2.1. Invasion et migration des microorganismes

A ce titre, les protéases ont été décrites chez les bactéries et les parasites. On peut citer l'exemple de la protéase Pla de *Yersinia pestis*, agent responsable de la peste. Ainsi, en limitant l'accumulation de cellules inflammatoires de l'hôte autour de la bactérie, cette protéase assure la dissémination de l'agent dans les tissus de l'hôte à partir du site initial de colonisation (Goguen *et al.*, 1995).

Chez les parasites, la protéase participant à l'invasion et à la migration la mieux étudiée est l'élastase de cercaire, décrite chez *S. mansoni*. Ainsi, la pénétration des cercaires de *S. mansoni* à travers la peau et l'invasion des vaisseaux sanguins sont initiées par le relargage d'une élastase sécrétée par les glandes acétabulaires sous la stimulation des lipides de la peau (Landsperger *et al.*, 1982; McKerrow *et al.*, 1983; 1985). Cette élastase dégrade la plupart des macromolécules du tissu connectif trouvées dans la peau et les parois des vaisseaux sanguins (McKerrow *et al.*, 1985) et contribue ainsi à la formation de canaux à travers le derme et l'épiderme, facilitant la pénétration des cercaires. Chez ce même parasite d'autres protéases ont été impliquées dans la migration; elles seront exposées et leur action sera développée dans le paragraphe 3.

Un autre exemple peut illustrer ce rôle des protéases: il s'agit de la dissémination des tumeurs assurée par les protéases produites par les cellules cancéreuses. En effet, il a été

largement décrit que des protéases, telles que les cathepsines B, D et L, l'activateur de plasminogène urokinase ou beaucoup de métalloprotéases, sont relarguées par la tumeur primaire. Ces protéases catalysent alors la dégradation de la matrice intersticielle et des membranes et permettent aux cellules cancéreuses de se répandre et migrer; on assiste alors à la formation de métastases. A ce titre, l'utilisation de ces protéases comme marqueur du cancer a été envisagée (Duffy, 1992; 1996).

2.2.2. Les protéases: facteurs de virulence?

Dans ce paragraphe, nous ne citerons que des exemples de bactéries ou virus, le cas particulier des parasites faisant l'objet du chapitre 2.4.

De très nombreux travaux ont permis de relier la virulence de microorganismes à l'action de protéases et, dans le cas des bactéries, différents mode d'action ont été décrits (Tableau V) (Goguen *et al.*, 1995 et Travis *et al.*, 1995).

TABLEAU V: *Rôles suggérés des protéases de bactéries dans l'augmentation de la virulence (d'après Goguen et al., 1995 et Travis et al., 1995).*

Modes d'action	Spécificité des protéases	Avantages pour la bactérie	Effets pathologiques
Protéolyse	large spécificité, macromolécules présentes dans les tissus	fournit à la bactérie de grandes quantités de peptides et acides aminés à des fins nutritionnelles	destruction des tissus
Atténuation de la réponse inflammatoire	inactivation ou dégradation de protéines clés dans la réponse anti-bactérienne (protéines bactéricides, immunoglobulines), clivage de récepteurs de surface.	limite la réponse de l'hôte à des niveaux inefficaces	empêche le contrôle d'infections à des stades précoces
Activation ou inactivation de processus physiologiques	activation ou inactivation de la cascade kallikréine-kinine, de la cascade de coagulation, des facteurs du complément, inactivation d'inhibiteurs de protéases	interfère directement ou non avec la réponse anti-bactérienne	activation incontrôlée de processus physiologiques

Un premier aspect de la virulence protéase-dépendante des bactéries repose sur l'activité protéolytique propre de ces molécules. En effet, beaucoup de bactéries sécrètent

plusieurs protéases (souvent sérine et métalloprotéases) possédant un spectre d'action très large (*Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*). La dégradation de protéines par de tels organismes peut être néfaste pour l'hôte. Ainsi la protéolyse du collagène, de l'élastine et de la fibronectine par ces microorganismes contribue à une destruction massive des tissus, associée à des pathologies telles que la fibrose kystique (suite à des infections chroniques par *P. aeruginosa*) ou la gangrène (causée par *Clostridium perfringens*).

Les protéases de microorganismes peuvent également intervenir en dérégulant des processus physiologiques de l'hôte. Ainsi, l'infection par la plupart des bactéries cause, au site de l'infection une douleur et un oedème. La dérégulation de la cascade kallikréine-kinine par les protéases bactériennes peut expliquer ce phénomène. En effet, ces protéases peuvent intervenir à différentes étapes de la cascade et l'activer. En fin de chaîne on assiste alors à une production de bradykinine, responsable d'une extravasation et de l'apparition de douleurs et de contractions musculaires. Beaucoup de pathogènes sont ainsi capables, par l'intermédiaire de la sécrétion de protéases, d'activer des cascades physiologiques de l'hôte, dépendantes de ces molécules, telles que la cascade de coagulation, la fibrinolyse, l'activation du complément ou la phagocytose. Ainsi, les protéases des microorganismes possèdent les mêmes spécificités de clivage que celles de l'hôte intervenant normalement dans ces cascades, et sont généralement plus actives que celles-ci; cependant, les protéases bactériennes ne sont pas affectées par les inhibiteurs de l'hôte et on assiste alors à une protéolyse incontrôlée. Dans ce sens, il existe également des cas où les protéases de bactéries sont capables de dégrader les inhibiteurs de l'hôte: l'élastase de *P. aeruginosa* inactive l' α 1-protéinase inhibiteur (Moriwaka *et al.*, 1979). D'autres microorganismes vont même jusqu'à utiliser les inhibiteurs de l'hôte à leurs fins. Ainsi, une protéase de *Serratia marcescens* génère un mécanisme cytotoxique par l'intermédiaire de la formation d'un complexe non stable avec l' α 2-macroglobuline: le complexe est internalisé via les récepteurs à l' α 2-macroglobuline présent sur les fibroblastes ou les macrophages puis, une fois à l'intérieur de la cellule, l'activité protéolytique est graduellement régénérée par la dégradation des complexes; on assiste alors à une destruction massive des protéines intra-cellulaires allant jusqu'à la mort de la cellule (Maeda *et al.*, 1987).

Le rôle critique joué par les protéases de bactéries a été dans certains cas démontré par une stratégie de délétion de gène. Cette technique a également permis de démontrer le rôle de la protéase du VIH dans la virulence de ce virus (Peng *et al.*, 1989): cette protéase, une aspartyl protéase, est essentielle à la production de virions infectieux matures. Cependant,

elle interagit également avec de nombreux substrats des cellules de l'hôte, et il semble que le clivage enzymatique des protéines cellulaires de l'hôte joue un rôle capital dans la pathogénèse du SIDA (Goldberg & Stricker, 1996).

Un autre moyen pour les microorganismes d'"augmenter leur virulence" consiste à dévier la réponse immunitaire de l'hôte; ceci sera traité dans le paragraphe suivant.

2.3. Protéases et réponses immune et inflammatoire

2.3.1. Les protéases: composantes de la réponse immunitaire

De par leur action protéolytique, les protéases sont largement impliquées dans la défense de l'hôte. Ainsi, depuis plus de vingt ans, de nombreux travaux ont suggéré que l'activité protéolytique est indispensable aux mécanismes de cytotoxicité cellulaire (Altieri, 1995). Cependant, la participation directe des protéases dans les processus de lyse n'a été montrée que lorsqu'une famille de sérine protéases stockée dans les granules sécrétoires des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK (Natural Killer) a été caractérisée (Masson & Tschopp, 1987; Bleackley *et al.*, 1988). Ces protéases sont constitutivement exprimées dans les cellules NK, et inductibles dans les lymphocytes T cytotoxiques (lorsque les lymphocytes T se différencient en cellules cytotoxiques). De telles protéases ont été identifiées dans les lymphocytes de souris (elles sont au nombre de 7), de rat (6 protéases) et humains (4 protéases). Elles ont des spécificités de substrat diverses.

Les granules sécrétoires contiennent donc un stock de sérine protéases, appelées granzymes, mais également des perforines et des protéoglycanes. Le contenu de ces granules est libéré sur les cellules cibles et l'action simultanée de ces différents composants produit le profil classique de lyse médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (Tableau VI): on observe notamment des lésions membranaires dues à la formation de pores, et une fragmentation de l'ADN, qui provient d'une activation par les granzymes d'une voie endogène de mort cellulaire programmée dans les cellules cibles (Altieri, 1995).

L'activité de ces protéases est régulée par le pH: à l'intérieur des granules le pH est faible et les protéases sont inactives. Après stimulation, une élévation du pH à l'intérieur des granules va activer les protéases et leur permettre de dégrader différents substrats avant d'être relarguées grâce à la formation de pores (Hudig *et al.*, 1993).

TABLEAU VI: Fonctions effectrices des sérine protéases granulaires (d'après Altieri, 1995).

Protéase	Propriétés
Granzyme A	apoptose dans les cellules cibles mitogène autocrine des cellules T prolifération des cellules B dégradation de la matrice extracellulaire
Granzyme B	apoptose dans les cellules cibles dégradation des "aggrecan"
Tryptase des mastocytes	prolifération des fibroblastes augmentation de la prolifération des fibroblastes induite par les facteurs de croissance

En dehors des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK, les protéases ont également été décrites dans les macrophages (élastase et metalloprotéases; Shapiro *et al.*, 1993), les neutrophiles (élastase et cathepsine G; Starkey, 1977) et les mastocytes (granzymes) et contribuent à la défense de l'hôte contre les microorganismes. De plus, il a été montré que certaines protéases, dont l'élastase et la cathepsine G de neutrophiles, sont capables d'induire le relargage d'ions superoxyde par les macrophages (Speer *et al.*, 1984). Il en est de même pour les monocytes, dont la production d'ions superoxyde est bloquée en présence d'inhibiteurs de sérine protéases (Megyeri *et al.*, 1995).

Ces mécanismes représentent une autre fonction des protéases qui, en dehors de leur rôle premier vont réguler les fonctions des cellules effectrices dans la défense de l'hôte. Ainsi, alors que les cas précédents faisaient appel à des protéases participant aux fonctions effectrices (élastase et cathepsine G de neutrophiles), différents travaux ont montré le rôle d'autres protéases dans de tels phénomènes de régulation. Par exemple, l' α 1-antichymotrypsine (enzyme impliquée dans la digestion intestinale) est capable d'inhiber la production d'ions superoxyde par les neutrophiles (Kilpatrick *et al.*, 1991). De même, bien qu'elles soient reconnues pour leur rôle dans le maintien de l'hémostase, les protéases des cascades de coagulation et fibrinolyse peuvent également influencer de nombreuses fonctions effectrices des leucocytes (Altieri, 1995). Ainsi, la thrombine possède la capacité à stimuler l'agrégation plaquettaire et la sécrétion des granzymes. Les interactions thrombine-cellules sont régulées par un mécanisme dépendant d'un récepteur: par la liaison à ce récepteur, la thrombine déclenche une voie complexe de transduction du signal, caractérisée par une

augmentation du calcium intracellulaire, la génération de seconds messagers, la modulation de l'expression de gènes, et la production d'inositol triphosphate, aboutissant à une activation des leucocytes. De plus la thrombine peut également moduler les propriétés d'adhérence et de chimiotaxie des leucocytes: en augmentant la libération de PAF (Platelet Activating Factor) par les cellules endothéliales, la thrombine augmente également l'adhérence de ces cellules aux neutrophiles (Zimmerman *et al.*, 1985). Cette adhérence pouvant être inhibée par des anticorps dirigés contre des ligands de surface, il semble donc que la thrombine agisse directement ou indirectement sur ces ligands (Toothill *et al.*, 1990).

La thrombine n'est pas la seule protéase impliquée dans des phénomènes de modulation des fonctions effectrices des leucocytes: l'urokinase plasminogène activateur intervient également en induisant notamment la prolifération des lymphocytes (Cohen *et al.*, 1981) et la migration des leucocytes *in vivo* chez la souris (Altieri, 1995). De même, le facteur Xa a été indirectement impliqué dans de tels phénomènes: en effet, la diminution du nombre de récepteurs pour le Facteur Xa inhibe la prolifération des lymphocytes T (Duchosal *et al.*, 1996).

2.3.2. Les protéases: rôle dans l'échappement des microorganismes à la réponse immune

Outre le rôle important joué par les protéases de microorganismes dans la pathogénicité (cf. § 2.2.2), ces molécules sont également capables de dévier ou moduler la réponse immune de l'hôte afin d'y échapper. A ces fins, les protéases de bactéries peuvent utiliser différents mécanismes: activation ou inactivation de cytokines, de la cascade des facteurs du complément, dégradation d'immunoglobulines ou clivage de récepteurs cellulaires de surface (Travis *et al.*, 1995). L'élastase de *P. aeruginosa* est un bon exemple car elle est impliquée dans nombre de ces phénomènes: elle est capable de dégrader les IgA (Heck *et al.*, 1990) et d'inactiver les facteurs C1q et C3 du complément, ce qui aboutit à une diminution du recrutement des neutrophiles (Hong & Ghebrehiwet, 1992). De plus, en synergie avec la protéase alcaline, l'élastase de *P. aeruginosa* contribue à l'inactivation de cytokines participant aux réponses immune et inflammatoire. Ainsi, l'action simultanée de ces deux protéases inactive l'IFN- γ et le TNF- α *in vitro*, alors que l'IL-1 α et l'IL-1 β ne sont pas affectées (Parmely *et al.*, 1990).

Un autre aspect des mécanismes d'échappement à la réponse immune de l'hôte repose sur l'interaction des protéases avec les inhibiteurs de l'hôte, rendant la molécule invisible au système immunitaire. A ce titre on peut citer l'exemple de la protéase de *S. marcescens* qui interagit avec l' α 2-macroglobuline (cf. § 2.2.2.). D'autres exemples de phénomènes d'échappement à la réponse immune dépendants de protéases ont été décrits, notamment chez le parasite *S. mansoni*; ils seront exposés au paragraphe 3.

2.4. Les protéases chez les parasites

Au vu des rôles multiples des protéases dans les processus physiologiques ainsi que dans la virulence des bactéries, il n'est pas surprenant que ces molécules aient été également largement impliquées dans la pathogénèse des maladies parasitaires. En effet, les protéases possèdent différentes fonctions chez les parasites, parmi lesquelles on note (McKerrow, 1989; Mc Kerrow *et al.*, 1993):

- Invasion de l'hôte facilitée par la dégradation des tissus;
- Métabolisme à l'intérieur de l'hôte (mise à profit de l'abondance des protéines de l'hôte, dans l'environnement du parasite);
- Echappement ou modulation de la réponse immune par la dégradation ou l'activation de molécules impliquées dans cette réponse;
- Interaction avec les cascades de coagulation et de fibrinolyse;
- Remodelage et modifications morphologiques du parasite d'un stade à un autre;
- Activation du renouvellement des hormones, enzymes et protéines du parasite synthétisées sous forme de précurseurs;
- Dégradation de protéines du cytosquelette de l'hôte permettant l'invasion ou la rupture des cellules de l'hôte.

Les protéases sont étudiées non seulement pour ces fonctions essentielles, mais également, elles représentent des sondes intéressantes et facilement détectables dans le but d'étudier la régulation de l'expression de gènes de parasites au cours du développement. De plus, de par leur rôle, les protéases parasitaires sont des cibles potentielles pour une immuno- ou chimiothérapie, et dans certains cas, leur utilisation a été envisagée en sérodiagnostic.

Un grand nombre de protéases ayant été décrites chez les parasites sont des enzymes dont le rôle est de dégrader des protéines de l'hôte à des fins nutritionnelles. On note ainsi les hémoglobinasés et cathepsines appartenant aux sous-famille des cystéine ou aspartyl protéases, décrites notamment chez *S. mansoni* (Klinkert *et al.*, 1989), *Plasmodium falciparum* (Goldberg *et al.*, 1991) (chez qui huit activités protéolytiques dégradant l'hémoglobine ont été décrites; McKerrow *et al.*, 1993), ou *Entamoeba histolytica* (Luaces & Barret, 1988), agent des amibiases. Chez ce dernier parasite, la thiol protéase caractérisée comme une cathepsine B-like est, de plus, largement associée à la pathogénicité (Gadasi & Kobilier, 1983). De même, dans le cas des parasites intestinaux ("hookworms") une protéase de *Ancylostoma* a été caractérisée par ses propriétés indirectes sur la nutrition de ce parasite: ses fonctions anticoagulantes permettent au vers de se nourrir dans les capillaires intestinaux (Hotez & Cerami, 1983). La cystéine protéase majeure de *Trypanosoma cruzi* (Bontempi *et al.*, 1984) semble jouer de nombreux rôles chez ce parasite, parmi lesquels une participation au métabolisme intracellulaire a été proposée (Calderon *et al.*, 1989). Cependant, cette protéase est également impliquée dans l'interaction parasite-macrophage, l'invasion des cellules de l'hôte et l'adhérence aux cellules cibles.

Ces fonctions représentent un autre rôle essentiel joué par les protéases de parasites, consistant à faciliter leur invasion et migration dans les tissus de l'hôte. A ce titre on note l'élastase de *S. mansoni* (McKerrow *et al.*, 1985; Newport *et al.*, 1988b) dont le rôle sera plus amplement développé dans le paragraphe suivant. De même, l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes, forme libre de *Plasmodium*, dépend, entre autres, de plusieurs protéases (Braun Breton & Pereira da Silva, 1993). Cependant, bien que plus de 25 protéases aient été décrites chez plusieurs espèces de *Plasmodium*, seulement deux ont vu leur rôle précisé: d'une part l'hémoglobinasé cité précédemment, et d'autre part, une protéase spécifique du mérozoïte participant à l'invasion du globule rouge par dégradation d'une protéine de la surface érythrocytaire (Braun Breton *et al.*, 1992). Chez les nématodes, plusieurs protéases ont été également impliquées dans les phénomènes de pénétration des tissus, c'est le cas notamment d'une sérine protéase de *Anisakis simplex* (Morris & Sakanari, 1994).

Les protéases de parasites sont également impliquées dans des phénomènes de modulation de la réponse de l'hôte (McKerrow, 1989). En effet, elles peuvent intervenir dans l'activation ou l'inactivation de la cascade du complément (*E. histolytica*, *S. mansoni*,

Leishmania major), dégrader des immunoglobulines IgG, mais en même temps augmenter l'activité des éosinophiles et la synthèse des IgE (*S. mansoni*).

3. Les protéases chez *Schistosoma mansoni*

Chez *Schistosoma mansoni*, de nombreuses protéases ont été décrites et caractérisées (Tableau VII). De plus, plusieurs phénomènes de modulation de la réponse immune, dépendants d'activité protéolytique, ont été mis en évidence chez ce parasite, même si les enzymes réellement impliquées n'ont pas toujours été identifiées.

3.1. Protéases décrites chez *Schistosoma mansoni*

3.1.1. Invasion et migration des larves

Depuis longtemps, la pénétration et la migration des larves du schistosome dans la peau de l'hôte ont été considérées comme dépendantes d'une action combinée de plusieurs enzymes protéolytiques. La pénétration des cercaires apparaît suite à une stimulation par interaction avec une chaîne d'acides gras des lipides de surface de la peau. Durant cette pénétration la cercaire perd sa queue et son glycocalyx riche en carbohydrates (Fig. 4). Les larves qui parviennent à entrer dans la peau atteignent la base de l'épiderme en 30 minutes et y restent pendant 40 à 48 heures, avant d'entrer dans le derme.

Des premiers travaux ont montré qu'une activité protéolytique sécrétée des glandes acétabulaires de la cercaire (Fig. 4) était impliquée dans la pénétration de la peau de l'hôte (Stirewalt, 1974). En 1982, Landsperger *et al.* (1982) ont purifié une sérine protéase d'environ 25 kDa à partir d'extraits de cercaires, puis en 1985, Mc Kerrow *et al.* (1985) ont purifié une élastase de 30 kDa à partir des sécrétions de cercaires, et caractérisé ses propriétés biochimiques. Cette enzyme possède une large spécificité de substrat incluant la kératine (Tzeng *et al.*, 1983), la fibronectine, la laminine, le collagène de type IV, l'élastine et la chaîne principale des protéines et protéoglycanes (McKerrow *et al.*, 1985). L'ADNc codant pour cette élastase a été cloné et séquencé, et la comparaison avec la taille de l'ARNm a permis de déduire que cette enzyme est synthétisée sous forme d'une préproenzyme (Newport *et al.*, 1988b). La séquence d'acides aminés déduite indique que cette protéase appartient à la famille des sérine protéases, et à la sous famille des chymotrypsines, selon la classification déterminée par Rawlings & Barret (1993). De plus, elle présente de fortes homologies avec les élastases pancréatiques I et II de rat.

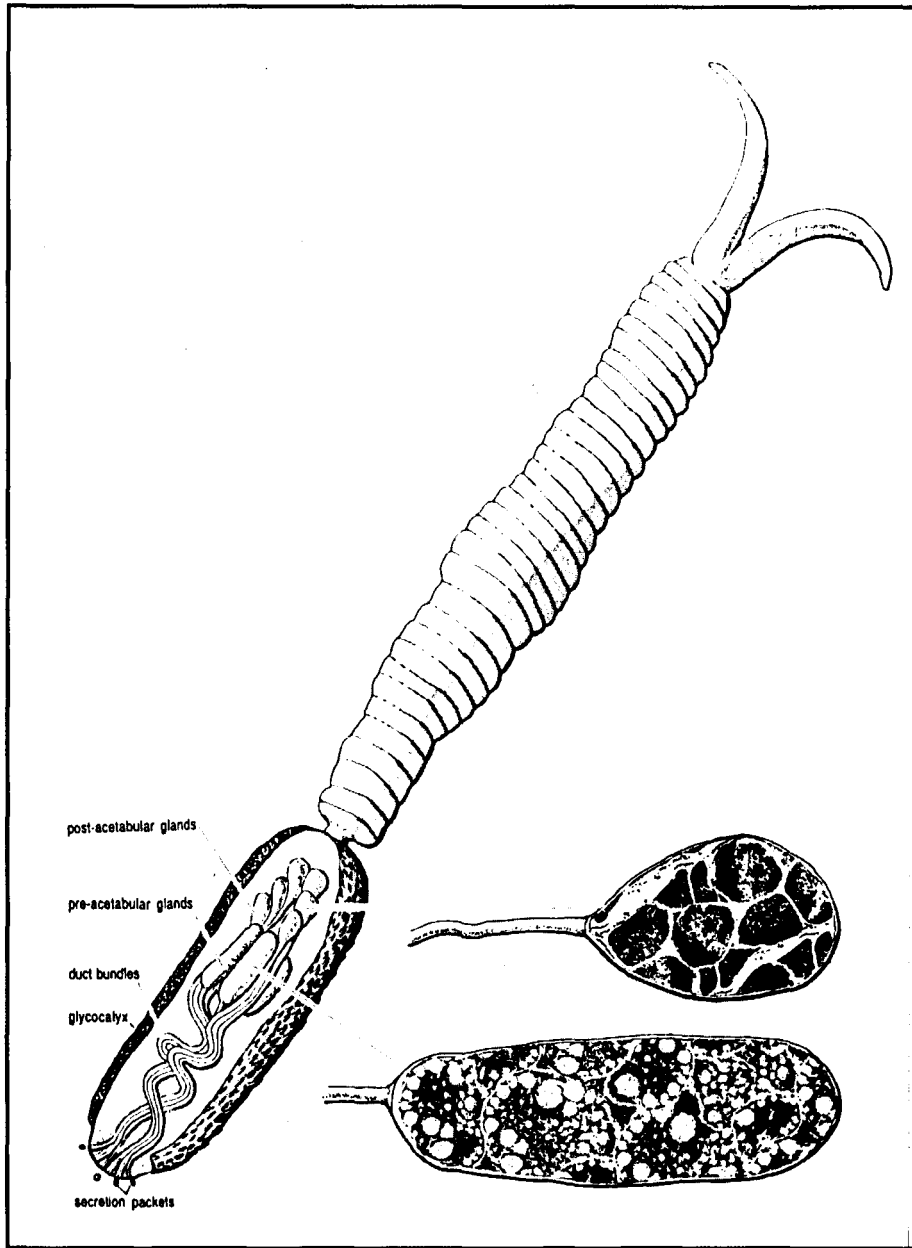


Figure 4: Illustration des glandes acétabulaires de la cercaire de *Schistosoma mansoni*, et leur ultrastructure (Daprès Marikovsky et al. 1990).

L'importance de cette élastase dans la pénétration des cercaires a été démontrée par les travaux de Cohen *et al.* (1991), montrant qu'un inhibiteur synthétique spécifique du site actif de l'élastase (modélisé en trois dimensions par ordinateur) pouvait bloquer la pénétration des cercaires dans la peau de souris, sans affecter leur mobilité.

TABLEAU VII: *Protéases décrites chez Schistosoma mansoni.*

Nom (Masse moléculaire)	Famille d'endoprotéase	Stade	Fonction supposée	Référence
I (25kDa)	cystéine	oeuf	Cathepsine L-like sortie du système vasculaire	Sung & Dresden, 1986
II (30kDa)	cystéine	oeuf		
III (nd)	cystéine	oeuf		
leucine amino peptidase (nd)	(*)	oeuf	libération du miracidium	Xu & Dresden, 1986
(19kDa)	cystéine	miracidium	Infection et maintien dans le mollusque	Yoshino <i>et al.</i> , 1993
(36kDa)	cystéine	miracidium		
(25kDa)	sérine	cercaire	chymotrypsine-like invasion	Landsperger <i>et al.</i> , 1992
élastase (30kDa)	sérine	cercaire	pénétration dans les tissus de l'hôte définitif	McKerrow <i>et al.</i> , 1983; 1985; Newport <i>et al.</i> , 1988b
(47kDa)	sérine	cercaire	invasion	Chavez-Olortegui <i>et al.</i> , 1992
m28 et s28 (28kDa)	sérine	schistosomule	perte du glycocalyx migration-entrée dans le système vasculaire	Marikovsky <i>et al.</i> , 1988a Ghendler <i>et al.</i> , 1996
(60kDa)	sérine	cercaire	perte du glycocalyx migration-entrée dans le système vasculaire	Marikovsky <i>et al.</i> , 1988a
métalloprotéase (nd)	métallo	schistosomule	nutrition	Keene <i>et al.</i> , 1983
"hémoglobine" = Sm32 (32kDa) (**)	cystéine	adultes	dégradation de l'hémoglobine	Davis <i>et al.</i> , 1987
asparaginy endopeptidase = Sm32 (32kDa) (**)			rôle dans les modifications post- traductionnelles	Dalton <i>et al.</i> , 1995a
Sm31 =cathepsine B (31kDa)	cystéine	adultes	dégradation de l'hémoglobine- migration dans le sang	Klinkert <i>et al.</i> , 1989 Götz & Klinkert, 1993
Cathepsine L1 (35kDa)	cystéine	adultes	dégradation de l'hémoglobine	Smith <i>et al.</i> , 1994
Cathepsine L2 (35kDa)	cystéine	adultes	migration des oeufs dans le ver femelle	Michel <i>et al.</i> , 1995
Carthepsine C (nd)	cystéine	adultes	(nd)	Butler <i>et al.</i> , 1995
Calpaine (75kDa)	cystéine	adultes	métabolisme - renouvellement de la membrane	Andresen <i>et al.</i> , 1991 Karcz <i>et al.</i> , 1991

(nd): non déterminé; (*): exopeptidase; (**): la Sm32 a été décrite comme hémoglobinease puis s'est révélée correspondre à une asparaginy endopeptidase ne possédant pas d'activité protéolytique directe vis-à-vis de l'hémoglobine.

D'autres protéases ont été caractérisées aux stades larvaires et semblent impliquées dans la migration de celles-ci au sein de l'hôte. C'est le cas de deux sérine protéases de 28 et 60 kDa caractérisées par Marikovsky *et al.* (1988a). Ces deux protéases ont également une large spécificité de substrat: caséine, gélatine, fibronectine. Elles participent à la perte du glycocalyx et facilitent la migration des schistosomules. La 28 kDa a été localisée chez la cercaire dans les glandes pré- et post-acétabulaires, et par technique d'immunofluorescence, elle a été détectée dans le glycocalyx; après transformation en schistosomule, la protéase est alors détectée sur la membrane du schistosomule (Marikovsky *et al.*, 1990). Récemment, Ghendler *et al.* (1996) ont montré que cette protéase existe sous deux formes: une forme soluble (s28) et une forme membranaire (m28), liée par l'intermédiaire d'un ancrage lipidique via le glycosyl phosphatidyl inositol.

Une métalloprotéase spécifique des schistosomules semble également impliquée dans la migration de ceux-ci. Cette activité apparaît dans les schistosomules après 1 jour et est maintenue pendant 6 semaines de culture *in vitro* (Keene *et al.*, 1983).

3.1.2. Métabolisme et survie des vers chez l'hôte définitif

Plusieurs protéases de la famille des cystéine protéases ont été identifiées chez les vers adultes comme participant à la nutrition des schistosomes. En effet, lorsque les schistosomules quittent les poumons puis migrent dans le foie, ils subissent une maturation sexuelle et deviennent des vers adultes. Ils perdent alors de leur mobilité et commencent à se nourrir à partir des érythrocytes de l'hôte. De nombreux auteurs se sont intéressés à caractériser la(les) protéase(s) impliquée(s) dans cette dégradation de l'hémoglobine et, dès 1959, Timms & Bueding (1959) ont identifié une enzyme protéolytique présentant une activité vis-à-vis de l'hémoglobine. Le rôle de cette enzyme dans l'apport en acides aminés au parasite à des fins nutritionnelles a alors été suggéré. Depuis, de nombreuses protéases capables de dégrader l'hémoglobine ont été caractérisées, même si une certaine confusion existe encore quant à attribuer le rôle d'"hémoglobinasé" à l'une ou l'autre d'entre-elles.

En effet, en 1987, Davis *et al.* (1987) caractérisent ce qu'ils appellent alors une "hémoglobinasé" car cette fraction purifiée chez les vers adultes présente une activité vis-à-vis de l'hémoglobine. La même année, puis en 1989, Klinkert *et al.* (1987; 1989) caractérisent et clonent deux cystéine protéases nommées Sm31 et Sm32, la Sm32 correspondant en fait à la copie complète de l'ADNc de l'"hémoglobinasé" décrite

précédemment. Quant à la Sm31, elle présente des homologies avec des protéases de mammifères et particulièrement avec des cathepsines B. La nature de la Sm31 a été confirmée en 1993 par Götz & Klinkert (1993) qui ont cloné et exprimé cette protéine en cellules d'insectes. La Sm31 recombinante ainsi obtenue est capable de cliver non seulement un peptide substrat spécifique des cathepsines B, mais également l'hémoglobine. Récemment, ce qu'on appelle maintenant la cathepsine B a été exprimée en levure (*Saccharomyces cerevisiae*) puis activée artificiellement grâce à l'action de la pepsine; cette étude a permis de compléter l'étude fonctionnelle de cette enzyme et a confirmé sa capacité à dégrader l'hémoglobine (Lipps *et al.*, 1996). Quant à la Sm32, elle a été également exprimée en cellules d'insectes (Götz & Klinkert, 1993), et la protéine recombinante ne présente pas d'activité vis-à-vis de l'hémoglobine, ce qui va à l'encontre du rôle d'"hémoglobinase" supposé jusqu'alors. La question quant à la nature de cette protéase n'a été résolue que plus tard, lorsqu'une homologie de séquence avec une asparaginyl endoprotéase a été observée (Dalton *et al.*, 1995a). La Sm32 est donc effectivement une cystéine protéase d'une famille de protéase décrite essentiellement chez les légumineuses. Depuis, l'activité asparaginyl endoprotéase a été effectivement caractérisée dans les vers adultes de *S. mansoni*, et il a été suggéré que la Sm32 joue un rôle dans les modifications post-traductionnelles régulant l'activité d'autres molécules (Dalton *et al.*, 1995b), notamment des cathepsines (Dalton & Brindley, 1996a).

De fait, plusieurs cathepsines ont été identifiées chez *S. mansoni*, outre la cathepsine B ou Sm 31: deux cathepsines L (cathepsine L1 (Smith *et al.*, 1994) et cathepsine L2 (Michel *et al.*, 1994)), toutes deux des cystéine protéases, ont été caractérisées et semblent impliquées également dans le métabolisme du parasite. Ces deux protéases sont similaires à 44%, la cathepsine L2 possédant le plus fort degré d'homologie avec la cathepsine L humaine (52%). De plus, des différences observées entre ces deux cathepsines au niveau du site actif, de la région correspondant au propeptide ainsi que de leur potentiel de glycosylation suggèrent que ces deux enzymes présentent des fonctions différentes pour le schistosome (Dalton *et al.*, 1996). De plus, ces deux enzymes possèdent des localisations différentes: la cathepsine L1 est localisée dans l'intestin, alors que la cathepsine L2 est majoritairement présente chez la femelle, au niveau de structures associées au système de reproduction; son rôle dans la migration des cellules vitellines ou des oeufs chez le schistosome femelle a été suggéré (Michel *et al.*, 1994).

Une autre cystéine protéase, vraisemblablement impliquée dans le métabolisme des vers adultes a également été caractérisée: il s'agit de la calpaine (ou CANP pour "Calcium Activated Neutral Proteinase"), clonée simultanément par deux équipes (Andresen *et al.*, 1991; Karcz *et al.*, 1991). Des activités exo protéasiques, parmi lesquelles une leucine amino peptidase (Auriault *et al.*, 1982a), ont été identifiées chez les vers adultes et les schistosomules; cependant, leur rôle dans le maintien des vers dans le système vasculaire reste à définir.

Bien que plusieurs équipes revendiquent le rôle primordial de telle ou telle protéase dans la dégradation de l'hémoglobine par *S. mansoni* (Klinkert & Kunz, 1996; Dalton & Brindley, 1996b), tous s'accordent quant au rôle fondamental des cystéine protéases dans ce mécanisme. Ceci a d'ailleurs été confirmé par les travaux récents de Wasilewski *et al.* (1996) montrant que des inhibiteurs synthétiques spécifiques des cystéine protéases pouvaient bloquer la dégradation de l'hémoglobine *in vitro*. En outre, l'injection de ces inhibiteurs *in vivo* à des souris Balb/c induit une diminution de la charge parasitaire et de la production des oeufs par les vers femelles. Ces deux observations correspondraient d'une part à l'inhibition des cathepsines B et L1 (dégradation de l'hémoglobine), et d'autre part à celle de la cathepsine L2 (diminution du nombre d'oeufs). Ceci indique donc le potentiel chimiothérapeutique de tels inhibiteurs et souligne le rôle fondamental des cystéine protéases dans la survie du parasite.

3.1.3. Extravasation, excrétion et éclosion des oeufs

La transmission de la bilharziose repose notamment sur la capacité des oeufs à être excrétés de l'hôte définitif. Pour cela, bien que ne possédant aucun moyen de se déplacer, les oeufs doivent franchir plusieurs barrières. En effet, les oeufs produits par les vers femelles, sont déposés à l'intérieur des vaisseaux et sont parfois entraînés par le flux sanguin dans de fins capillaires où ils restent bloqués et déterminent la formation du granulome bilharzien. Cependant, une partie d'entre-eux est extravasée et traverse la paroi de l'intestin, duquel ils seront excrétés. L'action de protéases, combinée à des contractions musculaires des tissus de l'hôte est fondamentale dans ce processus. Ainsi, différentes activités protéolytiques ont été identifiées dans les oeufs. On note principalement des cystéine protéases, décrites initialement par Asch & Dresden (1979) puis caractérisées en 1986 par Sung & Dresden (1986). Ces trois cystéine protéases, dont deux sont majoritaires, présentent une activité

cathepsine L-like et leur rôle dans la sortie des oeufs du système vasculaire a été suggéré. En 1968, une activité collagénase-like a également été décrite dans les oeufs mais elle n'a pas été plus caractérisée depuis (Kloetzel, 1968).

Une exoprotéase, à activité leucine amino peptidase, déjà décrite chez les vers adultes (Auriault *et al.*, 1982a) est également présente chez les oeufs où elle est impliquée dans l'éclosion et la libération du miracidium (Xu & Dresden, 1986; Xu *et al.*, 1990). En effet, 95% de cette activité est libérée au moment de l'éclosion des oeufs; son action semble donc couplée à d'autres facteurs d'éclosion tels que l'augmentation de la pression osmotique et/ou l'action mécanique des miracidiums sur la paroi de l'oeuf.

Chez le miracidium, deux cystéine protéases de 19 et 36kDa ont été caractérisées dans les surnageants de culture *in vitro* (Yoshino *et al.*, 1993). Cette activité est également décelée dans les sporocystes primaires et est responsable d'une dégradation de l'hémolymphe du mollusque *in vitro*. Ces observations suggèrent donc le rôle de ces deux protéases dans l'établissement et/ou le maintien de l'infection dans l'hôte intermédiaire.

3.1.4. Expression des protéases de *S. mansoni* au cours du développement

Dans les paragraphes précédents, ainsi que dans le Tableau VII, le stade de développement indiqué pour chaque protéase correspond au stade où ces protéases ont été initialement décrites, ou bien où leur rôle est le plus justifié. Cependant, certaines d'entre-elles ne sont pas spécifiques d'un seul stade: la leucine amino peptidase décrite chez les oeufs est également présente, à de moindres taux chez les miracidiums, cercaires et vers adultes (Yoshino *et al.*, 1993). De même, très récemment, Dalton *et al.* (1997) ont montré la présence d'activité protéolytique, spécifique des cathepsines B d'une part, et des cathepsines L1 et L2 d'autre part, dans les cercaires et les schistosomules, ces trois protéases ayant été auparavant décrites chez les vers adultes. La localisation menée chez les cercaires indique que ces trois protéases, présentes au niveau des glandes post-acétabulaires, sont vraisemblablement relarguées par la cercaire et participent avec les sérine protéases au processus d'invasion des tissus de l'hôte définitif. Quant à ces sérine protéases décrites chez la cercaire, il semble que leur activité spécifique soit absente chez les schistosomules 3h et 24h (Dalton *et al.*, 1997), alors que Keene *et al.* (1983) ont montré que l'activité vis-à-vis de l'élastine était encore décelée 24h après transformation en schistosomule.

La figure 5 tente de clarifier la complexité observée dans la synthèse des protéases de *S. mansoni* au cours du développement. Cependant, il faut noter que l'absence de figuration d'expression sur ce schéma n'indique pas forcément l'absence réelle d'expression par le parasite: pour beaucoup l'étude à d'autres stades que ceux figurés n'a pas été réalisée.

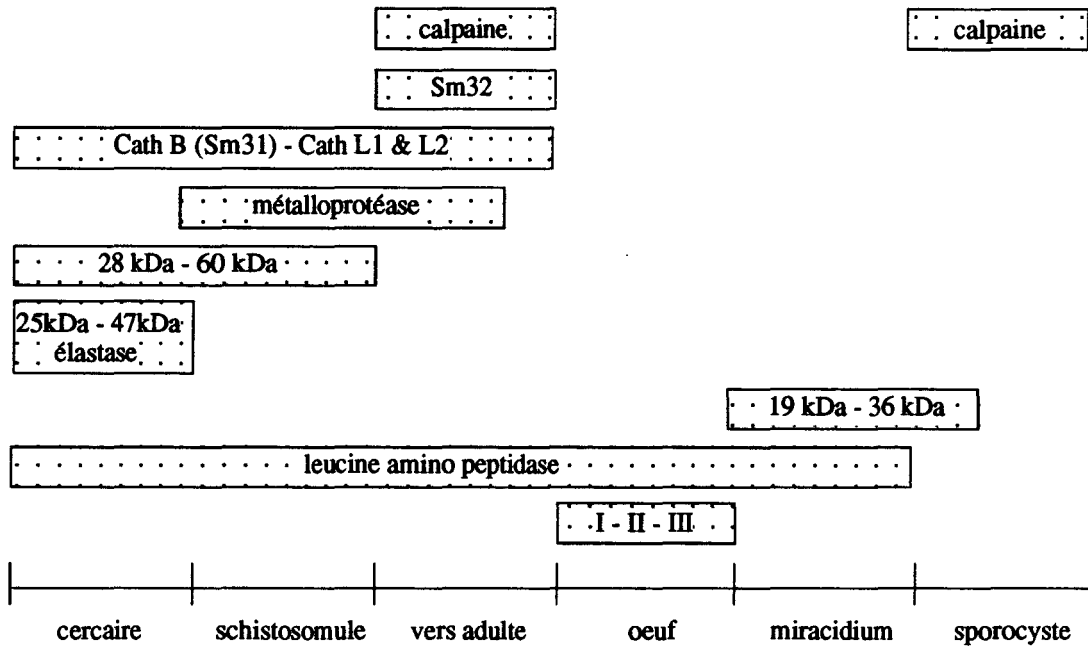


Figure 5: Expression des protéases de *Schistosoma mansoni* au cours du développement. Représentation schématique basée sur la détection de l'ARNm et/ou d'activités protéolytiques spécifiques.

3.1.5. Immunogénicité des protéases de *S. mansoni*

Au vu des rôles des différentes protéases présentes chez *S. mansoni* aux stades en contact avec l'hôte définitif (qui supposent souvent une sécrétion), on peut s'attendre à ce que ces enzymes soient fortement immunogéniques. Peu de travaux se sont consacrés à cette étude, et les protéases dont l'immunogénicité a été testée sont les Sm31/32 et l'élastase de cercaire.

Les Sm31 et Sm32 ont été initialement caractérisées suite à l'observation de leur potentiel sérodiagnostique. En effet, plusieurs études ont montré la présence d'anticorps dirigés contre ces deux protéases dans les sérums d'infections humaine et expérimentale.

Concernant la Sm31, Ruppel *et al.* (1985a; 1985b) ont montré la présence d'anticorps dirigés contre cette protéine dans des sérums de patients bilharziens dès 40 jours après l'infection, et également dans des sérums d'infection de souris. Aucune réponse n'est observée dans les sérums de patients présentant d'autres infections parasitaires. Quant à la Sm32, elle est également fortement immunogénique; cependant, Zerda *et al.* (1987) ont montré qu'une vaccination par cercaires irradiées n'était pas suffisante pour induire chez des babouins une réponse anti-Sm32. En effet, cette réponse n'apparaît qu'après infection de ces babouins vaccinés, et elle semble plus faible que chez des animaux non préalablement vaccinés. D'autre part, une étude menée sur des sérums d'infection humaine a montré, pour 90% de ces sérums, une réaction avec l'"hémoglobine" (Sm32). De plus, les patients ayant subi un traitement chimiothérapeutique présentent, dans un premier temps (1 mois après traitement) une élévation du titre d'anticorps anti-Sm32 (concordant avec le relargage du contenu intestinal des vers lorsqu'ils meurent) puis, dans un second temps (plus de 12 mois après traitement, lorsque les patients ne présentent plus de signes d'infection) on assiste à une chute de ce titre (Toy *et al.*, 1987). L'ensemble de ces travaux indique non seulement l'immunogénicité des Sm31 et Sm32 mais confirme également leur utilisation potentielle en sérodiagnostic, la Sm32 pouvant, de plus, être un marqueur d'un traitement efficace.

L'étude de l'immunogénicité de l'élastase de cercaires a été initiée par les travaux de Pino-Heiss *et al.* (1986), montrant la réactivité d'un *pool* de sérums de patients bilharziens avec l'élastase purifiée. Par la suite, Toy *et al.* (1987) ont confirmé l'immunogénicité de cette protéase: une réponse anti-élastase, d'isotype IgG et IgM est observée dans des sérums de patients. De plus, une étude cinétique réalisée sur des singes infestés a montré que la réponse anti-élastase atteint son maximum 9 semaines après l'infestation et est essentiellement d'isotype IgM. Cependant, on note que cette réponse anti-élastase, que ce soit chez des patients ou dans des modèles animaux est relativement faible, comparée à celle observée pour les protéases Sm31 et Sm32. Modha *et al.* (1996) ont proposé deux hypothèses pouvant expliquer ce phénomène: chez le schistosome il existe un inhibiteur de protéase (Smpi56) (Ghendler *et al.*, 1994) dont une des cibles est l'élastase; il est donc possible que *in vivo*, l'élastase de cercaires soit complexée à cet inhibiteur, ce qui la rendrait invisible au système immunitaire. En effet, aucune production d'anticorps dirigés contre une élastase pancréatique n'est observée lorsqu'on injecte cette élastase complexée au Smpi56 (Ghendler *et al.*, 1994). D'autre part, un inhibiteur de l'hôte, l' α 1-anti trypsine, peut également participer à ce phénomène en complexant l'élastase, ce qui entraînerait une disparition rapide de ces

complexes par endocytose via les récepteurs pour l' α 1-anti trypsine (Modha & Doenhoff, 1994a).

L'immunogénicité d'une autre protéase de *S. mansoni* a été montrée récemment par les travaux de Jankovic *et al.* (1996): un clone Th1 (producteur d'IFN- γ et d'IL-2), purifié chez des souris immunisées avec du SWAP, s'est révélé spécifique de la calpaine. De plus, le transfert de ce clone confère une immunité protectrice.

3.2. Régulation de la réponse de l'hôte par les protéases de *S. mansoni*

Chez les microorganismes, les protéases sont souvent impliquées dans des phénomènes de régulation ou modulation des réponses immune et inflammatoire (cf. § 2.3.2). Des protéases de *S. mansoni* ont également été impliquées dans de tels phénomènes, même s'il est souvent difficile, d'une part d'associer précisément ces observations à l'une ou l'autre des protéases décrites auparavant (§ 3.1) et, d'autre part, d'évaluer l'importance de ces mécanismes pour le parasite. Toutefois, dans ce paragraphe, les différents exemples de régulation par les protéases de *S. mansoni* sont regroupés selon que les conséquences de leur action semble bénéfique ou néfaste pour le parasite.

3.2.1. Rôles des protéases bénéfiques pour le parasite

Un premier aspect de l'intervention de protéases parasitaires sur la réponse de l'hôte a été montré par les travaux de Claude Auriault et ses collaborateurs dans les années 1980 (Auriault *et al.*, 1980; 1981a; 1981b): les protéases du schistosome sont capables de cliver les IgG de l'hôte fixées par leur fragment Fc à la surface des schistosomules. De plus, les peptides libérés par ce clivage possèdent la capacité à inhiber *in vitro*, non seulement l'activité anti-schistosome des macrophages, mais également l'activité phagocytaire non spécifique de ces cellules. Cette action est observée uniquement lorsque le clivage des IgG est réalisé par les protéases parasitaires. Par la suite, un peptide (TKP) capable de reproduire l'effet inhibiteur des différentes activités macrophagiques a été caractérisé (Auriault *et al.*, 1983a; 1985). L'ensemble de ces travaux suggèrent que le parasite peut non seulement détourner la réponse immune de l'hôte en dégradant une composante essentielle de celle-ci, mais également utiliser à son profit les produits de cette dégradation.

Par ailleurs, les protéases de *S. mansoni* semblent également impliquées dans la régulation du complément, autre composante de la réponse immune de l'hôte. En effet, Marikovsky *et al.* (1988a) ont montré que la sérine protéase de 28kDa, caractérisée chez les schistosomules, pouvait dégrader les composants C3 et C3b du complément. De plus, cette protéase, ainsi que la 60kDa caractérisée par les mêmes auteurs, sont impliquées dans la perte du glycocalyx; elles clivent donc des molécules de surface du schistosomule qui sont susceptibles d'activer le complément. Ainsi, alors que les cercaires et les schistosomules nouvellement transformés sont sensibles à l'action du complément, ils y deviennent rapidement résistants (Marikovsky *et al.*, 1988b).

L'interaction des protéases de *S. mansoni* avec des inhibiteurs de l'hôte peut également apparaître comme un moyen pour le parasite d'échapper à la réponse de l'hôte. Il a en effet été montré par plusieurs auteurs que *S. mansoni* interagit avec des inhibiteurs de sérine protéases (serpines) de l'hôte (Damian *et al.*, 1973; Modha *et al.*, 1988; Modha & Doenhoff, 1994a). Les protéases impliquées dans cette interaction deviennent alors non immunogéniques: ainsi l'injection de trypsine complexée à la contrapsine (serpine de souris) n'induit pas la production d'anticorps dirigés contre la trypsine (Modha & Doenhoff, 1994b). On peut supposer que, comme dans le cas des protéases bactériennes, ces complexes sont alors éliminés rapidement de la circulation via des récepteurs pour l'inhibiteur (Perlmutter *et al.*, 1990). Un autre exemple de la formation de tels complexes concerne l'élastase (Modha et Doenhoff, 1994b) et a déjà été décrit comme pouvant expliquer la faible immunogénicité de cette protéase au paragraphe 2.1.5.. En outre, le schistosome synthétise lui-même un inhibiteur de sérine protéases, le Smpi56, dont la cible est soit la 28kDa caractérisée chez les schistosomules, soit l'élastase (Ghendler *et al.*, 1994). Cet inhibiteur pourrait également intervenir dans une régulation non spécifique de la réponse immune car il peut inhiber *in vitro* l'élastase de neutrophiles.

3.2.2. Rôles des protéases néfastes pour le parasite

Parallèlement aux phénomènes de régulation ou échappement à la réponse immune décrits précédemment, il semble que les protéases parasitaires soient capables d'augmenter cette réponse immune. En effet, en 1982 Auriault *et al.* (1982b) ont montré que les produits relargués par le schistosomule (SRP pour "Schistosomula Released Products") possèdent la capacité à augmenter l'activité des éosinophiles humaines et de rat. Plus particulièrement, ces

auteurs ont observé l'augmentation de la cytotoxicité des éosinophiles dépendante d'anticorps vis-à-vis des schistosomules, ainsi que l'augmentation de l'expression des récepteurs Fc. Par la suite, les facteurs responsables de cette action ont été identifiés à des protéases, une activité collagénase semblant être impliquée (Auriault *et al.*, 1983b).

Le même type de démarche a également permis d'impliquer les sérines protéases de *S. mansoni* dans l'augmentation de la réponse IgE chez le rat: dans un premier temps, Auriault *et al.* (1984) ont montré que l'injection de SRP à des rats induisait la production d'une réponse IgE cytotoxique importante. Par la suite, le rôle des sérine protéases a été suggéré par les travaux de Verwaerde *et al.* (1986), montrant qu'une réponse IgE spécifique était augmentée *in vivo* par la co-injection de SRP, et inhibée en présence d'inhibiteurs spécifiques des sérine protéases. La caractérisation moléculaire des protéases impliquées a été réalisée et a permis d'identifier deux sérines protéases dans le SRP: une majeure de 27,5kDa et une mineure de 29kDa, toutes deux également présentes à la surface des larves de *S. mansoni* (Verwaerde *et al.*, 1988).

CADRE ET OBJECTIFS

La schistosomiase ou bilharziose est une maladie parasitaire chronique et débilitante, dont la prévalence mondiale atteint plus de 200 millions d'individus. Cette parasitose est due à une infection par un trématode: le schistosome. L'une des espèces de schistosome pathogène pour l'homme est *Schistosoma mansoni*, auquel est associée une pathologie hépatosplénique. L'étude des mécanismes effecteurs de l'immunité à la schistosomiase a montré le rôle non seulement de mécanismes anticorps-dépendants, (notamment chez l'homme et le rat), mais aussi de la réponse cellulaire T (homme et souris). La lutte contre la schistosomiase doit donc passer par l'identification d'antigènes protecteurs mais aussi par la caractérisation de molécules capables de moduler la réponse immune. De plus, l'amélioration des connaissances sur le parasite responsable doit permettre de cibler plus précisément cette lutte; ainsi, il semble important de mieux comprendre les mécanismes d'échappement à la réponse immune mis en place par le parasite ainsi que le mode de contrôle de l'expression des gènes codant notamment pour des molécules clés pour le parasite.

Dans ce contexte, l'étude des protéases de *S. mansoni* trouve tout son intérêt. En effet, de nombreux travaux ont permis de montrer le rôle fondamental de ces molécules dans la survie du parasite: elles interviennent dans la digestion de la peau de l'hôte afin de faciliter la pénétration des cercaires; les schistosomules, et les schistosomes sont également aidés dans leur migration puis leur nutrition par des protéases capables de dégrader, pour certaines des macromolécules tissulaires de l'hôte, ou pour d'autres, l'hémoglobine. Enfin, les protéases sont impliquées dans l'extravasation et l'éclosion des oeufs, permettant la libération du miracidium. On note que la participation des protéases dans l'invasion et la migration de *S. mansoni* suppose que ces enzymes, en l'occurrence des sérine protéases, soient sécrétées, ce qui fait de ces molécules des cibles potentielles pour le système immunitaire de l'hôte.

Outre cette activité protéolytique propre, les protéases présentent un intérêt significatif dans la réponse immune. En effet, elles participent aux phénomènes d'échappement à la réponse immune mis en oeuvre par le parasite, en détruisant les immunoglobulines d'isotype IgG fixées à la surface des larves (Auriault *et al.*, 1981a) ou en intervenant dans la résistance

au complément (Marikovsky *et al.*, 1988b). De plus, l'interaction des protéases de *S. mansoni* avec un inhibiteur de protéase de l'hôte peut également constituer un mécanisme d'échappement.

Cependant, les protéases semblent être également impliquées dans une modulation de la réponse immune de l'hôte en sa faveur. Ainsi, il a été montré dans le laboratoire (Verwaerde *et al.*, 1986, 1988) que la régulation de la synthèse des immunoglobulines d'isotype IgE *in vitro* et *in vivo* dépendait de la présence de l'activité sérine protéase. Deux molécules de 27,5 kDa et 29 kDa ont été identifiées dans les produits relargués par le schistosomule (SRP) comme étant responsables de cet effet. Or une réponse anticorps IgE est considérée comme composante essentielle de la défense de l'hôte lors d'une parasitose à *S. mansoni*.

Dans tous ces phénomènes on note plus particulièrement le rôle de protéases de la famille des sérines protéases, présentant outre les aspects décrits précédemment, la caractéristique d'être spécifiques des stades larvaires du parasite, ce qui suppose une régulation étroite de leur expression.

Pour ces différentes raisons, notre laboratoire s'intéresse à la caractérisation des sérine protéases de *S. mansoni*. Différentes stratégies ont été envisagées: d'une part la caractérisation de nouvelles sérine protéases chez ce parasite (Cocude *et al.*, sous presse) et, d'autre part, l'étude de l'implication de sérines protéases déjà décrites dans les différentes fonctions citées ci-dessus. Aussi, dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'élastase de cercaires, et ceci fait l'objet de notre travail.

Cette protéase a été décrite chez la cercaire, forme larvaire infestante de l'hôte définitif. Il s'agit d'une sérine protéase de 30 kDa, sécrétée, qui agit en dégradant notamment l'élastine contenue dans la peau, assurant ainsi la pénétration des cercaires. Cette molécule intervient donc à une étape cruciale du cycle parasitaire, et semble être un candidat de choix dans le cadre d'une stratégie de chimio- ou immunothérapie. Ainsi, Cohen *et al.* (1991) ont montré qu'un inhibiteur synthétique spécifique du site actif de l'élastase peut bloquer la pénétration des cercaires dans la peau. De plus, Newport *et al.* (1988b) ont cloné l'ADNc codant pour cette élastase, et une étude en Northern blot indique que cette protéase semble être stade

spécifique. L'élastase peut donc constituer un modèle d'étude du contrôle de l'expression des gènes chez *S. mansoni*. Enfin, il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure cette sérine protéase pourrait être impliquée dans des phénomènes d'immuno-modulation tels que ceux décrits par Verwaerde *et al.* (1986; 1988).

La première partie de ce travail concerne donc l'étude de la régulation de l'expression de la protéine native au cours du développement du parasite, aux niveaux ARNm et expression de la protéine. Dans un second temps, nous étudierons le gène de l'élastase afin de caractériser d'éventuelles régions impliquées dans cette régulation de l'expression. Enfin, dans une troisième partie, nous explorerons le potentiel de l'élastase en tant que cible du système immunitaire ainsi que son éventuelle capacité à moduler la réponse immune en faveur de l'hôte.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Parasites

Une souche Porto Ricaine de *Schistosoma mansoni* est maintenue dans les mollusques *Biomphalaria glabrata* en tant que hôte intermédiaire, et dans des hamsters dorés en tant que hôte définitif. Les oeufs sont récupérés à partir des foies de hamsters infectés. Les cercaires sont obtenues à partir de mollusques infectés et concentrées sur glace. Les schistosomules sont obtenus par transformation mécanique (Ramalho-Pinto *et al.*, 1974) et maintenus en culture de 3 à 18h en milieu MEM contenant de la gentamycine (8µg/ml) à 37°C en présence de CO₂ (5%). Les vers adultes sont préparés par perfusion hépato-portale de hamsters infectés, 40 jours après l'infection d'épreuve par des cercaires, puis lavés en milieu MEM (Minimal Eagle's Medium) à 37°C.

Pour les expériences d'infestation expérimentale, les cercaires proviennent de la souche Guadeloupe de *S. mansoni* (fournie par le Prof. Jourdane, Université de Perpignan).

1.2. Souches bactériennes et cellulaires

Bactéries: JM 109: E.coli e14⁻ (mcrA), rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17 (r_k⁻, m_k⁺), sup E44, rel A1 Δ(lac-pro AB), [F' tra D36, pro AB, lac I^q ZΔM15].

M15 [pREP4]: Na^r Str^r Rif^r lac- ara- gal- mtl- f- recA+ uvr+.

P2392: e14⁻ (mcrA), hsdR514, supE44, supF58, LacY1 ou Δ(lacIZY)6, gal T22, metB1, trpR55, P2 lysogen.

Cellules: Cos-1 (ATCC CRL-1650): cellules de rein de singe vert d'Afrique, transformée avec le virus SV40 muté.

1.3. Vecteurs

1.3.1. Vecteurs phagiques

M13mp18 (Norrande *et al.*, 1983)

λ EMBL3 *sbhI* λ 1° *b*189 (polycloning site *int*29 *nin*L44 *trpE* polycloning site) KH54
chiC srI λ 4° *nin*5 *srI* λ 5°

1.3.2. Vecteurs d'expression

Plusieurs vecteurs ont été utilisés dans le but d'exprimer une élastase recombinante en système procaryote. Chacun de ces vecteurs possède des caractéristiques propres, mais présentent tous l'avantage de disposer d'un système de purification de la protéine d'intérêt. Les vecteurs utilisés sont regroupés dans le tableau suivant:

TABLEAU VIII: Caractéristiques des vecteurs utilisés pour exprimer l'élastase recombinante.

nom (fournisseur)	Souche <i>E. coli</i>	Résistance antibiotique	induction	Système de purification
pGEX-2T (Pharmacia)	JM109	Ampicilline	IPTG (0,1mM)	- protéine fusionnée avec la Sj26GST - purification sur glutathion - clivage par la Thrombine
pMalC (Biolabs)	TB1	Ampicilline	IPTG (0,3mM)	- protéine fusionnée avec une Maltose Binding Protein - purification sur amylose - clivage par le facteur Xa
pGEX-4T3 (Pharmacia)	JM109	Ampicilline	IPTG (0,1mM)	- protéine fusionnée avec la Sj26GST - purification sur glutathion - clivage par la Thrombine
pQE-30 (Qiagen)	M15	Ampicilline	IPTG (0,5mM)	- protéine fusionnée 6xHis - purification sur Ni²⁺
pET-32a (Novagen)	JM109	Ampicilline	IPTG (0,4mM)	- protéine fusionnée 6xHis et à la Thioredoxine - purification sur Ni²⁺ - clivage par la Thrombine

En ce qui concerne l'expression en cellules de mammifères, le vecteur pRc-CMV (Invitrogen, USA) a été utilisé. Ce vecteur possède le promoteur du cytomegalovirus humain (CMV) et l'origine SV40 de réplication épisomale.

1.3.3. Vecteurs utilisés pour le sous-clonage des fragments à séquencer

PCRTMII (TA Cloning, Invitrogen): certains fragments obtenus par PCR ont été directement sous-clonés dans le vecteur dans le but d'être séquencés.

PUC18-*Eco* RI (Pharmacia, Suède): ce vecteur digéré par *Eco* RI a été utilisé pour le sous-clonage d'inserts obtenus par PCR, lorsque celles-ci ont été réalisées avec des amorces synthétiques dans lesquelles le site *Eco* RI a été introduit.

1.4. Animaux

lapins: néo-zélandais

rats: Fischer ou LouM (6 semaines)

souris: Balb/c

1.5. Tampons, solutions et milieux

voir annexe

2.Méthodes

2.1.Régulation de l'expression de l'élastase de *S. mansoni*

2.1.1. Expression de l'élastase recombinante

2.1.1.1.RT-PCR

Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir de 10µg d'ARN total de ver adulte en présence de Reverse transcriptase Mu-MLV (kit Superscript II, Gibco) et d'oligo(dT) 1h à 37°C dans un volume final de 25µl. Une expérience de PCR est alors menée sur 1µl de cette matrice à l'aide d'oligonucléotides synthétiques spécifiques, dont la séquence est déduite de celle de l'élastase sous forme préproenzyme (amorce SP1) ou sous forme mature (amorce SP5) (Newport *et al.*, 1988b).

sens: 5'-TGGTGGATCCATGTCGAACCGATGGAGG-3' (SP1)

5'-ACCGGATCCATACGTAAGTGGTGGACCT-3' (SP5)

antisens: 5'-GAGACCCGGGGTTCAAATATTGGAGCGTAC-3' (SP2)

Afin d'orienter les clonages en vecteur d'expression, des sites de restriction correspondant aux enzymes *Bam* HI (5') et *Sma* I (3') ont été insérés dans les séquences des oligonucléotides (souligné).

La réaction de PCR se décompose en 35 cycles chacun comprenant une étape de dénaturation 1 min à 94°C, l'hybridation des amorces 1min à 55°C et une étape d'élongation 1,5 min à 72°C.

2.1.1.2.Clonage en vecteur d'expression

Les produits obtenus en RT-PCR ont été séquencés (cf § 2.2.2) puis digérés par les enzymes de restriction choisies. Les clonages sont réalisés par incubation du vecteur, préalablement digéré par les même enzymes, avec l'un ou l'autre insert (rapport molaire vecteur/insert = 1/5) une nuit à 14°C en présence de T4 DNA ligase. Une transformation bactérienne est réalisée selon la méthode décrite par Hanahan (1983), la sélection des

bactéries ayant incorporé le plasmide recombinant se faisant grâce à la résistance à l'ampicilline apportée par le vecteur, et par digestion enzymatique spécifique de mini-préparations plasmidiques (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.1.3. Traduction *in vitro*

L'ADNc correspondant à l'élastase sous forme préproenzyme a été cloné en vecteur Blue Script SK- (technique ci-dessus) afin de réaliser une expérience de traduction *in vitro*, dans le but de vérifier la possibilité de l'ADNc à être effectivement traduit. Pour cela, le kit TNT™ Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) a été utilisé. Brièvement, 1,5µg de plasmide Blue Script recombinant est incubé 1h30 à 37°C en présence de lysat de réticulocyte, d'acides aminés sans méthionine, de méthionine marquée au ³⁵S, et de T3 polymérase. Un contrôle est réalisé en utilisant la T7 polymérase. Le produit est analysé sur SDS-PAGE 13% (Laemmli, 1979). Après amplification du signal (Amplify, Amersham) et fixation, le gel est séché sous vide puis exposé une nuit à -80°C.

2.1.1.4. Production et purification de la protéine recombinante

Plusieurs vecteurs ont été utilisés afin d'exprimer une élastase recombinante (cf Tableau IX p.90). Pour chacun de ces vecteurs le protocole de production utilisé est celui décrit par les fournisseurs respectifs. Dans le cas du vecteur pQE30, l'expression et la purification de la protéine ont été réalisées selon le protocole du QIAexpress™ system (Qiagen). La protéine a été exprimée dans la souche M15 d'*Escherichia coli* maintenue en milieu LB contenant 100µg/ml d'ampicilline et 25µg/ml de kanamycine. La protéine purifiée sur colonne de Nickel (Ni-NTA resin, Qiagen) a ensuite subi des dialyses en séries contre du tampon Tris pH8,5 en présence de SDS à 0,02% et de concentrations décroissantes d'urée. Le degré de pureté est vérifié sur gel SDS-PAGE 13% (Laemmli, 1979). Un dosage de protéine (BCA protein assay, Pierce) permet de déterminer le rendement en protéine recombinante. Ce rendement est de 5mg de protéine par litre de culture (DO 600nm = 0,6).

2.1.1.5. Détermination de l'activité enzymatique de la protéine recombinante

L'activité de la protéine recombinante est évaluée en terme de dégradation de différents substrats.

2.1.1.5.1. Caséine

20µg de protéine recombinante sont incubés 3h à 37°C en présence de 200µl d'une solution contenant 1% de caséine (Calbiochem) en tampon 0,1M Tris-HCl pH8, CaCl₂ 0,5mM. Après ajout de 1ml d'acide trichloro acétique 10%, les tubes sont conservés une nuit à 4°C. La dégradation de la caséine est observée par mesure de l'absorbance à 280nm du surnageant.

2.1.1.5.2. Azocoll

20µg de protéine recombinante sont incubés à 37°C en présence de 5mg d'Azocoll (Sigma) en tampon Glycine 100mM, NaOH pH9,2 + CaCl₂ 2mM (volume final = 1ml). La mesure de l'absorbance à 540nm du surnageant à différents temps d'incubation (1h à une nuit) permet d'évaluer la dégradation du substrat.

2.1.2. Production du sérum α-élastase

Un lapin Néo-Zélandais a été immunisé par injection de 350µg d'élastase recombinante selon la technique décrite par Vaitukaitis *et al.* (1971), en présence d'adjuvant complet de Freund. Un rappel est réalisé 3 semaines après, par injection sous-claviculaire de 200µg d'élastase en présence d'adjuvant incomplet de Freund. Le sérum est collecté 15 jours après, et sa spécificité testée en western blot (cf. § 2.1.3.2.2.).

2.1.3. Etude de la régulation de l'expression de l'élastase au cours du développement

2.1.3.1. Au niveau de l'ARN

2.1.3.1.1. Extraction de l'ARN aux différents stades

L'ARN total d'oeufs, cercaires et vers adultes est préparé selon la technique de Chirgwin *et al.* (1978) à l'aide d'une solution d'isothiocyanate de guanidium 4M; la purification est réalisée sur gradient de chlorure de césium. L'ARN est ensuite précipité avec de l'éthanol 100% en présence d'acétate de sodium, resuspendu dans de l'eau, quantifié par mesure de l'absorbance à 260nm puis conservé à -20°C.

2.1.3.1.2. RT-PCR

Des expériences de RT-PCR sont réalisées selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.1.1. sur 10µg d'ARN total d'oeufs, cercaires et vers adultes. Les amorces utilisées pour l'étape de PCR sont les oligonucléotides SP1 et SP2 décrits précédemment et présentés dans le Tableau IX. Les témoins de PCR ont été réalisés en utilisant l'oligonucléotide SP1 seul et parallèlement l'oligonucléotide SP2 seul; un contrôle ne contenant pas de matrice est également réalisé.

2.1.3.1.3. RT-PCR semi-quantitative

Cette technique permet une évaluation quantitative de la présence de l'ARNm. Pour cela, une RT-PCR est menée sur une quantité définie d'ARNm, l'étape de PCR étant réalisée dans des conditions particulières. En effet, lors d'une PCR, l'amplification de l'ADNc est linéaire, puis au bout d'un certain nombre de cycles, atteint un plateau (conditions saturantes). Afin de quantifier, il est donc indispensable de se situer avant cet effet plateau. Nous avons donc réalisé une PCR sur le premier brin d'ADNc de cercaires et vers adultes avec les amorces internes SP3 et SP4 (cf. Tableau IX p.90). Les tubes ont été prélevés après 15, 20, 25 et 30 cycles (chaque cycle comprend les étapes: 1 min à 94°C, 1 min à 50°C, 1 min à 72°C). La comparaison des signaux obtenus aux deux stades étudiés après le même nombre de cycle, permet d'évaluer les quantités relatives du transcrit de l'élastase.

2.1.3.2. Au niveau protéique

2.1.3.2.1. Préparations antigéniques

Les antigènes des différents stades ont été préparés pour la réalisation d'expériences de western blot et ELISA. Les oeufs sont au préalable broyés en une fine poudre dans de l'azote liquide, puis cette poudre est traitée de la même façon que les autres stades: les parasites sont homogénéisés dans du PBS additionné de PMSF 0,5mM et EDTA 1mM. L'homogénat est soniqué 6 fois 30s (sonicateur labsonic U, B.Braun, industries Vasse) et centrifugé 2 fois 10min à 10 000g à 4°C. Les surnageants sont récupérés et utilisés comme préparations antigéniques. Un dosage est réalisé afin d'évaluer leur contenu en protéines (BCA protein assay, Pierce, USA). Ces préparations sont conservées à -80°C. Les milieux de culture des schistosomules, contenant les produits relargués par ceux-ci (SRP), sont également conservés à -80°C.

2.1.3.2.2. Western blot

Les préparations antigéniques sont séparées sur SDS-PAGE 13% et transférées sur filtres de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Allemagne) pendant 3 heures à 60V, en tampon de transfert (annexe), (Towbin *et al.*, 1979). Les sites de fixation non spécifiques sont saturés en PBS-lait 5% 2h à température ambiante puis les filtres sont incubés une nuit à 4°C avec le sérum dilué au 1:100 en PBS-lait 5%. Après 3 lavages en PBS-Tween-20 0,4% les filtres sont incubés en présence d'un conjugué anti-IgG de lapin (Sanofi-Pasteur, France) marqué à la peroxydase (1:500) pendant 2 heures à température ambiante. Après trois lavages en PBS Tween-20 0,4%, la révélation s'effectue avec le substrat de la Horse Radish Peroxydase (4-chloro-1-naphtol, BIO-RAD) en présence d'eau oxygénée. La réaction est arrêtée avec de l'eau.

2.1.3.2.3. Test ELISA en immunocapture

Les IgG anti-élastase sont purifiées à partir du sérum total de lapin sur colonne de protéine-A sépharose (Pharmacia, Suède). 1µg de ces IgG purifiées est marqué à la biotine selon la procédure du fournisseur (Calbiochem). Des plaques 96 puits de microtitration (Immulon III, Dynatech Laboratories, USA) sont sensibilisées 3h à 37°C avec 100µl/puits d'IgG purifiées à 10µg/ml en PBS. Après 3 lavages en PBS-Tween-20 0,1% les plaques sont saturées 1h à température ambiante avec 200µl/puits de PBS-gélatine 0,5%. 100µl/puits de dilutions sérielles des préparations antigéniques ou d'élastase recombinante (en PBS-Tween-20 0,1%) sont ajoutés et incubés une nuit à 4°C. Les plaques sont lavées de nouveau puis incubées 1h30 à 37°C en présence de 100µl/puits d'IgG α -élastase marquées à la biotine diluées au 1:2500 en PBS-Tween-20 0,1%, puis 30 min à 37°C en présence de 100µl/puits de streptavidine marquée à la peroxydase (1:2500) (Amersham, France). Après 5 derniers lavages, le substrat (ortho-phenylenediamine, Sigma) dilué à 1mg/ml en tampon Phosphate de sodium 0,1M pH5,5, contenant 0,03% d'eau oxygénée est ajouté et incubé à l'obscurité 30min à 37°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 100µl/puits d'HCl 2N et la densité optique est mesurée à 492nm. Les résultats sont exprimés en ng d'élastase par mg de protéines totales.

2.1.4. Immunolocalisation

La localisation de l'élastase a été étudiée chez des schistosomules durant une infestation d'épreuve de souris. Les schistosomules ont été obtenus en plaçant une goutte

d'eau contenant des cercaires sur la peau rasée de l'abdomen de souris, préalablement endormies avec du pentobarbital. Après une heure, la peau est excisée, coupée en petits morceaux, puis fixée dans du PBS pH 7,4 contenant 4% de paraformaldéhyde, déshydratée et incluse dans de la paraffine. Les morceaux de peau déparaffinés, coupés en sections d'épaisseur 3µm sont réhydratés et incubés 30min dans une solution de 0,5% d'ovalbumine (OVA) en tampon TBS (Tris 20mM, NaCl 0,5M pH 7,4) contenant 5% de sérum de chèvre décomplémenté. Ceci est suivi par une incubation une nuit à 4°C avec le sérum de lapin anti-élastase dilué (1:1000) en TBS-0,5% OVA. Après deux lavages de 15 min en TBS-0,5% OVA, le conjugué anti IgG de lapin marqué à la phosphatase alcaline (Sigma) est incubé 1h à température ambiante. Après de nouveaux lavages, la réaction enzymatique est révélée à l'aide du substrat New Fuschin (Dako, Danemark), et une contre-coloration est réalisée avec l'haematoxyline de Harris. Les contrôles sont réalisés en remplaçant le sérum anti-élastase par un sérum pré-immun à la même dilution.

2.2. Etude du gène de l'élastase

2.2.1. Isolation d'un clone génomique

2.2.1.1. Criblage de la banque λEMBL3

2.2.1.1.1. Préparation des cellules P2392 compétentes

Les cellules sont mises en culture à 37°C sur la nuit dans 15ml de NZY. Le lendemain, cette culture est diluée au 1:60 dans 15ml de NZY additionné de MgSO₄ 10mM. La culture est remise sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO de 0,5 à 600nm. Après centrifugation, le culot est repris dans 4ml de MgSO₄ 10mM et remis en culture une heure à 37°C, temps au bout duquel les cellules sont compétentes. Lors de leur utilisation, celles-ci seront diluées au 1:5 dans du MgSO₄ 10mM.

2.2.1.1.2. Criblage

La banque génomique de *S. mansoni* réalisée en phage λEMBL3 (Dr. K. Zemzoumi) est étalée à confluence sur boîtes de pétri (milieu NZY + TOP NZY). Lorsque les plages de lyse atteignent environ 1mm de diamètre les empreintes sont prises. Pour cela, des membranes de nitrocellulose (Millipore) sont placées quelques minutes sur les boîtes, puis

ces membranes sont incubées 2 min en tampon de dénaturation (NaCl 1,5M, NaOH 0,5M), 5 min en tampon de neutralisation (Tris 0,5M pH7,5, NaCl 1,5M) et 30 secondes en tampon de rinçage (Tris 0,2M, pH7,5, 2xSSC). Les membranes sont ensuite fixées 2h à 80°C. L'hybridation avec la sonde (ADNc de l'élastase obtenu par PCR) marquée à la peroxydase selon le protocole décrit par le fournisseur (kit ECL Labelling system, Amersham) permet d'identifier les plages positives.

Chaque plage de lyse positive est ensuite repiquée et reprise dans 1ml de SM contenant 10µl de chloroforme. De nouvelles dilutions sont réalisées en vue d'obtenir 100% de plages positives, ce qui assure la pureté du clone génomique.

2.2.1.2. Préparation de l'ADN phagique

Le clone génomique purifié est réétalé à confluence sur plusieurs boîtes de pétri (NZY + TOP NZY) puis élué en présence de 5ml de milieu SM sous agitation douce une nuit à 4°C. Le milieu est alors centrifugé puis le surnageant est additionné de chloroforme 1%. Après action 30 min à 37°C de RNase et DNase à 1µg/ml chacune, l'ADN phagique est précipité 1heure sur glace avec un volume de PEG 20%, NaCl 2M (en SM). Le culot obtenu après centrifugation est élué en milieu SM et traité 15 min à 68°C en présence de SDS 0,05% et EDTA 2,5mM pH8. On effectue alors les extractions successives suivantes: phénol, phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1), puis chloroforme-alcool isoamylique (24:1). L'ADN est ensuite précipité à -20°C avec un volume d'isopropanol, en présence d'Acétate de sodium 0,3M pH5,2.

2.2.1.3. Southern blot et marquage non radioactif

Les produits de digestion de l'ADN phagique par différentes enzymes de restriction sont déposés sur gel d'agarose. Après migration le gel est traité 2 fois 20 min en tampon NaOH 0,5M, NaCl 1,5M, puis 30 min en tampon Tris 0,5M pH7,2, NaCl 1,5M. Un transfert par capillarité est ensuite effectué sur membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) dans un bain de 20xSSC. La membrane est fixée 2 heures à 80°C. Les sondes préalablement préparées par PCR à l'aide des oligonucléotides synthétiques internes puis purifiées sur gel d'agarose (Gene Clean, BIO 101), sont marquées à la peroxydase selon le protocole décrit par le fournisseur (kit ECL Labelling system, Amersham). La préhybridation, l'hybridation, les lavages et la révélation sont également réalisés selon ce protocole. Les membranes sont ensuite exposées quelques minutes sur film (X-OMAT AR, Kodak).

2.2.2. Séquençage

Les fragments d'ADN génomique sont sous-clonés (cf. § 2.1.1.2) soit en vecteur PUC18-*Eco RI* (cas des fragments provenant de la digestion de l'ADN phagique par *Eco RI*, ou de PCR avec des amorces pour lesquelles un site de restriction *Eco RI* a été inséré), soit dans le vecteur PCR TMII (TA Cloning, Invitrogen, USA) (cas des autres fragments PCR). La séquence et la position des oligonucléotides synthétiques utilisés pour le séquençage des gènes de l'élastase sont regroupées dans le tableau et la figure suivants:

TABLEAU IX: Séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés pour le séquençage des gènes de l'élastase de *S. mansoni*. Les oligonucléotides *SPB1* et *SPB2* sont spécifiques du gène *EL2*. En gras figurent les sites de restriction introduits.

nom	séquence	site de restriction	orientation
SP1	5'-TGG TGG ATC CAT GTC GAA CCG ATG GAG G-3'	<i>Bam</i> HI	sens
SP2	5'-GAG ACC CGG GGT TCA AAT ATT GGA GCG TAC-3'	<i>Sma</i> I	anti-sens
SP3	5'-ATT CGG GTT TCA TTT CTC-3'		sens
SP4	5'-CTG ACC TGC TTT CAC ACA-3'		anti-sens
SP5	5'-ACC GGA TCC ATA CGT AGT GGT GGA CCT-3'	<i>Bam</i> HI	sens
SP9	5'-TAT GGA ATT CAT GAT AAC GAC CGT GAT C-3'	<i>Eco</i> RI	sens
SP10	5'-ATG CGA ATT CGG CTA GAA TGT TGG A-3'	<i>Eco</i> RI	anti-sens
SPG I	5'-AGG CGA ATT CAT GGA CGT GGA TTG TTA A-3'	<i>Eco</i> RI	sens
SPG II	5'-GTT GGA ATT CTT TCA CTT TGT AGT CAT G-3'	<i>Eco</i> RI	anti-sens
SPG III	5'-GGT GGA ATT CGT CAC CAC CAC CAC AAA CCT-3'	<i>Eco</i> RI	anti-sens
SP i	5'-CAA AGA ATT CCT CAA ACA CAT TGA CCC C-3'	<i>Eco</i> RI	anti-sens
SPB1	5'-GGG GAC CAA CAA GGC-3'		sens
SPB2	5'-CGC GAC GGA TCA CGG-3'		anti-sens

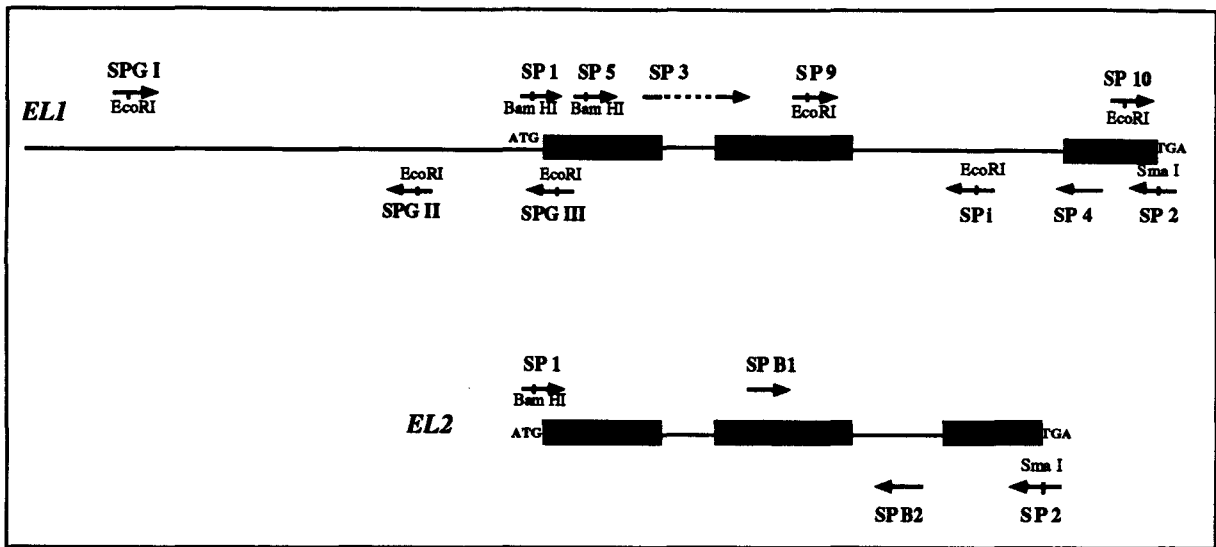


Figure 6: Position des oligonucléotides synthétiques utilisés pour le séquençage des gènes *EL1* et *EL2* de l'élastase de *S. mansoni*.

Après purification et amplification des vecteurs recombinants, les inserts sont séquencés par la méthode de Sanger (Autoread sequencing kit, Pharmacia) grâce au séquenceur automatique A.L.F. (Pharmacia). Les séquences obtenues sont analysées à l'aide du programme DNA Star.

2.2.3. Etude de l'ADN génomique

2.2.3.1. Préparation de l'ADN génomique de *S. mansoni*

L'ADN génomique de *S. mansoni* est préparé à partir du stade cercaire, forme larvaire isolée donc supposée non contaminée. Les cercaires sont broyées en une fine poudre dans de l'azote liquide. Cette poudre est ensuite traitée 3h à 37°C en tampon Tris 10mM pH7,5, EDTA 0,1M, SDS 0,5% additionné de protéinase K à 100µg/ml. Après addition de NaCl à 0,1M, on effectue les extractions successives suivantes: phénol, phénol-chloroforme, puis chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol 100%, traité un nuit à 37°C en Tris 10mM pH7,5, EDTA 1mM puis 30 min à 37°C en présence de RNase à 50µg/ml. Après une extraction au phénol-chloroforme, l'ADN est précipité puis resuspendu en Tris 10mM pH7,5, EDTA 1mM, et enfin quantifié par mesure de l'absorbance à 260nm et conservé à 4°C.

2.2.3.2. Southern blot et marquage radioactif au ^{32}P

Les produits de digestion de 3 μg d'ADN génomique par différentes enzymes de restriction sont déposés sur gel d'agarose puis transférés sur membrane Hybond N (Amersham). L'étape de transfert est réalisée comme décrit au paragraphe 2.2.1.3..

2.2.3.2.1. Marquage de la sonde au ^{32}P

Le marquage de la sonde correspondant à l'ADNc de l'élastase a été réalisé suivant le protocole du kit Megaprime (MegaprimeTM DNA labelling systems, Amersham), par du ^{32}P ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP). Le fragment (40ng) est marqué avec 50 μCi selon la méthode du "multi-amorçages au hasard". La sonde est ensuite purifiée sur colonne (SephadexTMG50 spin columns, Pharmacia) afin d'éliminer les nucléotides marqués non incorporés.

2.2.3.2.2. Hybridation des membranes

Les membranes de nylon sont placées dans un tampon de préhybridation (5xSSC, Denhardt's 5x, ADN de sperme de Hareng 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SDS 0,5%) à 65°C pendant 1h30. Puis, elles sont hybridées, à 65°C dans un tampon d'hybridation de même composition additionnée de la sonde marquée. Après incubation une nuit, les membranes sont lavées à 37°C dans du 0,1xSSC, 0,1%SDS pendant 20 minutes et deux fois 20 minutes à 65°C dans du 0,1xSSC, 0,1%SDS. Ces lavages en conditions stringentes permettent d'éliminer l'hybridation non spécifique. Les membranes sont ensuite exposées sur film Kodak (filmX-OMAT AR, Kodak) à -80°C pendant une nuit ou plus.

2.2.3.3. PCR

Des expériences de PCR (35 cycles comprenant les étapes suivantes: 1min à 94°C, 1min à 55°C, 1min45 à 72°C) ont été menées sur 100ng d'ADN génomique de *S.mansoni* avec les oligonucléotides SP1 et SP2 (Tableau IX p.90). Les fragments obtenus ont été clonés en vecteur PCRTMII et séquencés.

2.3.L'élastase de *S. mansoni*: cible et/ou immuno-modulateur

2.3.1. Etude de l'élastase en tant que cible du système immunitaire

2.3.1.1.Cytotoxicité macrophage-dépendante

Cinq rats LOU ont été immunisés avec l'élastase recombinante (30µg/rat) selon la technique de Vaitukaitis *et al.* (1971), et les sérums ont été collectés 4 semaines après, par ponction rétro-orbitale. La spécificité de ces sérums a été vérifiée en western blot à l'aide d'un conjugué anti-IgG de rat (Sigma, USA) (1:500) (cf. § 2.1.3.2.2.).

Des macrophages péritonéaux de rats LOU non-immuns sont purifiés par élimination des cellules non-adhérentes après 2h de culture. Les macrophages sont incubés une nuit à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ en milieu MEM contenant 20% de sérum de rat sain. Les cellules sont alors activées 4h en présence des sérums de rat α -élastase dilués au 1:10 dans le milieu de culture. Des schistosomules "peau" sont préparés selon la technique de Clegg *et al.* (1972); ils correspondent au résultat du passage naturel de cercaires à travers un fragment de peau rasée prélevée sur l'abdomen de souris. 70 de ces schistosomules, contenus dans 50µl sont alors ajoutés aux cellules; la mortalité des schistosomules est mesurée 24h après, par examen microscopique (les schistosomules morts sont immobiles et d'une apparence opaque et granuleuse).

2.3.1.2.Analyse du profil isotypique des sérums de rats α -élastase par ELISA

Des plaques 96 puits de microtitration (Immulon III, Dynatech Laboratories) sont sensibilisées une nuit à 4°C avec 50µl/puits d'élastase recombinante diluée à 10µg/ml en PBS. Après 3 lavages en PBS-Tween-20 0,1% les plaques sont saturées 1h à température ambiante avec 100µl/puits de PBS-gélatine 0,5%. 50µl/puits de dilutions sérielles des sérums de rats (en PBS-Tween-20 0,1%) sont ajoutés et incubés 3h à 37°C. Les plaques sont lavées de nouveau puis incubées 1h30 à 37°C en présence de 50µl/puits d'anti-IgG2a (1:8000) ou anti-IgG2c (1:4000) de rat marqué à la peroxydase (Cimex, Louvain). La réaction colorimétrique et la mesure de densité optique sont réalisées comme décrit dans le § 2.1.3.2.3.

2.3.1.3. Etude de la protection conférée par transfert passif d'IgG α -élastase

2.3.1.3.1. Purification des IgG

Les IgG de lapin α -élastase et de lapin sain sont purifiées à partir des sérums à l'aide d'acide caprylique: pour un volume de sérum sont ajoutés deux volumes d'acétate de sodium 60mM pH4,0. Sous agitation permanente on ajoute ensuite goutte à goutte 0,075 volumes d'acide caprylique. 30 min après, une centrifugation à 5000g pendant 10 min permet de récupérer le surnageant. Ce surnageant contient les IgG qui sont ensuite dialysées contre du PBS puis concentrées et purifiées par une précipitation au sulfate d'ammonium. La pureté des préparations ainsi obtenues est vérifiée en terme de capacité de fixation à la protéine-A sépharose (Pharmacia). La qualité des IgG α -élastase est vérifiée par un test ELISA direct contre l'élastase recombinante (cf § 2.3.2.). Le rendement moyen de purification des IgG est de 1mg/ml de sérum.

2.3.1.3.2. Transfert passif

On administre par voie intra-veineuse 2mg par rat d'IgG α -élastase purifiées. Une heure après, on réalise une infestation d'épreuve. Les contrôles sont réalisés en deux groupes: un groupe reçoit 2 mg/rat d'IgG purifiées à partir du sérum de lapin pré-immun, un second groupe témoin ne reçoit que du PBS. Les injections et infestations de ces deux groupes sont effectuées de la même façon que pour le premier groupe. 48h après l'infestation une seconde administration d'IgG est effectuée en i.v. à raison de 1mg/rat d'IgG.

2.3.1.3.3. Infestation expérimentale et perfusion

Les animaux, préalablement traités au Valium et endormis à l'Imalgène, sont infestés par voie transcutanée selon la technique des anneaux (Smithers & Terry, 1965) à raison de 1000 cercaires de la souche Guadeloupe par rat. Les rats sont perfusés en foies isolés 21 jours après l'infestation, et les vers sont comptés par examen microscopique.

2.3.1.4. Vaccination génique

2.3.1.4.1. Construction des plasmides recombinants

Deux constructions ont été réalisées en vecteur pRc-CMV: l'une correspond au clonage de l'ADNc de l'élastase entier (codant pour la préproenzyme) et est nommée pRc-

CMV-EL, l'autre correspond au clonage de l'ADNc codant pour l'élastase mature (nommée pRc-CMV-ELm). L'ADNc codant pour la préproenzyme a été obtenu par digestion enzymatique (*Not* I - *Apa* I) du plasmide recombinant BlueScript dont la fonctionnalité a été testée lors d'une expérience de transcription-traduction *in vitro* (cf. § 2.1.1.). L'ADNc correspondant à l'élastase mature a été obtenu par amplification par PCR de ce même plasmide recombinant avec les oligonucléotides synthétiques suivants, dans la séquence desquels ont été introduits les sites de restriction *Not* I (SP15) et *Apa* I (SP16). Le codon d'initiation ATG a également été introduit dans la séquence SP15.

sens 5'-GTGTGCGGCCGCATGATACGTAGTGGTGAACCT-3' (SP15)

anti-sens 5'-GAGAGGGGCCCGTTCAAATATTGGAGCGTAC-3' (SP16)

Les clonages ont été réalisés selon le protocole décrit au § 2.1.1.2..

2.3.1.4.2. Expression de l'élastase en cellules Cos-1

Transfections transitoires: les transfections sont réalisées en présence de PEI (poly éthylène imine, Euromedex, France). La veille de la transfection, les cellules sont étalées dans des plaques de culture à 6 cupules, à raison de 150000-200000 cellules par cupule (estimation par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma). La transfection correspond alors à la mise en contact de 1µg de plasmide recombinant, préalablement incubé 20 min. avec 3µl de PEI (dans un volume de 100µl) avec les cellules d'une cupule contenues dans 900µl de milieu OPTI-MEM (Gibco-BRL). Après incubation 6 heures dans une étuve à 37°C sous CO₂, on ajoute aux cellules 4ml de milieu A10 par cupule, et les cellules sont replacées en étuve pendant 48 heures. Les témoins négatifs correspondent à des cellules transfectées avec le vecteur pRc-CMV natif. Le rendement de transfection est estimé à l'aide d'un vecteur témoin positif exprimant la β-galactosidase et conférant une coloration bleue aux cellules transfectées en présence d'X-Gal.

Evaluation de la production de l'élastase: la production de l'élastase a été évaluée par trois techniques différentes: ELISA, Western blot et immunofluorescence. Le dosage ELISA de l'élastase en immunocapture est réalisé comme décrit dans le § 2.1.3.2.3. sur des lysats de cellules Cos transfectées. Ces lysats sont obtenus après plusieurs étapes de congélation (N₂ liquide) - décongélation (37°C) de culots de cellules transfectées contenues dans 200µl d'eau additionnée de PMSF (1mM) (quantité pour l'équivalent d'une cupule de cellules transfectées). Une centrifugation à 12000g permet de récupérer le surnageant, le dosage

ELISA étant réalisé sur 100µl de ce lysat dilué au demi en PBS-Tween 20 0,1%. Le western blot est réalisé sur l'équivalent de trois cupules de cellules transfectées par piste de gel d'acrylamide, selon la méthode décrite au § 2.1.3.2.2.. Le sérum de lapin α -élastase recombinante est dilué au 1:50 en PBS-lait 5%. L'immunofluorescence est menée sur les cellules transfectées, fixées au paraformaldéhyde 4%, perméabilisées au PBS-triton 0,15% et saturées en PBS-BSA 1%. Le sérum α -élastase utilisé correspond à un des sérums obtenus chez les rats LOU (§ 2.3.1.1.) dilué au 1:50 en PBS-BSA 1%.

2.3.1.4.3. Immunisations par ADN nu

Les plasmides pRc-CMV natif, et pRc-CMV recombinants (pRc-CMV-EL et pRc-CMV-ELm) ont été produits en grandes quantités par maxi-préparations sur gradients de chlorure de césium (Sambrook *et al.*, 1989). Les culots d'ADN sont repris stérilement en Tris 10mM, EDTA 0,1mM.

Trois fois 100µg de ces préparations sont administrées (à 15 jours d'intervalle) par voie intra-dermique à 5 souris Balb/c par groupe (EL, ELm, pRc-CMV natif, témoins tampon). Les sérums de ces souris sont prélevés tous les 15 jours et la réponse α -élastase est analysée en ELISA direct (cf. § 2.3.1.2.).

2.3.2. Etude des propriétés immuno-modulatrices de l'élastase chez le rat Fischer

2.3.2.1. Protocoles animaux

Deux types d'expériences ont été menées: la première (expérience 1) a pour but de déterminer le profil de cytokines obtenu après injection d'antigène de cercaire en présence ou non d'inhibiteur de protéase, la seconde (expérience 2) quant-à elle consiste à reproduire le protocole décrit par Verwaerde *et al.* (1987) dans le but de déterminer le rôle des protéases sur le profil de cytokines et sur l'isotypie. Les deux expériences ont été menées sur des rats Fischer âgés de 6 semaines.

Expérience 1: l'antigène de cercaire a été préparé comme décrit dans le paragraphe 2.1.3.2.1 en absence de PMSF et EDTA pour une moitié, l'autre moitié a été préparé en présence de PMSF 2,5mM et EDTA 0,1mM. Une dilution a été procédée de façon à avoir une quantité d'antigène équivalente à 500 furcocercaires contenue dans 1ml de tampon. Cette

préparation a été immédiatement injectée par voie intra-péritonéale à 6 rats par groupe, le premier groupe recevant 1ml de tampon, le second 1ml d'antigène sans inhibiteur et le troisième 1ml d'antigène préparé en présence de PMSF et EDTA. Les prélèvements ont été effectués sur deux rats par groupe à J3, J7 et J10.

Expérience 2: tous les animaux reçoivent dans un premier temps 10µg de DNP-Alb en présence de 10mg Al(OH)₃ (Sigma) dilué dans 1ml de PBS, par voie intra-péritonéale. A J30 un prélèvement de sérum est effectué, puis un rappel est administré à raison de 1µg de DNP-Alb par rat, dilué dans différentes préparations: le premier groupe reçoit le DNP-Alb dilué dans 1ml de MEM; le second groupe reçoit la même quantité de DNP-Alb dilué dans 1ml de SRP (préparé en MEM comme décrit dans le §2.1.3.2.1 à raison de 10000 schistosomules par ml); pour le troisième groupe, le DNP-Alb est dilué en MEM et ajouté à 100ng/rat d'élastase pancréatique de porc (Sigma) dont l'activité enzymatique a été testée vis-à-vis de l'Azocoll (cf.§2.1.1.5.2). Les prélèvements sont effectués sur 5 rats par groupe, à J33, J37 et J45.

2.3.2.2.Prélèvements biologiques

Pour les expériences 1 et 2 les prélèvements sont identiques: les sérums sont prélevés comme décrit dans le § 2.3.1.. Après inhalation d'éther anesthésique, les animaux sont tués et disséqués. Un fragment de la rate est alors prélevé et congelé en azote liquide puis stocké à -80°C.

2.3.2.3.Extraction de l'ARN

L'ARN est extrait à partir des rates selon le protocole décrit par le fournisseur (RNAPLUS™, Bioprobe). Brièvement, les rates sont décongelées et broyées sur glace à l'aide d'un piston avec 1ml de solution RNAPLUS. Après une extraction avec 0,2 vol de chloroforme, la phase aqueuse est précipitée avec un volume d'isopropanol. Le culot, lavé deux fois en éthanol 70% est repris dans de l'eau. La quantité d'ARN est déterminée par lecture spectrophotométrique à 260nm.

2.3.2.4.RT-PCR et Southern blot

L'étape de RT est menée sur 2,5µg d'ARN total extrait à partir des rates selon le protocole décrit dans le § 2.1.1.1.. Pour l'expérience 1, les PCR ont été réalisées en conditions semi-quantitatives: 25 cycles (1min à 94°C, 1min à 55°C, 1min à 72°C) sont

réalisés sur 2µl/25 de la RT avec les oligonucléotides synthétiques spécifiques des différentes cytokines de rat et de la β -Actine présentés dans le Tableau X. Pour l'expérience 2, les PCR sont réalisées en conditions saturantes à partir de la même quantité d'ADNc simple brin (35 cycles comportant chacun 1min à 94°C, 1min à 52°C, 1min à 72°C). Les amorces utilisées pour ces PCR sont présentées dans le Tableau XI.

TABLEAU X: *Séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés en RT-PCR pour détecter les différentes cytokines ainsi que la β -actine dans l'expérience 1 (d'après Nudel et al., 1983; Mac Knight et al., 1989, 1991).*

Cytokine	Séquence des amorces	Fragment amplifié
β -Actine	sens : 5' - GCC ATC CTG CGT CTG GA - 3' anti-sens 5' - GGG GCA TCG GAA CCG CT - 3'	283 bp
IFN- γ	sens: 5'-TGG ATA TCT GGA GGA ACT GG -3' anti-sens : 5'- CGA CTC CTT TTC CGC TTC CT- 3'	310 bp
IL-4	sens : 5'- ACC AGA CGT CCT TAC GGC - 3' anti-sens : 5'- GCG TGG ACT CAT TCA CGG - 3'	206 bp
IL-12	sens : 5' - CAC TCA CAT CTG CTG CTC -3' anti-sens : 5'- GGC ACG CCA CTG AGT ACT - 3'	240 bp

TABLEAU XI: *Séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés en RT-PCR pour détecter les différentes cytokines dans l'expérience 2 (d'après Nudel et al., 1983; Mac Knight et al., 1989, 1991).*

Cytokine	Séquence des amorces	Fragment amplifié
IL-2	sens : 5'-GGA TCC GCA CCC ACT TCA AGC CCT-3' anti-sens 5'-CTC GAG TTA CTG AGT CAT TGT TGA AGA TGA-3'	414 pb
IL-4	sens : 5'-AGA GAG ATC ATC AAC ACT TTG AAC C-3' anti-sens: 5'-TTA GGA CAT GGA AGT GCA GGA-3'	354 pb
IL-5	sens : 5'-ATG AGG ATG CTT CTG TGC TTG-3' anti-sens : 5'-TCA GAC TTC CAT TGC CCA CTC-3'	396 pb
IL-10	sens : 5'-AGC AAA GGC CAT TCC ATC CG-3' anti-sens : 5'-TCA ATT TTT CAT TTT GAG TGT CAC GTA GGC-3'	413 pb

Les produits de RT-PCR (10µl/25) sont déposés sur gel d'agarose et un Southern blot est réalisé selon le protocole décrit dans le § 2.2.3.2. Pour l'expérience 1, les sondes utilisées sont celles présentées dans le Tableau X; elles sont marquées au ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP selon le protocole décrit par le fournisseur (Ready to Go T4 polynucleotide Kinase Kit, Pharmacia). Pour l'expérience 2, les sondes ont été obtenues par amplification par PCR de matrices disponibles dans le laboratoire à l'aide des amorces décrites dans le Tableau XII; le marquage de ces sondes au ^{32}P est réalisé comme décrit dans le paragraphe 2.2.3.2..

TABLEAU XII: Séquence des sondes utilisées pour l'hybridation des RT-PCR réalisées dans l'expérience 1.

Cytokine	Séquence des sondes (30 mers)
IFN- γ	5'- CTG GCT CTC AAG TAT TTT CGT GTT ACC GTC - 3'
IL-4	5' - GAG AAC CCC AGA CTT GTT CTT CAA GCA CGG -3'
IL-12	5' - GTG TTT CTG TGC ACC AGC CAT GAG CAG GTG -3'



RESULTATS

1. Régulation de l'expression de l'élastase de *S. mansoni*

Afin d'étudier la régulation de l'expression de l'élastase native il nous était nécessaire de posséder l'ADNc ainsi que la protéine recombinante.

1.1.Expression de l'élastase recombinante

1.1.1. Obtention de l'ADNc de l'élastase

Une RT-PCR a été menée avec les oligonucléotides SP1 et SP2. Le fragment de 800pb obtenu a été cloné en vecteur PCRTMII et séquencé. La séquence (Fig. 7) comparée à celle publiée par Newport *et al.* (1988b) a révélé qu'il s'agissait effectivement de l'ADNc de l'élastase.

```

ATGTCGAACCGATGGAGGTTTCTGGTGGTGACGCTGTTACCTACTGTCTAACATTTGAACGTG
M S N R W R F L V V T L F T Y C L T F E R V

TGTC AACCTGGTTGATACGTAGTGGTGAACCTGTGCAACACCGCACTGAATTCCCGTTTCATCGC
S T W L I R S G E P V Q H R T E F P F I A

ATTCTTAACGACAGAGAGAACAATGTGTACAGGCTCACTGGTCTCAACGAGAGCAGTACTCACA
F L T T E R T M C T G S L V S T R A V L T

GCTGGTCAATTGTGTTTGCTCACCATTGCCAGTGATTTCGGGTTTCGTTTCTCACACTGAGGAACG
A G (H) C V C S P L P V I R V S F L T L R N G

GCGACCAACAAGGCATCCATCACC AACCATCTGGAGTTAAGGTGGCACCAGGATATATGCCCTC
D Q Q G I H H Q P S G V K V A P G Y M P S

TTGTATGTCGGCAGCAAGAGGGAGACCAATCGCACAAACACTCAGTGGATTTCGACATTGCAATT
C M S A R R R R P I A Q T L S G F (D) I A I

GTAATGCTCGCTCAAATGGTCAACTTACAGAGTGAATCAGTGATCAGTCTGCCACAGGCAT
V M L A Q M V N L Q S G I T V I S L P Q A S

CGGATATACCGACACCTGGAACCTGGTGTTCATTGTTGGTTATGGAAGGGATGATAACGACCG
D I P T P G T G V F I V G I G R D D N D R

TGATCCGTCTCGTAAAAATGGTGAATTTTGAAGAAAGGTGAGCGACTATAATGGAATGCCGA
D P S R K N G G I L K K G R A T I M E C R

CATGCGACCAATGGGAATCCTATTTGTGTGAAAGCAGGTGAGAAATTTCCGACAGTTACCCGCTC
H A T N G N P I C V K A G Q N F G Q L P A P

CAGGTGACAGTGGTGGACCTCTCTCCCATCCCTCAAGGTCCAGTACTCGGTGTCTGATCACA
G D (S) G G P L L P S P Q G P V L G V V S H

TGGTGTACACTGCCAACCTTCCCGATATCATTTGTCGAGTATGCCAGTGTGGCTAGAATGTTG
G V T L P N L P D I I V E Y A S V A R M L

GATTTTGTACGCTCCAATATTTGA
D F V R S N I stop

```

Figure 7: Séquence du produit de la RT-PCR, et séquence d'acides aminés déduite, réalisée à l'aide des oligonucléotides synthétiques spécifiques de l'élastase de *S. mansoni*. Les acides aminés composant le site actif sont entourés; en italique est figurée la séquence du prépropeptide

1.1.2. Transcription-Traduction *in vitro*

Le fragment obtenu précédemment, possédant le codon ATG a été sous-cloné en vecteur BlueScript SK- dans les sites *Bam* HI et *Sma* I et cette construction a été testée en système de transcription-traduction *in vitro*. Le résultat après traduction en présence de méthionine marquée au ^{35}S est présenté sur le gel d'acrylamide en Fig. 8. On observe donc une bande aux environs de 28kDa correspondant à la traduction de l'élastase. Cette construction étant fonctionnelle, nous l'avons utilisée comme construction de départ pour les différentes stratégies d'expression de l'élastase recombinante.

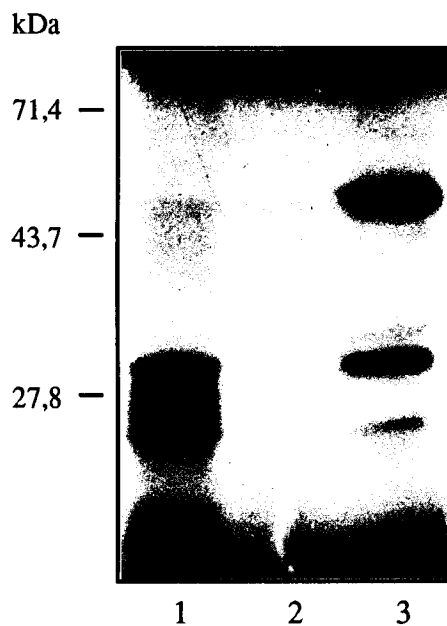


Figure 8: Analyse en SDS-PAGE du produit de transcription-traduction *in vitro* réalisée sur 1,5 μg de plasmide BlueScript SK- recombinant avec (1) la T3 polymérase ou (2) la T7 polymérase (témoin négatif), (3) témoin positif de transcription.

1.1.3. Production et purification de l'élastase recombinante

Plusieurs vecteurs d'expression ont été utilisés dans le but d'obtenir une protéine recombinante. Le Tableau XIII regroupe les différentes constructions réalisées, correspondant aux clonages, soit de l'ADNc entier de l'élastase (préproélastase), soit de l'ADNc codant pour l'élastase mature.

TABLEAU XIII: Clonage et expression de l'élastase de *S. mansoni* en *E. coli*.

vecteur	ADNc cloné	Résultat
pGEX-2T	ADNc entier	-
pGEX-4T3	ADNc entier	-
	Elastase mature	-
pMal C	ADNc entier	-
pQE 30	ADNc entier	-
	Elastase mature	+
pET 32a	Elastase mature	+

Seuls les clonages en vecteurs pQE 30 et pET 32a ont donné des résultats positifs, et uniquement avec le fragment d'ADNc codant pour la protéine mature. Cependant, dans les deux cas, la protéine recombinante se trouvait dans les corps d'inclusion de la bactérie, ce qui a nécessité une solubilisation en conditions dénaturantes, et une renaturation de la protéine recombinante par dialyses séquentielles, en présence de SDS 0,02% dans la dernière étape.

La figure 9A représente un SDS-PAGE de l'élastase recombinante exprimée en *E. coli* en vecteur pQE 30, migrant à environ 28kDa. La protéine recombinante est pure (piste 4) et est reconnue par un sérum de lapin dirigé contre les produits relargués par la cercaire (CTF pour "cercarial transforming fluids") (sérum fourni par le Dr. M. Doenhoff, University of Wales, Bangor, UK) (Fig. 9B).

Ces résultats confirment que l'élastase recombinante produite en *E. coli* est effectivement antigénique.

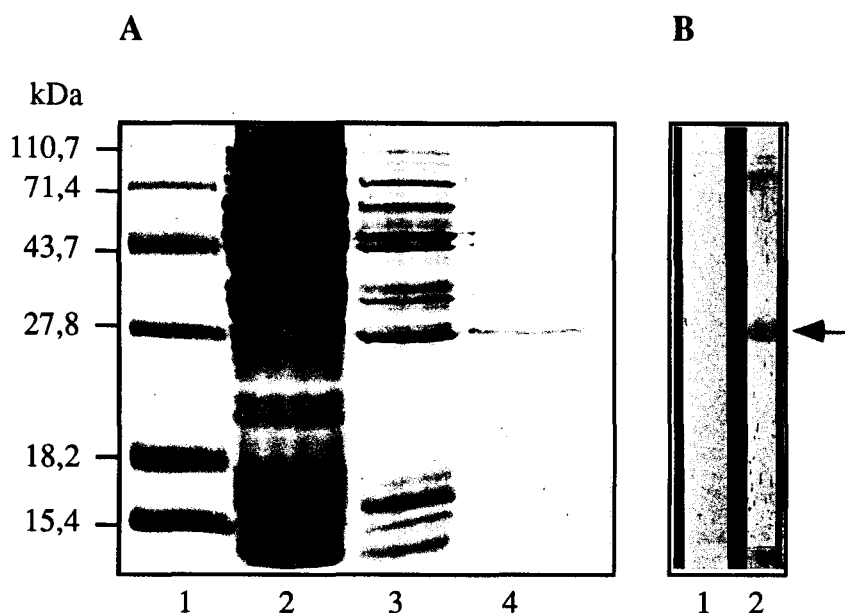


Figure 9: (A) Analyse sur SDS-PAGE de l'expression de l'élastase recombinante en vecteur pQE 30. (1) poids moléculaires (GIBCO-BRL), (2) culture non induite, (3) culture induite par l'IPTG, (4) protéine recombinante purifiée. (B). Analyse en western blot de l'immunoréactivité d'un sérum α -CTF sur l'élastase recombinante. (1) sérum de lapin pré-immun (1:100), (2) sérum de lapin α -CTF (1:100).

1.1.4. Dosage de l'activité enzymatique de l'élastase recombinante

L'activité des protéines recombinantes obtenues en vecteurs pQE 30 et pET 32a a été testée contre deux substrats susceptibles d'être dégradés par l'élastase de *S. mansoni* (McKerrow *et al.*, 1985): la caséine et l'azocoll. Même après incubation une nuit à 37°C, aucun de ces deux substrats n'a été dégradé par les protéines recombinantes, ce qui n'est pas le cas pour l'élastase de porc (Sigma) ou la trypsine (Difco Laboratories).

1.1.5. Immunogénicité de l'élastase recombinante

La protéine recombinante purifiée obtenue en vecteur pQE 30 a été injectée à un lapin (une injection et un rappel) et la qualité du sérum est observée en western blot sur la protéine immunisante (Fig. 10A). Puis la spécificité de ce sérum de lapin α -élastase recombinante a été évaluée. Le sérum reconnaît un antigène de 28kDa sur un extrait de cercaires, antigène correspondant à l'élastase native (Fig. 10B). Ce sérum a, par la suite, été utilisé afin d'évaluer la présence de l'élastase native au cours du cycle de *S. mansoni*.

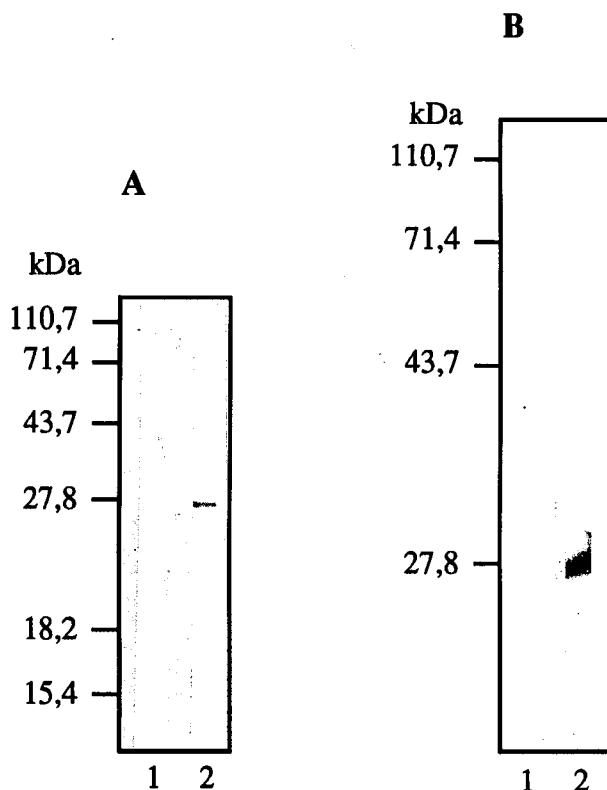


Figure 10: Analyse en western blot du sérum de lapin α -élastase recombinante. (A) immunoréactivité avec la protéine immunisante. (1) sérum de lapin pré-immun (1:1000), (2) sérum de lapin α -élastase (1:1000). (B) immunoréactivité avec un homogénat de cercaires. (1) sérum de lapin pré-immun (1:200), (2) sérum de lapin α -élastase (1:200).

1.2. Etude de la régulation de l'expression de l'élastase au cours du développement

La régulation du gène de l'élastase a été étudiée au niveau de l'ARNm par technique de RT-PCR, puis différentes approches ont été envisagées au niveau protéique.

1.2.1. Au niveau de l'ARN

Dans un premier temps, l'ARNm de l'élastase a été détecté par RT-PCR sur l'ARN total d'oeufs, cercaires et vers adultes, à l'aide des oligonucléotides synthétiques SP1 et SP2 (cf. Tableau IX p.90). Ceci a permis d'obtenir un fragment de 800pb à chaque stade (Fig. 11), et le séquençage de ces fragments a révélé qu'il s'agissait du transcript de l'élastase.

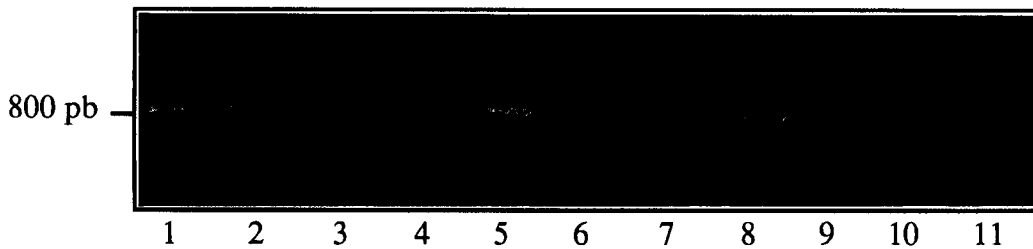


Figure 11: Analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR menées sur l'ARN total d'oeufs (2-4), cercaires (5-7) et vers adultes (8-10). Dans chaque cas, des PCR ont été réalisées avec les oligonucléotides 5' et 3' spécifiques de l'élastase (2, 5, 8), uniquement l'oligonucléotide 5' (3, 6, 9) ou uniquement l'oligonucléotide 3' (4, 7, 10). En piste (1) échelle 100pb d'ADN (Pharmacia), (11) témoin de PCR sans matrice.

Ainsi, contrairement à Newport *et al.* (1988b) qui n'avaient pu détecter en northern blot la présence de l'ARNm de l'élastase chez les vers adultes, nous l'avons détectée par technique de RT-PCR, méthode plus sensible. Afin de confirmer ce résultat et de vérifier s'il y avait effectivement des différences de quantité d'ARN entre le stade cercaire et le stade vers adulte, nous avons réalisé des PCR semi-quantitatives. Après migration sur gel d'agarose et transfert, une hybridation avec une sonde interne de l'élastase, a révélé qu'effectivement au bout de 20 cycles de PCR on observe une différence d'intensité du signal (Fig. 12).



Figure 12: Analyse sur gel d'agarose après transfert et hybridation spécifique des produits de RT-PCR semi-quantitatives menées sur l'ARN total de cercaires (2-5) et vers adultes (6-9). Dans chaque cas 15(2,6) 20 (3,7), 25 (4,8) ou 30 (5,9) cycles de PCR ont été réalisés. (1) témoin de PCR sans matrice.

Cependant que ces résultats indiquent la présence du transcrit, ils ne permettent pas de conclure quant à la traduction effective de ces transcrits.

1.2.2. Au niveau protéique

Un western blot d'extraits totaux des différents stades de *S. mansoni* a été hybridé avec le sérum de lapin dirigé contre l'élastase recombinante (Fig. 13). Nous avons ainsi détecté l'élastase native dans les homogénats de cercaires (Fig. 13, b, 2) et de schistosomules (Fig. 13, b, 3-4) mais pas dans ceux d'oeufs ni de vers adultes (Fig. 13, b, 1, 5), bien que la qualité des différentes préparations antigéniques ait été vérifiée avec un sérum de lapin anti-SWAP (Fig. 13, c).

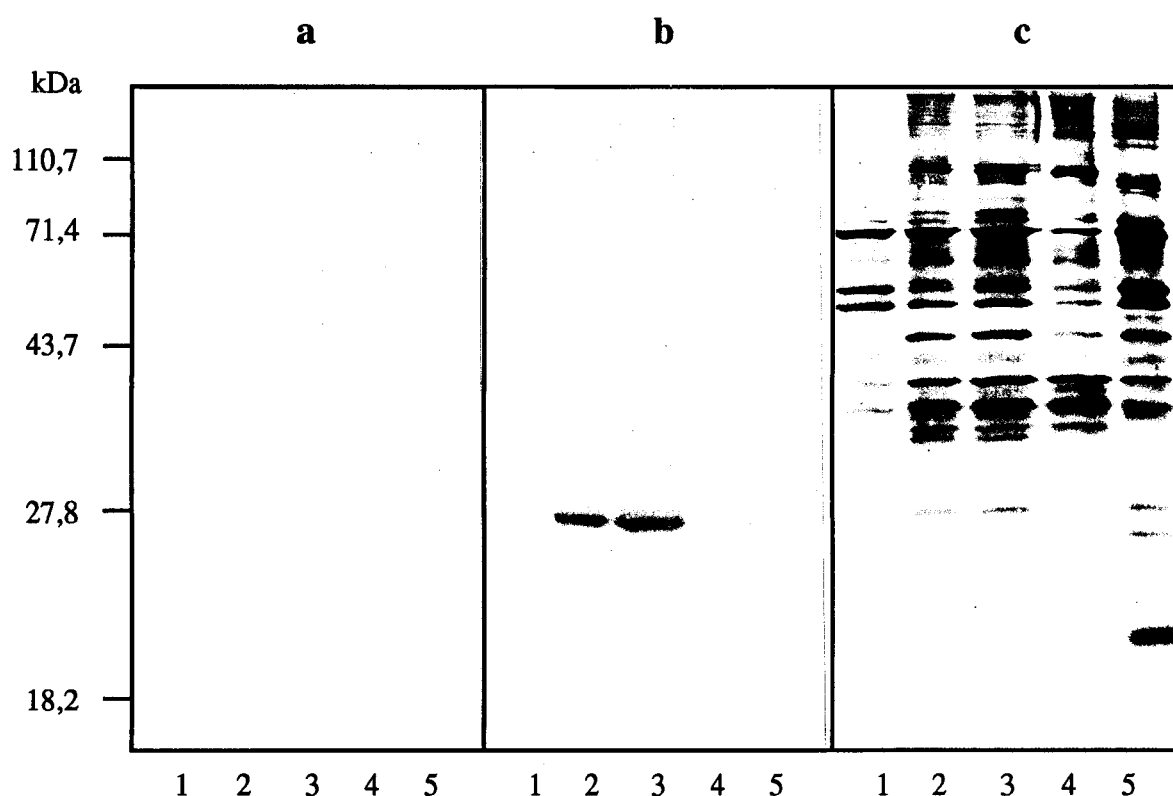


Figure 13: Analyse en western blot de l'expression de l'élastase native au cours du cycle de *S. mansoni*. Des homogénats d'oeufs (1), cercaires (2), schistosomules 3h (3) et 18h (4) et vers adultes (5) sont transférés sur membrane de nitrocellulose après migration sur SDS-PAGE. (a) sérum de lapin pré-immun (1:200), (b) sérum de lapin α -élastase recombinante (1:200), (c) sérum de lapin α -SWAP.

Il semble donc que l'expression de l'élastase native soit fortement régulée. Cependant, la quantité de protéines totales (20 μ g/piste) pouvait être insuffisante pour détecter en western blot de faibles quantités d'élastase native. Aussi nous avons mis au point un test ELISA en immuno-capture. Dans ce système, une courbe standard établie avec l'élastase recombinante

purifiée permet d'évaluer les quantités d'élastase au sein de préparations antigéniques par mg de protéines totales. La figure 14 illustre les quantités d'élastase détectées à chaque stade de développement du parasite.

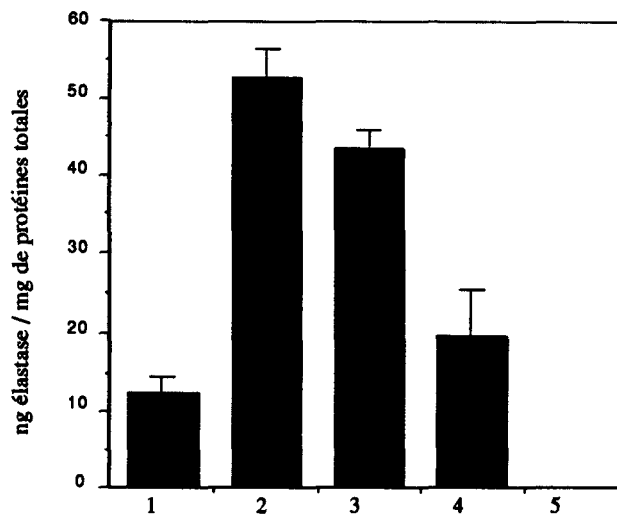


Figure 14: Analyse en ELISA immunocapture de l'expression de l'élastase native au cours du cycle de *S. mansoni*. Profil représentatif des quantités d'élastase en ng/mg de protéines totales (1) d'oeufs, (2) cercaires, (3) schistosomules 3h, ou (4) 18h, et (5) vers adultes.

Ainsi, par cette technique, nous ne pouvons détecter l'élastase dans un homogénat de vers adultes. Cependant, contrairement aux résultats observés en western blot, nous détectons de faibles quantités, mais significatives, d'élastase au sein de l'homogénat d'oeufs. Finalement cette étude confirme que les plus importants taux d'élastase sont trouvés dans les stades larvaires. Cette expérience a été reproduite sur deux lots de préparations antigéniques et le profil obtenu était identique. De plus, la qualité des préparations a été vérifiée par un dosage du même type de la Sm28GST (résultat non présenté).

1.2.3. Immunolocalisation

L'élastase de *S. mansoni* facilitant l'invasion de la larve dans les tissus de l'hôte, nous avons souhaité mesurer son niveau dans les schistosomules ainsi que dans les produits relargués par ceux-ci, après différents temps de culture *in vitro*. Ainsi, grâce au test ELISA

en immuno-capture, nous avons montré que, parallèlement à la diminution du taux d'élastase dans les schistosomules au cours du temps, on assiste à une augmentation de ce même taux dans les produits relargués (résultat non présenté). Ce résultat, compatible avec des études préliminaires (Keene *et al.*, 1983), est en accord avec le rôle de l'élastase durant l'invasion de la peau de l'hôte.

Afin d'étendre ces observations, nous avons examiné la localisation de l'élastase au cours de la pénétration de la larve dans la peau de l'hôte. Ceci a été réalisé sur des coupes de peaux de souris obtenues après une heure de contact avec des cercaires. La présence de l'élastase a été révélée avec le sérum de lapin anti-élastase recombinante. Ainsi, une coloration très importante a été observée à l'intérieur de la cercaire au niveau des glandes acétabulaires et de leurs sécrétions (Fig. 15). Nous avons également observé un marquage au niveau de la peau de la souris, montrant clairement que l'élastase est excrétée. Cette coloration spécifique indique donc que la protéine native, reconnue par des anticorps dirigés contre l'élastase recombinante, est fortement relarguée par la cercaire durant l'invasion de la peau.

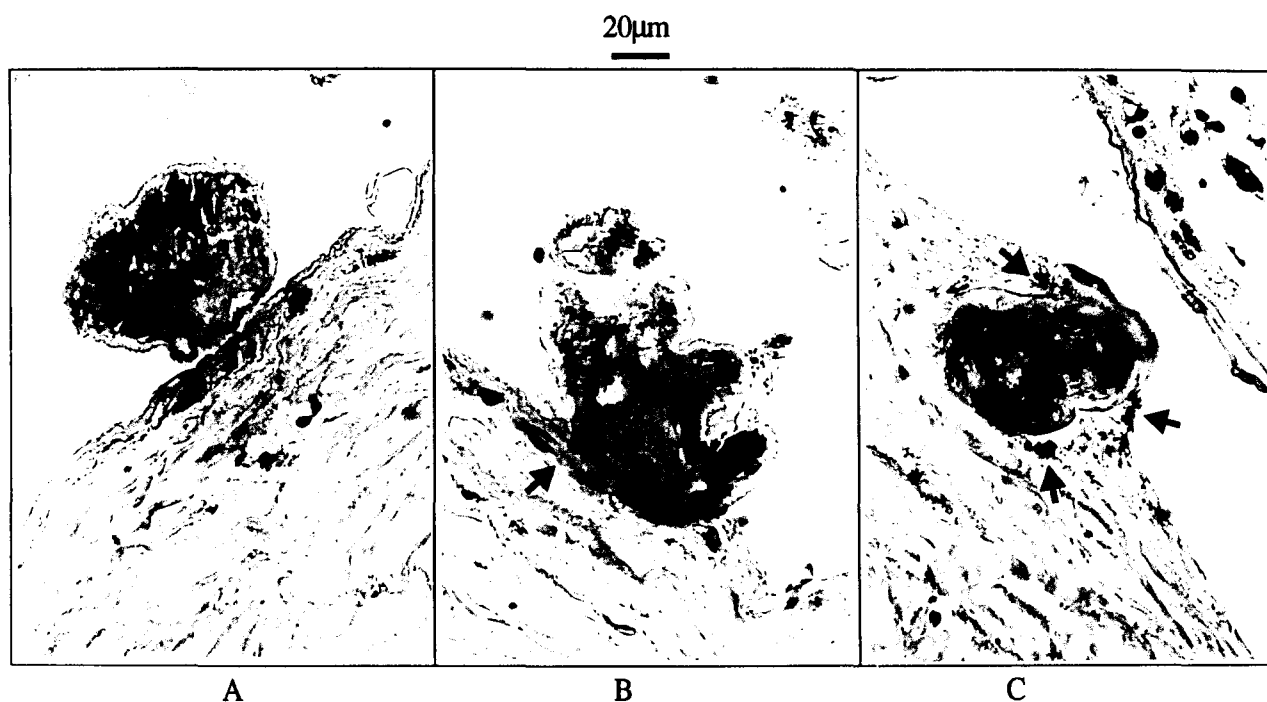


Figure 15: Immunolocalisation de l'élastase de *S. mansoni* chez la cercaire envahissant la peau de l'hôte. Le marquage à la phosphatase alcaline indiquant la présence de l'élastase est représenté par des flèches.

2. Etude du gène de l'élastase

Nous avons pu observer que la synthèse de l'élastase native au cours du cycle de développement du parasite était étroitement régulée. Aussi, dans le but de comprendre le mécanisme à l'origine de cette régulation, tout au moins au niveau transcriptionnel, nous avons étudié le gène de l'élastase. De plus, l'identification de régions promotrices et la compréhension de leur fonctionnement pourrait permettre d'envisager une intervention quant à l'expression par le parasite de cette enzyme indispensable à la pénétration des cercaires chez l'hôte définitif.

2.1. Clonage et séquençage du gène EL1

2.1.1. Séquence et organisation du gène

Le criblage d'une banque d'ADN génomique de *S. mansoni* avec l'ADNc codant pour l'élastase a conduit à l'isolation d'un clone positif. La digestion de ce clone par *Eco* RI et l'hybridation de fragments d'ADNc spécifiques des côtés 5' et 3' ont permis d'obtenir des inserts génomiques 5' de 1300bp et 3' de 2100pb. Une PCR, réalisée avec des oligonucléotides synthétiques internes a révélé l'existence d'un premier intron de 600pb. Le fragment obtenu a été sous-cloné en vecteur TA cloning (Invitrogen) et séquencé. De même, les inserts génomiques de 1300pb et 2100pb ont été sous-clonés en vecteur PUC 18-*Eco* RI et séquencés. Les séquençages ont été réalisés par la méthode de Sanger (Autoread Sequencing Kit, Pharmacia). La comparaison des séquences obtenues avec la séquence d'ADNc a révélé l'existence d'un second intron.



Figure 16: Organisation du gène EL1 de l'élastase de *S. mansoni*. Les boîtes noires correspondent aux exons.

Figure 17: Séquence nucléotidique du gène *EL1* de l'élastase de *S. mansoni*. Les exons sont figurés en lettres majuscules. Les séquences complètes des exons ne sont pas figurées. V indique le site d'initiation de la transcription (nt +1), * indique la position de l'ATG. Les TATA et CCAAT box et les deux sites de polyadénylation potentiels sont soulignés. Les sites AP1 et NF-IL6 "sens" sont soulignés d'un double trait, les "antisens" sont soulignés en pointillés. Les motifs répétés sont encadrés.

La figure 16 montre l'organisation du gène EL1 de l'élastase: une région 5' de 1237pb, un intron de 144pb, un intron de 604pb et une région 3' de 279pb.

2.1.2. Recherche des séquences potentiellement promotrices

La séquence nucléotidique obtenue (Fig. 17) a été partiellement confirmée, et les tailles de différents fragments obtenus par PCR également vérifiées sur l'ADN génomique de cercaires. Le "cap site", déterminé par PCR sur une banque d'expression de vers adultes réalisée en phage λ zap, se situe en position -24. L'analyse de la région 5' indique la présence d'une "TATA" box en position -70 et d'une "CCAAT" box inversée en position -79. Différents sites consensus d'éléments intervenant dans la régulation des gènes chez les vertébrés (Faisst *et al.*, 1992) sont également présents dans la région 5'. Ces sites sont regroupés dans le tableau ci-dessous et représentés sur la figure 18. On remarque quatre sites NFIL6 dont trois "antisens" et deux sites AP1 dont un "antisens" à des positions intéressantes pour une étude sur la régulation du gène. Le site AP1 a déjà été décrit sur plusieurs gènes de *S. mansoni* (McNair *et al.*, 1993; Khalife *et al.*, 1993) et récemment Khalife *et al.* (1995) ont montré que ce site était fonctionnel.

TABLEAU XIV: Sites consensus d'éléments régulateurs présents dans la région 5' du gène EL1 de l'élastase de *S. mansoni*.

site	consensus	position	sens
TATA box	TATAAA	-70	+
CAAT box	CCAAT	-79	-
		-737	+
NFIL6	TTGTGAAAG	-497	+
		-521	-
		-638	-
		-931	-
AP1	TGAGTAA	-764	+
		-667	-

On remarque également plusieurs séquences répétées et inversées dans la région 5': CAT répété 8 fois, séquence inverse de ATG répété 9 fois, et TGAC répété 3 fois dont la séquence inverse GTCA est retrouvée répétée 3 fois dans la région 3'. Ces différentes observations laissent supposer l'existence de boucles au niveau du gène; ceci pourrait favoriser le rapprochement de certains éléments et jouer un rôle important dans la régulation de ce gène. L'analyse de la région 3' non codante montre la présence de deux signaux possibles de polyadénylation 5'-AATAAATAAA et 5'-AATTA. On retrouve dans la séquence tous ces différents sites, ainsi que les sites accepteurs et donneurs d'épissage GT et AG.

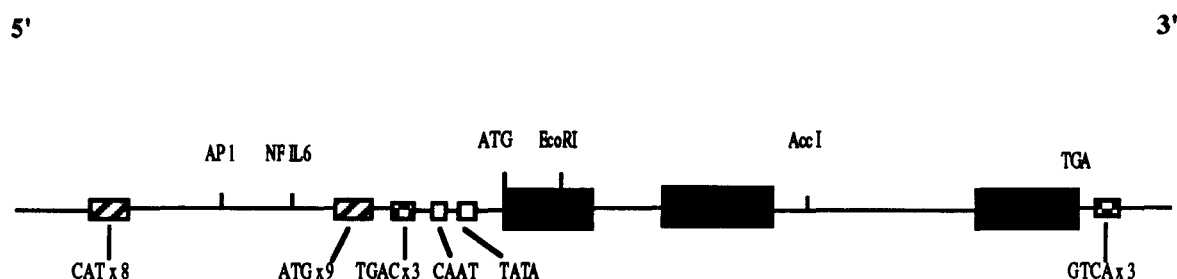


Figure 18: Carte du gène *EL1* de l'élastase de *S. mansoni* et position des éléments pouvant intervenir dans la régulation de l'expression du gène.

2.2. Etude de l'ADN génomique

Les résultats obtenus précédemment (séquence et organisation du gène *EL1*) se sont révélés être en contradiction avec des travaux non publiés, cités dans une revue (McKerrow *et al.*, 1991). En effet, ces auteurs supposaient l'existence d'un gène unique codant pour l'élastase, et présentant un intron et deux exons. De plus, la position du cap site était également différente de celle décrite par Newport *et al.* (1988b). Aussi, afin de confirmer nos résultats, et de vérifier qu'ils n'étaient pas dus à des recombinaisons survenues dans notre banque génomique, nous avons analysé l'ADN génomique de *S. mansoni*. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de Southern blot et PCR.

2.2.1. Southern blot

L'ADNg de *S. mansoni* a tout d'abord été analysé par une hybridation en Southern blot avec la sonde correspondant à l'ADNc de l'élastase obtenue par RT-PCR (SP1-SP2, cf. Tableau IX p.90). Différentes préparations d'ADNg ont été digérées par les enzymes de restriction *Hind* III (site non présent dans la séquence d'ADNc) et *Eco* RI (présent une fois dans la séquence d'ADNc). Après plusieurs lavages en conditions stringentes, l'analyse du Southern blot montre une hybridation de plusieurs fragments (Fig. 19). Une hybridation de la même membrane avec une sonde différente correspondant à un gène présent en copie unique, a été réalisée dans le laboratoire et nous a permis de vérifier que la digestion de l'ADNg était complète.

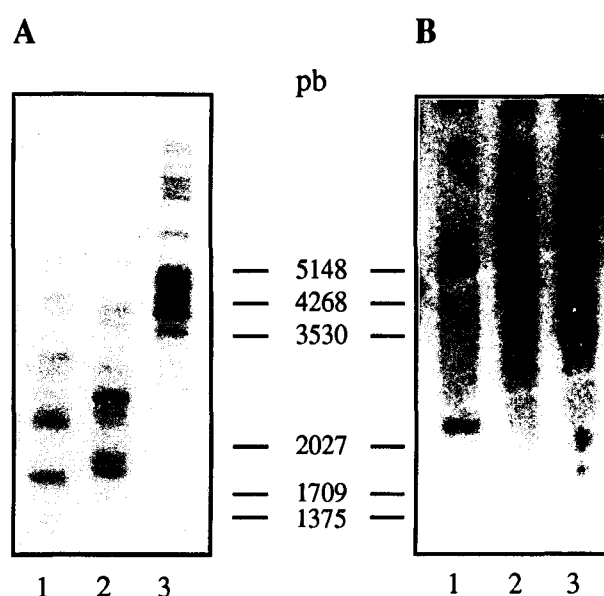


Figure 19: Southern blot sur ADN génomique de *S. mansoni*. L'ADN génomique (1,5µg) de cercaires a été digéré par les enzymes de restriction *Acc* I (1), *Eco* RI (2) et *Hind* III (3) et hybridé avec l'ADNc de l'élastase (A) ou de la kallikréine-like (B) (gène présent en copie unique) (Cocude et al., sous presse).

Ces résultats non seulement confirment l'existence d'un premier gène, mais ils suggèrent également l'existence d'au moins deux copies du gène de l'élastase.

2.2.2. PCR sur l'ADN génomique de *S. mansoni*

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une amplification par PCR de l'ADN génomique de *S. mansoni*, à l'aide des oligonucléotides SP1 et SP2 (cf. Tableau IX p.90). Ceci nous a permis d'obtenir deux fragments de 1500pb et 1100pb (Fig. 20). On remarque que le fragment de 1100pb est moins intense que celui de 1500pb, bien qu'il soit de plus petite taille et donc plus facilement amplifiable par PCR, ce qui suggère que ce second gène est moins représenté dans le génome de *S. mansoni*.

L'analyse du premier fragment par PCR, ainsi que l'étude de sa carte de restriction et son séquençage partiel a montré qu'il s'agissait du gène décrit précédemment (EL1, deux introns et trois exons). Par contre, le fragment de 1100pb s'est révélé correspondre à un second gène nommé EL2.

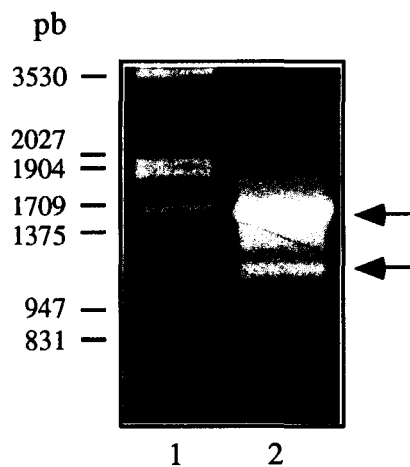


Figure 20: PCR sur ADN génomique de *S. mansoni*. Analyse sur gel d'agarose des fragments obtenus après amplification avec les oligonucléotides synthétiques spécifiques de l'élastase SP1 et SP2 (2). (1), marqueurIII (λ Hind III/Eco RI).

2.3. Etude du gène EL2

2.3.1. Séquence et organisation

Le fragment de 1100pb obtenu par PCR sur l'ADN génomique de *S. mansoni* a été cloné en vecteur PCRTMII puis séquencé à l'aide des oligonucléotides synthétiques présentés dans le Tableau IX p.90 (Fig. 22). L'organisation de ce gène est similaire à celle du gène EL1: trois exons et deux introns (Fig. 21). On peut remarquer dans la séquence de ce second gène l'existence de deux sites *EcoRI*, ce qui explique en partie le profil obtenu en Southern blot.

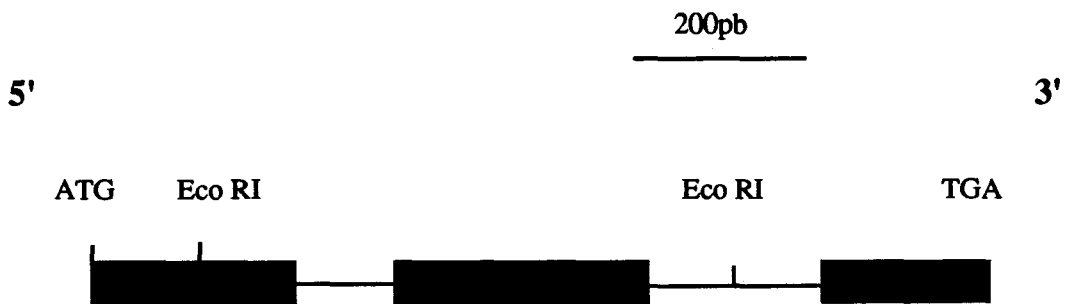


Figure 21: Organisation du gène EL2 de l'élastase de *S. mansoni*. Les régions flanquantes 5' et 3' ne sont pas connues. Les boîtes noires correspondent aux exons.

Figure 22 (page suivante): Séquence nucléique du gène EL2 de l'élastase de *S. mansoni*.

*
1 ATGTCGAACCGATGGAGGTTTTGGTGGTGACACTGTTTCATCTACTGTCTAACATTTAAACGTGTGTCAACCTGGCTGATACGTAGTGATCAACCTGTTCAAAAACACACTGAATTCCTCG
121 TTCATCGCATATATAGCATCAAAGAAATCAATGTGTACAGGTTCCTAGTCTCAACGAGAGTAGTACTCACAGCTGGTCATTGTGTTTGCCACCAATGCCAGTCATTAAGgtaagagat
241 aacactgatacacattgttgtaatgtaatgtaatcgattaatttcacagagagtgtaactgtgtgtttttgtatgcagtgcagtttgcataaatctaattgtaataatagtttgtccatttc
361 agGTTACATTTCTCACATTGAGGAATGGGGACCAACAAGGCATCCATCATCAACCGTCTGGAGTTAAGGTAGCACCAGAATACATGCCCTCTTGTACGGCGTCACGACAGAGGAGAAGAA
481 TCAGACAGACACTCAGTGGATTGCGCATTCGCAACTGCAATGCTGGCTCAAATGGTCAACTTACAGAGTGAATCAGAGTGATTGGTCTGCCACAGGCATCGGATATACCGACACCTGGAA
601 CTGATGTTTTTCATTGTTGGTTATGGAAGGGATGATAACGACCGTGATCCGTCGCGTAGAGCTGGTGGATTGGAAGAAAGgtgagttggtggtcaacaacaacatgactcagtcagtcag
721 tcagttagtaagacagttaatctgtctatttgtttatgtgatccggttggtgtgctattcaatatagttcacatatgagatgggacatgtgagattacaggtggaatatttgttttgtgg
841 atagttcgaaggtggataatttgtagcagttgatatttacgaaattcacttgccgtgttcttttctgttctgatctgttctttgtttgacatagGTCGCGCGACTGTAACGGAATGCCGAC
961 ATGAGACCCATGTGAATCCTATTTGTGTGAAAGCAGGTCCGAATTCGGACAGTTACTCGGTCCAGGTGACAGTGGTGGACCTCTCCTCCCATCCCCTCAAGGTCCAGTACTCGGTGTCTG
1081 TATCACATGGTGTACACTGTACACCTTCCCGAGTATGTCAGTGTGGCTAGAATGTTGAATTTGTACGCTCCAATATTTGA

2.3.2. Comparaison EL1/EL2

Les séquences nucléotidiques EL1 et EL2 présentent de fortes identités excepté au niveau du second intron qui est totalement différent. La séquence d'acides aminés déduite du gène EL2 présente 79% d'identité avec celle déduite du gène EL1 (Fig. 23).

Néanmoins, dans la séquence d'acides aminés déduite du gène EL2, on ne retrouve que deux des trois acides aminés impliqués dans le site actif des sérines protéases; en effet l'acide aspartique en position 125 est remplacé par une alanine. De plus, quatre acides aminés sont absents par rapport à la séquence déduite de EL1 (position 244-247). Ceci laisse supposer que le produit éventuel du gène EL2 ne pourrait être fonctionnel. Cependant le pI déterminé à partir de la séquence déduite du gène EL2 (9,64) est très proche de celui de la séquence d'acides aminés déduite de EL1 (9,22), ce qui écarte la possibilité de déterminer par western blot bi-dimensionnel si les deux gènes sont effectivement traduits.

EL1	M S N R W R F L V V T L F T Y C L T F E R V S T W L I R S G E P V Q H R T E F P F I A F L T T E R T	50
EL2	M S N R W R F L V V T L F I Y C L T F K R V S T W L I R S D Q P V Q K H T E F P F I A Y I A S K K S	
EL1	M C T G S L V S T R A V L T A G H C V C S P L P V I R V S F L T L R N G D Q Q G I H H Q P S G V K V	100
EL2	M C T G S L V S T F V L T A G H C V C P P M P V I K V T F L T L R N G D Q Q G I H H Q P S G V K V	
EL1	A P G Y M P S C M S A R R R R P I A Q T L S G F D I A I V M L A Q M V N L Q S G I T V I S L P Q A S	150
EL2	A P E Y M P S C T A S R D R F R I F Q T L S G F A I A T A M L A Q M V N L Q S G I R V I G L P Q A S	
EL1	D I P T P G T G V F I V G I G R D D N D R D P S R K N G G I L K K R A T I M E C R H A T N G N P I	200
EL2	D I P T P G T D V F I V G Y G R D D N D R D P S R R A G G F E E R R A T V T E C R H E T H V N P I	
EL1	C V K A G Q N F G Q L P A P G D S G G P L L P S P Q G P V L G V V S H G V T L P N L P D I I V E Y A	250
EL2	C V K A G F N S G Q L L G P G D S G G P L L P S P Q G P V L G V V S H G V T L S H L P - - - E Y V	
EL1	S V A R M L D F V R S N I	263
EL2	S V A R M L N F V R S N I	

Figure 23: Alignement des séquences d'acides aminés déduites de EL1 et EL2. Les identités sont encadrées.

Une approche moléculaire nous a donc permis non seulement de cloner un gène de l'élastase, possédant des éléments potentiellement impliqués dans la régulation de son expression, mais aussi d'identifier un second gène, dont la fonctionnalité n'a pas été démontrée, et qui semble sous-représenté, comparé au premier.

3. L'élastase de *S. mansoni*: cible et/ou immuno-modulateur

3.1. Etude de l'élastase en tant que cible du système immunitaire

Les résultats obtenus en immunolocalisation montrant que l'élastase est fortement sécrétée par les cercaires dans la peau de l'hôte suggèrent que cette protéine puisse être une cible du système immunitaire de l'hôte.

3.1.1. Cytotoxicité macrophage dépendante

Au cours de l'infection par *S. mansoni*, il est admis que des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps jouent un rôle essentiel dans la destruction des larves chez le rat, le primate et l'homme (Clegg *et al.*, 1972; Butterworth *et al.*, 1975a). De plus, il a été démontré que des sérums de patients infectés par *S. mansoni* contenaient des anticorps dirigés contre l'élastase (Toy *et al.*, 1987). Afin d'explorer la possibilité que l'élastase puisse être une cible du système immunitaire, des rats ont été immunisés avec la protéine recombinante en présence d'adjuvant complet de Freund. Une analyse en Western blot a montré la présence d'anticorps anti-élastase dans tous les sérums, après une seule injection (Fig. 24).

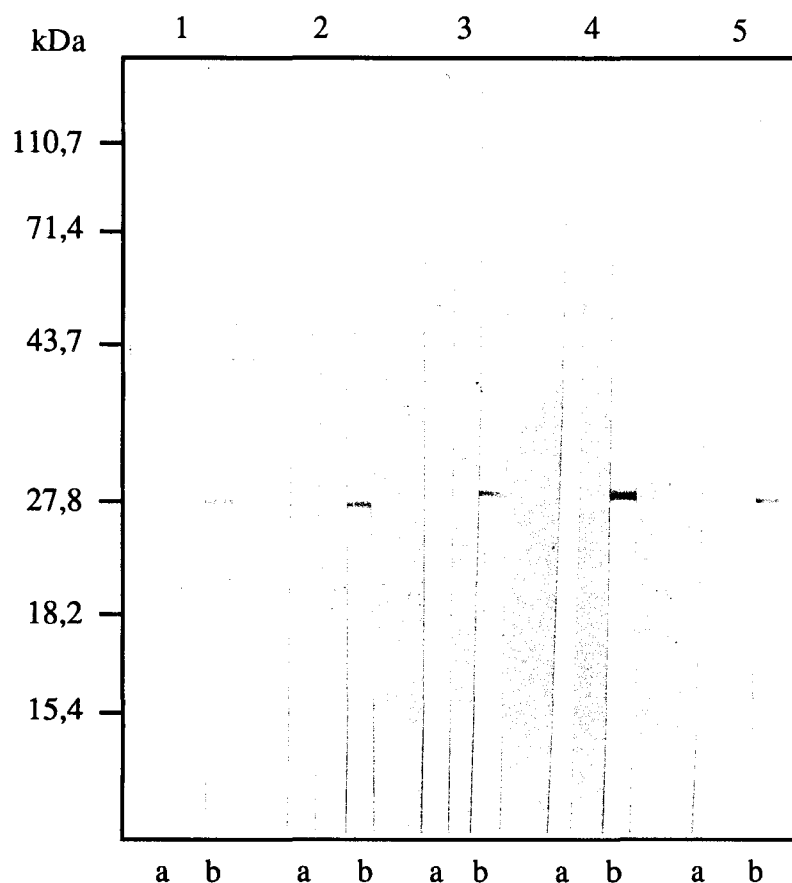


Figure 24: Analyse en western blot de l'immunoréactivité des sérums de rats α -élastase. Les sérums de rats (1-5) sont testés contre un homogénat de cercaires. (a) sérum de rat pré-immun (b) sérum de rat immunisé avec l'élastase recombinante.

Le rôle fonctionnel de ces anticorps a, par la suite, été évalué. Ainsi des expériences *in vitro* avec ces sérums de rats immunisés ont permis de montrer une cytotoxicité significative contre des schistosomules, en présence de macrophages purifiés à partir de rats sains Fig. 25). Cependant un des sérums de rats présente un relativement faible taux de cytotoxicité (rat 3), alors que dans les mêmes conditions les sérums préimmuns ne présentent aucune cytotoxicité.

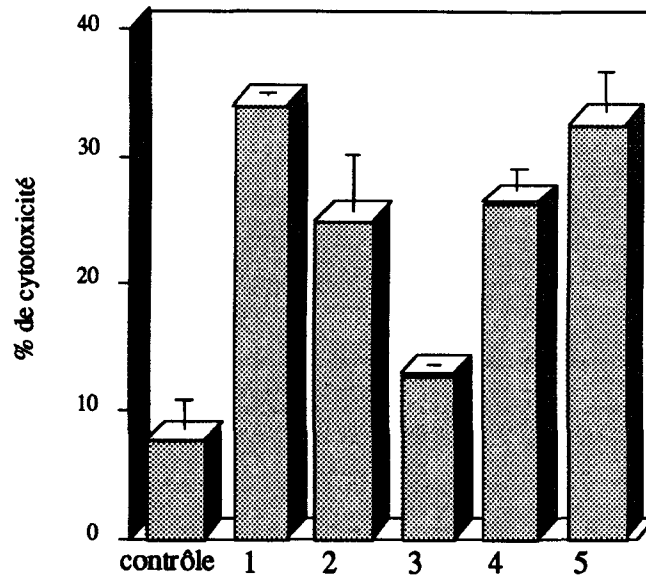


Figure 25: Cytotoxicité macrophage dépendante. Pourcentage de cytotoxicité observé pour chaque sérum de rat α -élastase (1-5) et pour un pool de sérums de rats pré-immuns (contrôle), sur des schistosomules in vitro.

Ces résultats montrent que, après une seule immunisation avec l'élastase recombinante, des rats sont capables de produire des anticorps effecteurs. Il est important de noter que dans la schistosomiase expérimentale du rat les anticorps effecteurs sont de l'isotype IgG2a alors que leur activité peut être bloquée par des IgG2c (Grzych *et al.*, 1984). Ceci nous a conduits à tester l'hypothèse que l'immunisation avec l'élastase pouvait induire des anticorps en majorité effecteurs.

3.1.2. Analyse du profil isotypique des sérums de rats

Nous avons donc réalisé un test ELISA direct avec l'élastase recombinante. Les résultats présentés dans la figure 26 montrent que les sérums de rats testés précédemment contiennent des taux importants d'IgG2a, comparé aux IgG2c. Concernant le rat 3 qui présentait une plus faible cytotoxicité, le niveau d'IgG2a est également plus faible que pour les autres rats. L'interprétation de ces résultats est que les IgG2a anti-élastase sont vraisemblablement responsables de la cytotoxicité observée.

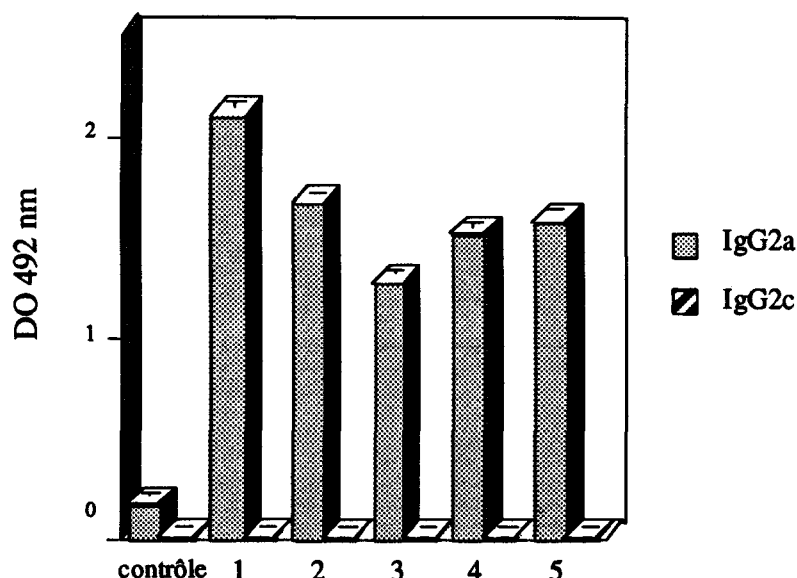


Figure 26: Analyse par ELISA du profil isotypique des sérums de rats α -élastase (1-5) et du pool de sérums de rats pré-immuns. La densité optique est mesurée à 492nm après incubation avec un anti-IgG2a () ou anti-IgG2c () marqués à la peroxydase.

L'ensemble de ces résultats contribuent donc à l'évidence que l'élastase puisse être une cible immunitaire aux stades larvaires du parasite.

3.1.3. Etude de la protection conférée par transfert passif d'IgG α -élastase

La cytotoxicité décrite précédemment est également observée pour le sérum de lapin anti-élastase recombinante (42% de cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules en présence de macrophages de rat; non présenté). Or Moloney *et al.* (1990) ont montré que le transfert passif d'un sérum de lapin immunisé avec des cercaires irradiées, pouvait entraîner une protection chez la souris. Ceci nous a incités à réaliser une d'expérience de transfert passif des IgG de lapin anti-élastase purifiées. Une infestation d'épreuve par *S. mansoni* a été réalisée 1h après l'administration par voie intra-veineuse des IgG anti-élastase. Cependant, alors que 10 jours après transfert passif de ces IgG on détecte encore leur présence dans les sérums de rat (non présenté), aucune protection n'est observée en termes de réduction du nombre de vers dans le foie, 21 jours après l'infestation (Fig. 27).

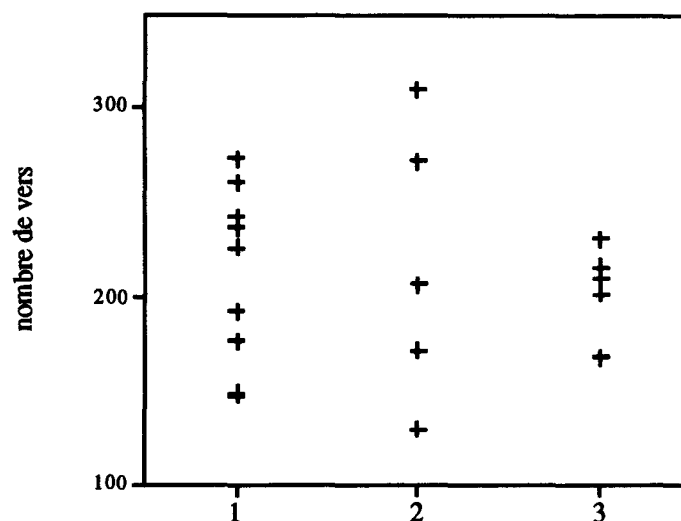


Figure 27: Effet du transfert passif des IgG α -élastase à des rats sur le nombre de vers 21 jours après infestation par 1000 cercaires de *S. mansoni*. (1) témoins PBS; (2) témoins IgG de lapin sain; (3) IgG α -élastase.

3.1.4. Vaccination génique

Les résultats précédents n'étant pas concluants, et des informations nous étant parvenues, rapportant que l'activité protéolytique était indispensable à l'observation d'une protection avec l'élastase, nous avons choisi d'adopter une stratégie de vaccination génique. L'expression *in situ* doit en effet permettre la production de l'élastase ainsi que son activation par clivage du propeptide.

3.1.4.1. Expression de l'élastase recombinante en cellules Cos

L'ADNc codant pour l'élastase sous forme préproenzyme ainsi que celui codant pour la forme mature ont été sous clonés en vecteur pRc-CMV. Afin de vérifier la fonctionnalité de ces constructions, nous avons réalisé des transfections transitoires en cellules Cos-1. Ces cellules étant surtransfectées avec le SV40, l'expression d'un produit cloné dans un vecteur possédant l'origine de réplication SV40, tel que le vecteur pRc-CMV, doit permettre une production importante de protéine recombinante. Nous avons analysé cette production par trois techniques différentes. Dans un premier temps nous avons observé en ELISA immunocapture la production de l'élastase ainsi que celle de l'élastase mature dans les lysats de cellules transfectées; cependant les taux de production sont très faibles (environ 5ng pour 150000 cellules) (non présenté), même s'ils sont expliqués en partie par le faible pourcentage

de cellules transfectées (20%). Aucune production n'est observée dans les surnageants de culture des cellules. Afin de vérifier ce résultat, nous avons analysé la production en western blot (Fig. 28). On observe la présence de deux bandes dans le cas de l'expression de l'élastase sous forme préproenzyme, et une bande dans le cas de l'élastase mature.

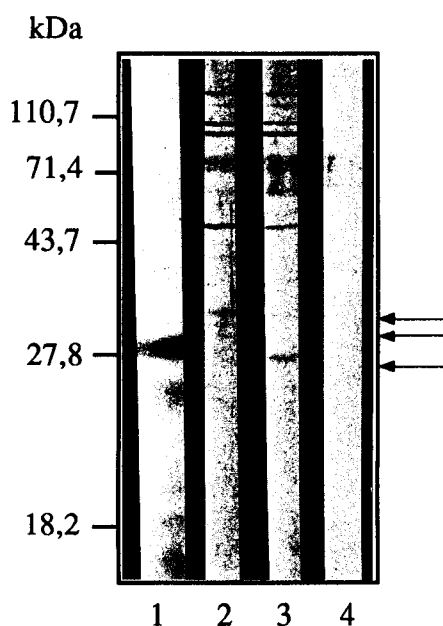


Figure 28: Analyse en western blot de la production de l'élastase en cellules Cos-1. Immunoréactivité du sérum de lapin α -élastase recombinante avec (1) la protéine immunisante (sérum au 1:500), un lysat de cellules transfectées avec les constructions pRc-CMV-EL (2), pRc-CMV-ELm (3), ou pRc-CMV natif (4) (sérum au 1:50).

Afin de compléter cette analyse nous avons effectué une expérience en immunofluorescence avec un des sérums de rat anti-élastase. On observe dans le cas des deux constructions, une fluorescence spécifique après perméabilisation des cellules au triton X-100 0,15% (Fig. 29).

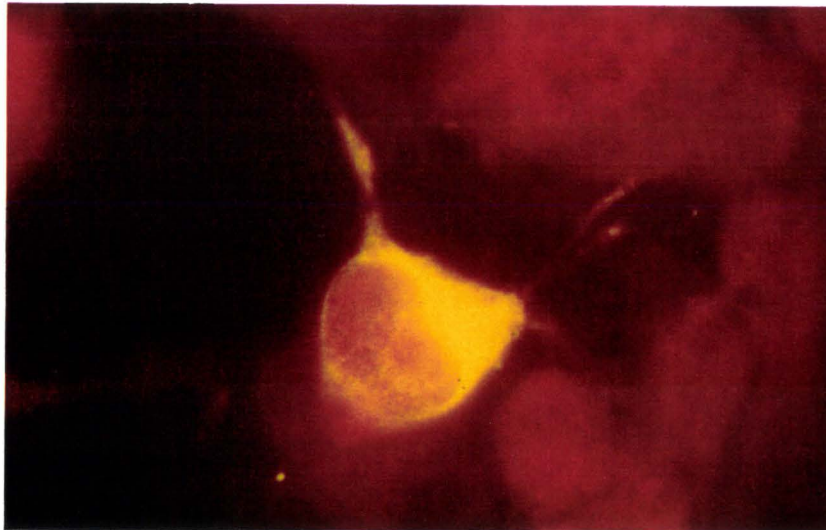


Figure 29: Analyse en immunofluorescence de la production de l'élastase en cellules Cos-1.

3.1.4.2. Analyse de la réponse sérique après immunisation de souris Balb/c par ADN nu

Ayant vérifié la fonctionnalité des constructions réalisées en vecteur pRc-CMV, nous avons immunisé des souris Balb/c avec ces plasmides recombinants par voie intra-dermique, à raison de trois fois 100mg de plasmide/ souris à 14 jours d'intervalle. L'analyse de la réponse sérique anti-élastase a été réalisée par ELISA direct, 21 jours après la dernière injection, et nous n'avons pas détecté de réponse anti-élastase, quelle que soit la construction considérée (pRc-CMV-EL et pRc-CMV-ELm).

3.2. Etude des propriétés immuno-modulatrices de l'élastase chez le rat Fischer

Plusieurs auteurs ont rapporté une immuno-modulation dépendante de l'activité des sérine protéases de *S. mansoni*. Afin d'explorer l'éventuelle participation de l'élastase de cercaires à de tels mécanismes, nous avons, dans un premier temps, abordé la question en étudiant les variations du profil de cytokines produites chez le rat, dues à l'activité des sérine protéases contenues dans un extrait de cercaires (Exp.1), ou à l'activité d'une élastase de la famille des sérine protéases (Exp.2).

3.2.1. Analyse du profil de cytokines après administration d'antigène de cercaire en présence ou non d'inhibiteurs de protéases

Afin de vérifier si la présence d'activité protéolytique peut affecter le profil de production de cytokines, nous avons immunisé des rats Fischer avec un extrait d'antigène de cercaires (stade où nous avons pu montrer la présence maximale de l'élastase de *S. mansoni*, Fig. 14), préparé en présence ou non d'inhibiteurs des familles de protéases potentiellement présentes à ce stade (PMSF: inhibiteur irréversible de sérine protéases; EDTA: inhibiteur réversible de métalloprotéases). A différents temps après immunisation (J3, J7, J10), la production des cytokines IL-12, IL-4 et IFN- γ a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative, suivie d'une hybridation spécifique (Fig. 30). L'amplification de l'ARNm codant pour la β -actine (gène constitutif) permet de vérifier la qualité des préparations d'ARNm. Les résultats obtenus montrent que la production des cytokines IL-12 (non présenté) et IL-4 ne semble pas être affectée par l'inhibition de l'activité protéolytique. Cependant, la production d'IFN- γ semble être augmentée en présence de PMSF et EDTA à J7 et J10 (pistes 5 et 6).

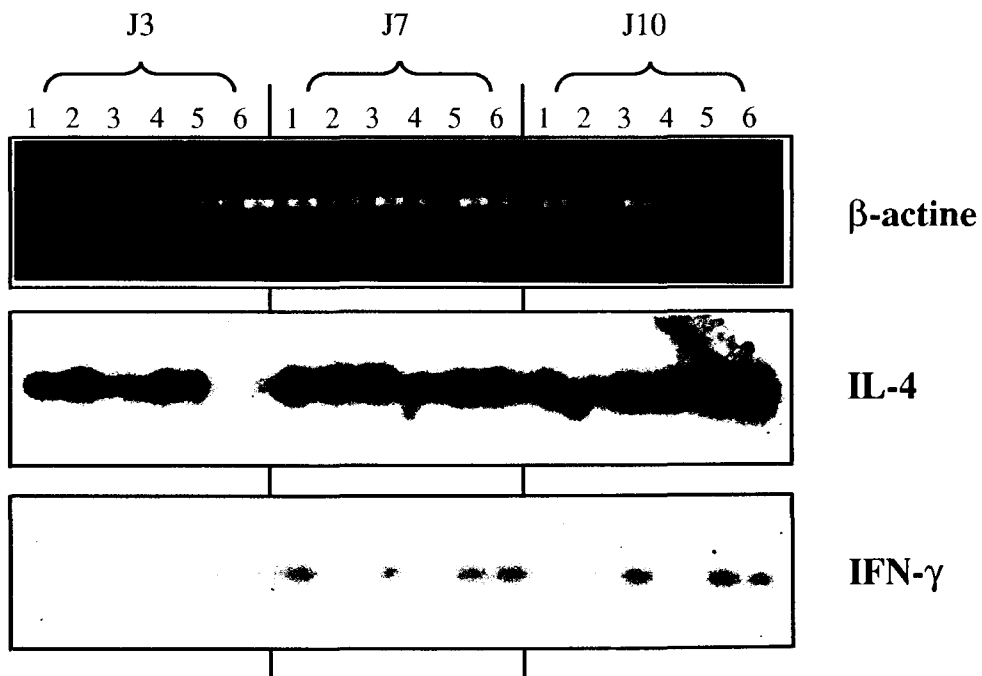
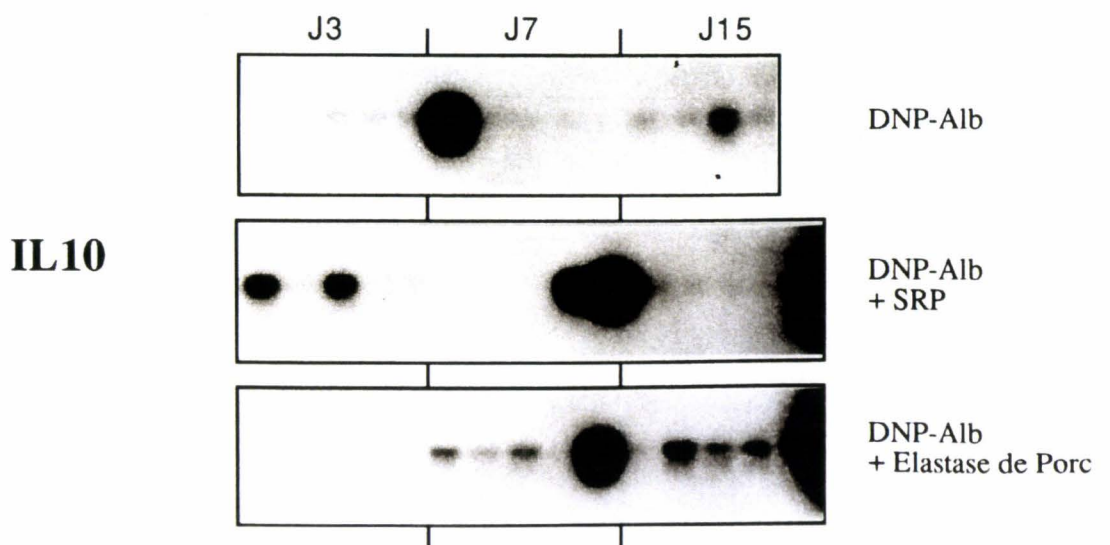
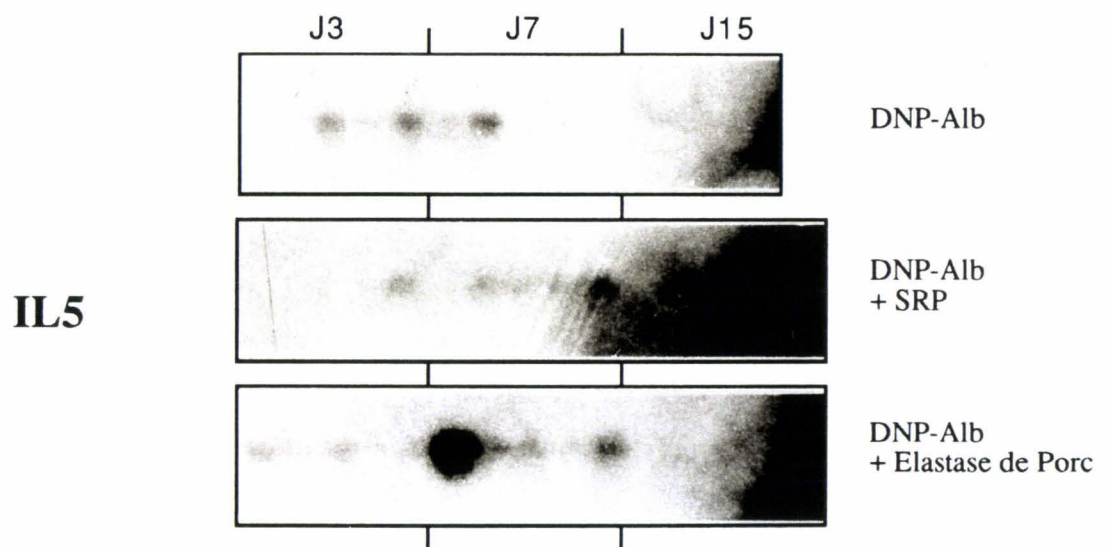
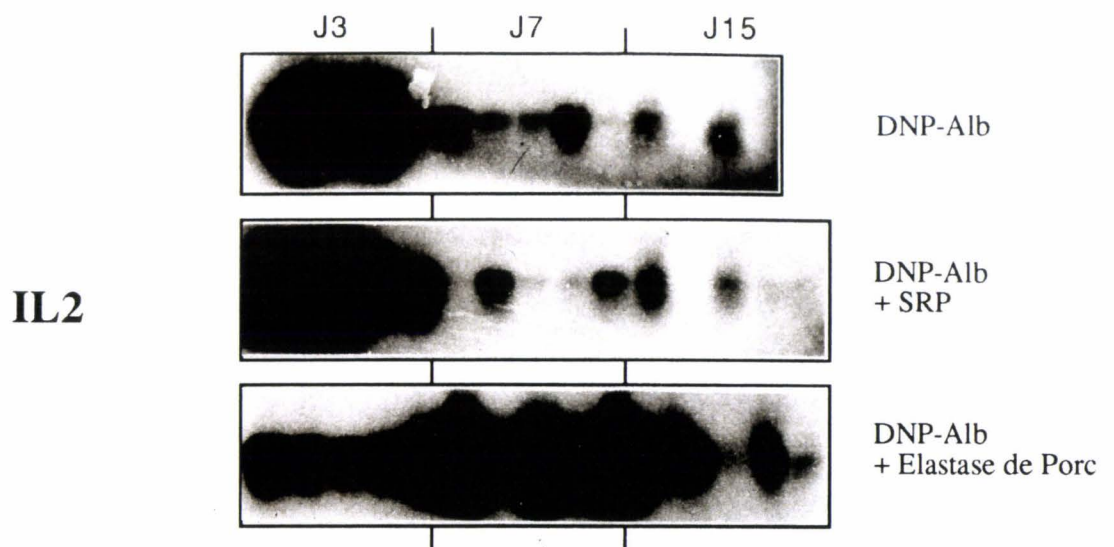


Figure 30: Profil de production d'IL-4 et IFN- γ chez des rats Fischer après administration d'antigène de cercaire en présence (5, 6) ou en absence (3, 4) d'inhibiteurs de protéases. (1, 2) rats témoins. 25 cycles de PCR ont été réalisés sur 2,5 μ g d'ARN extrait à partir des rates. La qualité des préparations d'ARN est vérifiée par la détection de la β -actine.

3.2.2. Analyse du profil de cytokines après administration de SRP ou élastase de porc

Une seconde expérience a été réalisée afin de déterminer le profil de cytokines produites dans le protocole décrit par Verwaerde *et al.* (1986). En effet, ces auteurs ont décrit une augmentation de la production d'IgE spécifiques dépendante de la présence de sérine protéases dans les SRP (produits relargués par les schistosomules). Aussi, nous avons reproduit le même protocole et ajouté un groupe d'animaux recevant en rappel 100ng d'élastase pancréatique de porc, une sérine protéase à activité vis-à-vis de l'élastine. 3 jours, 7 jours et 15 jours après rappel nous avons analysé par RT-PCR qualitative la production des cytokines IL-2, IL-4, IL-5 et IL-10, sur l'ARNm extrait à partir des rates (Fig. 31). Après hybridation spécifique on observe que la production des cytokines IL-4 (non présenté) et IL-5 ne semble pas varier dans les trois groupes d'animaux considérés. Par contre l'analyse de la production d'IL-2 montre que les animaux ayant reçu en rappel l'élastase de porc présentent une très forte réponse à J7, ce qui n'est pas observé pour les deux autres groupes. De même, ce groupe présente un profil de production d'IL-10 différents des autres groupes: à J7 et J15 on observe une production importante d'IL-10 chez 8 animaux sur 10. Ces résultats sont en faveur d'une immuno-modulation due à l'activité protéolytique d'une élastase de la famille des sérine protéases.

Figure 31 (page suivante): Profil de production d'IL-2, IL-5 et IL-10 chez des rats Fischer, après immunisation avec 10µg de DNP-Alb et rappel à J30 avec 1µg de DNP-Alb en présence de SRP ou d'élastase pancréatique de porc. A J3, J7, J15 après le rappel, cinq rats sont sacrifiés et des RT-PCR sont réalisées en conditions saturantes sur l'ARNm extrait à partir des rates (2,5µg).



DISCUSSION

PERSPECTIVES

L'étude et la caractérisation de protéases de *S. mansoni* ont fait l'objet de nombreux travaux qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes de l'infection par ce parasite. Une des grandes familles de protéases indispensables à la survie du parasite est celle des sérine protéases. En effet, ces molécules interviennent aux stades larvaires et leur fonction consiste essentiellement à faciliter invasion et migration du parasite dans l'hôte définitif. La caractérisation de ces molécules permet d'envisager une stratégie de chimiothérapie et l'utilisation d'un inhibiteur de l'élastase a déjà montré l'intérêt d'une telle approche (Cohen *et al.*, 1991). Cependant, l'étude des sérine protéases de *S. mansoni*, outre dans l'optique d'une chimiothérapie, présente beaucoup d'intérêts. Ce sont, en effet, des modèles potentiels dans l'étude de la régulation de l'expression des gènes de *S. mansoni*, mais aussi des candidats dans une stratégie d'immunothérapie.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'élastase de *S. mansoni*. Cette sérine protéase a été identifiée par McKerrow *et al.* (1983) à partir de cercaires, puis caractérisée plus précisément en 1985 par les mêmes auteurs (McKerrow *et al.*, 1985). C'est une molécule possédant une spécificité de substrat assez large; elle est capable de dégrader des macromolécules contenues dans la peau telles que la laminine, la kératine et le collagène de type IV; de plus elle possède la particularité de dégrader les fibres insolubles d'élastine. En 1988, Newport *et al.* (1988) ont cloné et séquencé l'ADNc codant pour cette protéase, et ont suggéré, d'après une étude en northern blot, que son expression était régulée au cours du développement du parasite. Possédant ces informations notre démarche a été orientée par plusieurs questions:

- 1) L'expression de l'élastase est-elle effectivement régulée au cours du développement du parasite, et à quel niveau cette régulation intervient-elle?
- 2) La régulation de l'expression de l'élastase peut-elle s'expliquer par la présence de régions particulières dans la séquence du gène de l'élastase?

3) Peut-on envisager l'utilisation de l'élastase, d'une part en tant que cible du système immunitaire, ou , d'autre part dans une stratégie d'immunomodulation?

Afin de clarifier la discussion des résultats que nous avons obtenu au cours de cette thèse, celle-ci sera divisée en trois parties, correspondant aux trois questions posées.

1. Régulation de l'expression de l'élastase de *Schistosoma mansoni*

Afin de répondre à cette première question, nous avons choisi d'étudier, d'une part la présence de l'ARNm de l'élastase par technique de RT-PCR et, d'autre part, la traduction de ces transcrits en protéine. Il nous fallait dans un premier temps disposer de sondes nucléiques et protéiques. Pour ce qui est de la sonde nucléique, nous avons réalisé une RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides synthétiques dont la séquence est dérivée de celle publiée par Newport *et al.* (1988b). Le fragment obtenu a été séquencé et correspond effectivement à l'ADNc de l'élastase. Quant à l'obtention d'une sonde protéique, elle passait par l'expression d'une élastase recombinante.

Pour cela, nous avons cloné l'ADNc codant pour l'élastase, obtenu par RT-PCR, dans différents vecteurs d'expression. Peu de constructions ont permis d'obtenir la production d'une protéine, et on peut noter que les deux constructions positives correspondent au clonage du fragment d'ADNc codant pour l'élastase mature. En effet, beaucoup de protéases sont produites sous forme de (pré)proenzyme, et Newport *et al.* (1988b) ont montré que c'était le cas de l'élastase de *S. mansoni*. Aussi, lors des essais de clonage en vue de l'obtention d'une protéine recombinante, nous avons testé deux types de constructions: l'une avec l'ADNc entier (comprenant l'ATG), et l'autre avec l'ADNc tronqué de la séquence correspondant aux peptide signal et propeptide, ceci d'après la séquence protéique de l'élastase mature déterminée par Newport *et al.* (1988b). Au vu de nos résultats, il semble donc que les peptide signal et peptide d'activation gênent à la production de l'élastase en système procaryote. Khalife *et al.* (1993) ont exprimé une molécule de *S. mansoni* possédant un peptide signal (la calréticuline); la protéine recombinante exprimée,

tronquée du peptide signal, possède la capacité de fixation au calcium qui la caractérise, ce qui indique que ce peptide et son clivage ne sont pas nécessaires à l'activation de la molécule. Par contre, dans le cas des protéases il semble que le propeptide joue un rôle très important dans l'activation.

En effet, les produits que nous avons obtenus en vecteurs pQE-30 et pET-32 semblent correspondre à l'élastase mature. Cependant, aucun de ces produits ne présente d'activité enzymatique vis-à-vis de l'Azocoll, substrat dégradé par l'élastase de cercaire purifiée (McKerrow *et al.*, 1985). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Une première explication vient de la méthode de production elle-même: en effet, pour les deux vecteurs utilisés, l'élastase est produite dans les corps d'inclusion de la bactérie. Aussi, afin de purifier la protéine, il est nécessaire de dissoudre ces corps d'inclusion dans des conditions dénaturantes (Guanidine 6M). Des dialyses successives contre des concentrations d'urée progressivement décroissantes permettent normalement une renaturation complète de la protéine. Cependant, dans le cas du vecteur pQE-30, la dernière étape de dialyse doit être effectuée en présence de SDS 0,02%, afin d'éviter que la protéine ne précipite. Dans le cas du vecteur pET-32, cette précaution n'est pas nécessaire, cependant la protéine d'intérêt est fusionnée à la Thioredoxine (protéine augmentant la solubilité du produit) ; la protéine de fusion ne présentant pas d'activité enzymatique, nous l'avons digérée par la thrombine, et l'élastase a alors précipité. La production d'une protéine soluble, présentant donc de multiples contraintes, aboutit peut-être à un produit, dont la conformation tri-dimensionnelle ne permet pas le rapprochement dans l'espace des trois acides aminés H, S et D nécessaire à la formation du site catalytique des sérine protéases.

Une autre explication possible de cette absence d'activité de l'élastase recombinante est apportée par l'exemple de la synthèse de l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* décrit par McIver *et al.* (1995). En effet, cette élastase est produite sous forme de pré-proenzyme, et ces auteurs ont suggéré que le propeptide, ou peptide d'activation, joue un rôle de "molécule chaperonne" et soit indispensable pour que l'élastase adopte une conformation tri-dimensionnelle "correcte", et pour qu'elle soit sécrétée à l'extérieur de la bactérie (Fig. 32).

Dans ce modèle, le propeptide joue donc un rôle essentiel dans la production d'une élastase active. Aussi, si on suppose que ce mécanisme peut s'exercer dans le cas de l'élastase de *S. mansoni*, il est possible que le fait d'exprimer un fragment tronqué de la séquence codant pour le propeptide ne permette pas l'obtention d'une élastase active.

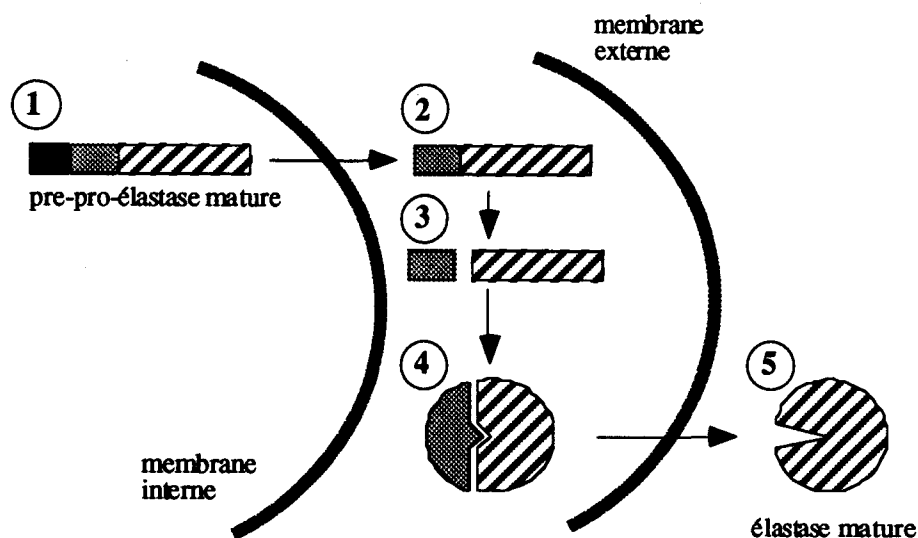


Figure 32: Modèle de sécrétion de l'élastase de *P. aeruginosa* (d'après McIver et al., 1995). 1) expression, dans le cytoplasme, du gène de l'élastase codant pour un précurseur pré-proélastase (53,6 kDa). 2) durant la translocation à travers la membrane interne, le peptide signal est clivé. 3) dans le périplasme la proélastase est rapidement clivée par autoprotéolyse générant une élastase périplasmique de 33 kDa et le peptide d'activation (18 kDa). 4) le propeptide reste associé de façon non covalente à l'élastase et lui confère une conformation qui lui permettra d'être active, tout en inhibant cette activité tant que l'élastase est à l'intérieur de la cellule. 5) l'élastase mature est libérée dans le milieu extracellulaire.

J. McKerrow (1997a) a proposé un autre mécanisme de sécrétion pour la cystéine protéase majeure de *Trypanosoma cruzi* (la cruzipaine): à l'intérieur de l'appareil de Golgi, la proenzyme se fixe à un récepteur spécifique du propeptide; puis dans les lysosomes, le clivage du propeptide permet la libération de l'enzyme mature et son exposition à la surface. Dans ce modèle encore, on souligne le rôle fondamental du propeptide dans la sécrétion de la protéase active. Cependant, dans notre cas, tous les essais d'expression correspondant au clonage du fragment d'ADNc entier de l'élastase (contenant le propeptide) n'ont pas abouti.

La difficulté d'obtention d'une élastase active repose peut-être sur le fait qu'il s'agisse d'une sérine protéase, nécessitant une conformation tri-dimensionnelle avec notamment le rapprochement des trois acides aminés H, S et D. En effet des auteurs ont déjà rapporté le clonage et l'expression d'une élastase active en système procaryote: l'élastase de macrophage exprimée en vecteur pET-5, bien que produite dans les corps d'inclusion de la bactérie présente une activité vis-à-vis de l'élastine (Shapiro *et al.*, 1993). De même, Wan & Loh (1995) ont rapporté le clonage et l'expression de la protéase du VIH en vecteur pGEX et là

encore, la protéase est produite dans les corps d'inclusion et, même fusionnée à la S_j26GST, elle présente une activité enzymatique. Elle est en effet capable de s'autocliner et libérer ainsi une protéase active. Cependant, dans ces deux exemples il s'agit de protéases de la sous famille des métalloprotéases, pour la première, et cystéine protéases pour la seconde. Malgré cela, J.H. McKerrow aurait très récemment réussi à exprimer l'élastase de cercaire sous forme active, en système procaryote: pour ce faire, il a coexprimé une molécule chaperonne (Gro EL), dont le rôle est de protéger et d'assurer un repliement correct de l'élastase jusqu'à sa sécrétion hors de la cellule (J.H. McKerrow, communication personnelle).

Devant la difficulté d'obtenir l'élastase recombinante active en système procaryote, nous avons testé une production en cellules de mammifères: la lignée Cos-1 (cellules de rein de singe) a été choisie car elle est surtransfectée avec le virus SV40 et permet une expression à des taux très importants dans le cas de l'utilisation d'un vecteur possédant l'origine SV40 de réplication épisomale (c'est le cas du vecteur pRc-CMV). Des constructions correspondant à l'élastase sous forme préproenzyme (nommée pRc-CMV-EL) et sous forme mature (pRc-CMV-EL_m) ont été réalisées et analysées notamment en western blot. Contrairement aux résultats obtenus en système procaryote, on observe la production d'élastase dans les deux cas. Cependant le profil obtenu en western blot appelle quelques commentaires; en effet, le clonage de l'ADNc correspondant à l'élastase mature aboutit à la production d'une protéine migrant sur SDS-PAGE de la même façon que la protéine recombinante produite en *E. coli*, ce qui indique que cette protéine n'est pas glycosylée. Par contre, le produit de la construction pRc-CMV-EL donne deux bandes en western blot, toutes deux de taille supérieure à la précédente. On peut supposer que ces deux bandes correspondent au produit préproenzyme pour l'une, et proenzyme, pour l'autre; cependant la différence de taille entre ces deux bandes et celle correspondant à la construction pRc-CMV-EL_m semble trop importante par rapport à la taille du "prépropeptide" de l'élastase tel qu'il a été décrit par Newport *et al.* (1988b) (27 acides aminés, soit 3kDa).

Quant à déterminer si le produit de l'une ou l'autre de ces constructions présente une activité protéolytique, cela reste un problème; en effet, les taux d'expression observés en transfection transitoire (5ng/150000 cellules, déterminé en ELISA immunocapture) sont trop faibles pour espérer détecter une activité enzymatique. Il serait nécessaire de travailler sur des clones stables afin d'obtenir de plus grandes quantités d'élastase recombinante. Quoi qu'il en soit, le fait de n'observer en western blot aucune bande à la taille du produit mature dans le cas de la construction pRc-CMV-EL laisse présager que ce produit ne serait pas actif.

Dans la suite de notre étude, nous avons donc exclusivement travaillé avec la protéine recombinante produite en système procaryote en vecteur pQE-30. Cette protéine, bien que non active, possède en effet deux caractéristiques importantes: d'une part elle est antigénique puisque reconnue en western blot par un anti-sérum de lapin dirigé contre les produits relargués par la cercaire et, d'autre part, elle est immunogénique. Ainsi, une seule injection à des rats Fischer ou à des souris Balb/c (résultat non présenté) en présence d'adjuvant complet de Freund suffit pour l'obtention d'un sérum capable de reconnaître en western blot l'élastase native au sein d'un extrait de cercaires. Quant au sérum de lapin, il en est de même, excepté qu'il aura fallu un rappel en présence d'adjuvant incomplet de Freund.

Ce sérum de lapin nous a permis par la suite d'aborder la régulation de l'expression de l'élastase au cours du développement du parasite, ainsi que sa localisation.

L'étude de la régulation de l'expression de l'élastase au cours du développement de *S. mansoni* a été menée au niveau de l'ARNm ainsi qu'au niveau protéique.

Dans un premier temps, nous avons montré par RT-PCR la présence de l'ARNm codant pour l'élastase aux trois stades étudiés (oeuf, cercaire, ver adulte), ce qui est en contradiction avec les résultats publiés, obtenus en northern blot (Newport *et al.*, 1988b). En effet, ces auteurs ont rapporté l'absence du transcrit de l'élastase chez les vers adultes, et cela peut s'expliquer par la faible sensibilité de la technique de northern blot, comparée à celle de la RT-PCR. De plus, nous avons montré par RT-PCR semi-quantitative qu'à ce stade, l'ARNm de l'élastase était effectivement moins représenté qu'au stade cercaire.

Dans un second temps, nous avons étudié la présence de la protéine au cours du développement du parasite. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé des expériences en western blot et, devant la faible sensibilité de détection de cette technique, nous avons mis au point un dosage ELISA en immunocapture, spécifique de l'élastase de *S. mansoni*. Ce dosage nous a permis de quantifier l'élastase au sein de préparations antigéniques obtenues aux différents stades du parasite, et de montrer ainsi la présence de cette protéase majoritairement aux stades larvaires, et son absence au stade ver adulte. Notons que le sérum de lapin anti-élastase recombinante utilisé dans ces expériences reconnaît vraisemblablement l'élastase sous ses formes préproenzyme et mature, ce qui pourrait expliquer le doublet observé en western blot sur l'antigène total des différents stades de *S. mansoni* (Fig. 13). Ainsi, même sous forme non active l'élastase est absente au stade ver adulte.

Ces résultats confirment des résultats d'analyses immunologiques et enzymatiques (Gazzinelli & Pellegrino, 1964; Pino Heiss *et al.*, 1986; Keene *et al.*, 1983) suggérant que l'expression de l'élastase était stade-spécifique et hautement contrôlée. De plus, il est intéressant de noter que notre étude en RT-PCR a révélé la présence de l'ARNm de l'élastase dans tous les stades étudiés de *S. mansoni*. Ceci indique donc que l'activité basale du promoteur du gène de l'élastase n'est pas stade-spécifique, ce qui impliquerait une absence de contrôle au niveau de l'initiation de la transcription. Cependant, l'expression de la protéine est régulée, et cette régulation peut s'expliquer de deux façons: tout d'abord, le fait de ne pas détecter l'élastase au stade adulte suggère que le parasite utilise une forme de contrôle au niveau traductionnel, empêchant la traduction de l'ARNm à ce stade. Ce phénomène a déjà été décrit chez *S. mansoni* dans le cas de la glutathion peroxydase (Roche *et al.*, 1996). En effet, l'ARNm de la GSHpx est présent aussi bien aux stades larvaires que vers adultes, mais il n'est traduit que chez les vers adultes.

Une autre hypothèse peut expliquer la régulation de l'expression de l'élastase: la différence de niveau d'expression entre les stades larvaires et les oeufs peut non seulement s'expliquer par un contrôle de la traduction, mais aussi par l'éventuelle présence de facteurs nucléaires intervenant dans une potentialisation de l'activité promotrice. Dans le cas de l'élastase, ces facteurs seraient sur-exprimés aux stades larvaires.

Une expérience d'immunolocalisation de l'élastase menée sur des coupes de cercaires envahissant la peau de souris, nous a permis de montrer que cette protéase, initialement présente dans les glandes acétabulaires de la cercaire (Fig. 4), est largement sécrétée durant la phase d'invasion. Ce résultat est en accord avec le rôle de cette enzyme et étend les observations de Fishelson *et al.* (1992).

2. Etude du gène de l'élastase de *S. mansoni*

Chez *Schistosoma mansoni*, de nombreuses protéases ont été caractérisées (Tableau VII) et l'expression de la plupart d'entre-elles semble être régulée au cours du développement du parasite (Fig. 5). Les gènes codant pour ces protéases sont donc des outils de choix pour l'étude du contrôle, par le parasite, de l'expression de molécules clés au cours de son développement. Dans le but de comprendre le mécanisme à l'origine de la régulation de

l'expression de l'élastase, tout du moins dans sa composante transcriptionnelle, nous avons donc étudié le gène de cette protéase. L'identification de régions promotrices et la compréhension de leur fonctionnement dans l'éventualité d'une intervention destinée à bloquer l'expression de cette enzyme justifiaient également cette étude.

Dans un premier temps, le criblage d'une banque génomique de *S. mansoni* disponible dans le laboratoire, nous a permis d'isoler un clone. Ce clone s'est révélé contenir la copie complète du gène de l'élastase. La séquence de ce clone, comparée à celle de l'ADNc de l'élastase, publiée par Newport *et al.* (1988b), a révélé l'existence de deux introns de 144 et 604pb. L'analyse de la région 5' non codante a permis d'identifier plusieurs séquences pouvant être impliquées dans la régulation de l'expression de ce gène. Ainsi, parallèlement aux éléments "classiques" tels que la TATA box et la CCAAT box (celle-ci étant dans une orientation inversée), on remarque la présence de plusieurs sites consensus de reconnaissance pour les facteurs de transcription AP-1 et NF-IL6. Des sites AP-1 ont déjà été décrits sur plusieurs gènes du schistosome (Sm28GST et calréticuline). Serra *et al.* (1996) ont montré *in vitro* que l'activité promotrice du gène de la Sm28GST dépendait de la présence de deux CCAAT box et d'un site AP1. Il est connu que la transactivation du facteur liant le site AP-1 (hétérodimère Fos-Jun) est régulée par les antioxydants. Ainsi, par l'utilisation d'un précurseur du glutathion (N-Acétyl cystéine) et délétion du site AP-1, Khalife *et al.* (1995) ont montré la fonctionnalité de ce site présent dans la région promotrice du gène de la calréticuline. Par ailleurs, il est intéressant de noter les travaux de Lengeyl *et al.* (1995) montrant que l'augmentation de l'expression du gène de l'urokinase par le TNF- α nécessite la présence d'un site AP-1 dans la région promotrice de ce gène. Il semble que le TNF- α agisse sur l'expression et/ou l'activation du facteur de transcription liant le site AP-1.

Quant au site NF-IL6, il n'a jusqu'à présent pas été décrit sur d'autres gènes de *S. mansoni*. Cependant, une analyse des séquences des gènes de l' α -tubuline ainsi que la calréticuline disponibles dans la banque de données, nous a permis de montrer que ce site était également présent dans les régions 5' non codantes de ces gènes. Il serait donc intéressant de comparer la régulation de l'expression de ces antigènes. Le site NF-IL6 est une séquence de reconnaissance pour le facteur NF-IL6 (pour "Nuclear Factor for IL-6 expression"), dont l'expression est augmentée par l'IL-1, l'IL-6 ou les lipopolysaccharides. Ce facteur peut non seulement se fixer sur la séquence de reconnaissance de l'IL-1 présente notamment sur le gène de l'IL-6, mais également sur celle de l'IL-6 ("IL-6 responsive

element") participant ainsi à l'augmentation de l'expression des protéines inflammatoires de la phase aigüe synthétisées dans le foie (Akira *et al.*, 1990).

Il est difficile d'évaluer le rôle d'un tel facteur de transcription chez *S. mansoni* si toutefois sa fonctionnalité était démontrée; cependant, sachant que l'expression de ce facteur est régulée par des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-6, on peut supposer que le parasite pourrait détourner la réponse inflammatoire qu'il génère chez l'hôte à son profit afin d'augmenter la synthèse d'antigènes (élastase, calréticuline et α -tubuline). Il serait donc intéressant d'étudier la fonctionnalité d'un tel site, présent une fois dans une orientation "sens" et trois fois dans une orientation "antisens" dans la région promotrice du gène de l'élastase. Cependant cette étude est actuellement limitée par l'absence de lignée cellulaire de *S. mansoni*. Il serait par contre possible d'étudier les variations d'expression de l'élastase observées *in vitro* chez des schistosomules cultivés en présence d'IL-6.

L'analyse de la région promotrice de l'élastase de *S. mansoni* a également montré la présence de séquences répétées et inversées. Pour l'une d'entre-elles, la séquence inversée correspondante est présente dans la région 3' non codante. Le rôle de tels motifs n'est pas connu, mais il est possible qu'ils participent à la formation de boucles au sein du gène favorisant le rapprochement dans l'espace notamment de la région 3'. Ceci pourrait intervenir dans la régulation de l'expression du gène.

Le clonage du gène EL1 de l'élastase, bien qu'apportant des informations quant à la régulation de l'expression de cette enzyme, a soulevé quelques questions. En effet, la description de ce gène ne correspond pas à celle apportée dans une revue par McKerrow *et al.* (1991): ces auteurs, ainsi que Newport *et al.* (1988b) ont discuté de l'existence d'un gène unique de l'élastase contenant un seul intron, et possédant une région 5' non codante différente de celle que nous avons séquencée. Or, le profil obtenu en Southern sur l'ADNg (Fig. 19) serait plutôt en faveur de l'existence d'au moins deux gènes de l'élastase. Une expérience de PCR menée sur l'ADNg a effectivement confirmé cette hypothèse, et nous a permis d'identifier un second gène EL2 codant pour l'élastase, vraisemblablement moins représenté dans le génome de *S. mansoni*, comparé à EL1. L'organisation et la séquence de ce second gène sont très similaires à celles de EL1. L'identité notamment au niveau des séquences des oligonucléotides SP1 et SP2 explique l'obtention des deux produits en PCR. La séquence d'acides aminés déduite de EL2 présente 80% d'identité avec celle déduite de EL1. Cependant on note l'absence dans le produit de EL2 de l'acide aspartique appartenant

au site catalytique caractéristique des sérine protéases. Ainsi, si le gène EL2 est fonctionnel, le produit ne serait pas actif. En effet, Graf *et al.* (1987) ont montré le rôle indispensable de l'acide aspartique dans l'observation de l'activité protéolytique de la trypsine (sérine protéase). Toutefois, il est difficile d'évaluer l'expression du produit de EL2: les pI des produits de EL1 et EL2 sont effectivement très semblables, ce qui exclut la possibilité de séparer les deux éventuelles protéines en électrophorèse bidimensionnelle. De plus, en RT-PCR on ne détecte qu'un fragment, cependant les tailles des deux éventuels produits sont identiques à quelques bases près. Néanmoins, lors du séquençage des produits de RT-PCR aux différents stades parasitaires, plusieurs clones ont été séquencés partiellement et semblent tous correspondre au produit de EL1. Ces éléments semblent donc indiquer que EL2 serait plutôt un pseudo-gène, dans le sens où il ne serait pas traduit. L'existence de pseudo-gènes n'a jusqu'à présent pas été décrite chez *S. mansoni*, cependant c'est un phénomène courant dans le cas des sérine protéases de mammifères: l'analyse des gènes de la kallikréine chez la souris a montré qu'il s'agissait d'une famille multigénique, dont 14 gènes codent potentiellement pour des protéines fonctionnelles et 10 sont des pseudo-gènes (Evans *et al.*, 1987).

3. L'élastase de *S. mansoni*: cible et /ou immunomodulateur?

Au regard des résultats obtenus lors des expériences d'immunolocalisation, et plus largement du rôle de l'élastase chez *S. mansoni*, il est raisonnable de penser que cette enzyme, largement sécrétée, peut être une cible pour le système immunitaire de l'hôte. Aussi, dans un premier temps, nous avons étudié la cytotoxicité médiée par les anticorps anti-élastase recombinante en présence de cellules effectrices. Avant cela, il nous fallait vérifier que l'élastase était effectivement accessible aux anticorps chez les schistosomules. Cela a été montré par des expériences d'immunofluorescence menées sur des schistosomules "peau" avec les sérums de rats anti-élastase recombinante (résultat non présenté). Ainsi, nous avons effectivement pu montrer que des anticorps anti-élastase pouvaient participer *in vitro* à des

phénomènes de cytotoxicité dépendante d'anticorps, (4/5 rats présentent 30% de cytotoxicité) en présence de macrophages. De plus, la cytotoxicité observée est associée au taux d'IgG2a anti-élastase (Fig. 25 & 26); ceci est en accord avec les travaux de Grzych *et al.* (1984) montrant que, chez le rat, les anticorps effecteurs sont d'isotype IgG2a, alors que leur activité peut être bloquée par les IgG2c (isotype non détecté dans notre cas). Les anticorps d'isotype IgE étant particulièrement impliqués dans l'immunité anti-schistosome chez le rat, il aurait été intéressant d'étudier la cytotoxicité dépendante d'IgE anti-élastase. Cependant, nous n'avons pu détecter en ELISA la présence d'IgE anti-élastase dans les sérums de rat immunisés avec cette protéase (non présenté). Ceci peut s'expliquer par le mode d'immunisation que nous avons utilisé: afin d'induire la production d'IgE, il aurait été préférable d'immuniser les animaux en présence d'hydroxyde d'aluminium, plutôt que d'utiliser l'adjuvant complet de Freund.

Cette cytotoxicité décrite chez le rat est également observée en système hétérologue: le sérum de lapin anti-élastase recombinante présente 42% de cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules en présence de macrophages de rat (non présenté). Ces résultats, couplés aux travaux de Moloney *et al.* (1990) montrant que le transfert passif d'un sérum de lapin immunisé avec des cercaires irradiées, pouvait entraîner une protection chez la souris, nous ont incités à réaliser le même type d'expérience chez le rat avec les IgG de lapin anti-élastase purifiées. Cependant, alors que 10 jours après transfert passif de ces IgG on détecte encore leur présence dans les sérums de rat, aucune protection n'est observée en termes de réduction du nombre de vers dans le foie, 21 jours après l'infestation. Ce résultat peut s'expliquer soit par le trop faible pourcentage de cytotoxicité observé pour les IgG anti-élastase, soit par un problème de protocole expérimental. En effet, vu le rôle et la présence majoritaire de l'élastase dans les stades larvaires du parasite (Fig. 14), nous avons administré par voie intra-veineuse les IgG anti-élastase 1h avant l'infestation d'épreuve, un rappel ayant été effectué 48h après. Ce schéma est peut-être insuffisant et il est possible que des injections à la fois plus précoces et plus répétées auraient donné de meilleurs résultats.

Toutefois, nous avons préféré envisager d'étudier la protection conférée suite à des immunisations directes. En effet, lors de congrès de la British Society for Parasitology (1996, 1997), des auteurs ont montré que certaines souris (5/16) immunisées avec les produits relargués par la cercaire de *S. mansoni*, étaient protégées à hauteur de 47% en termes de réduction de la charge parasitaire et 62% en termes de réduction du nombre d'oeufs. Ces souris correspondent exclusivement à celles qui présentent une réponse anti-

élastase (Yousofi Darani *et al.*, 1996; Doenhoff *et al.*, 1997). Ces travaux nous ont confortés dans l'idée que l'élastase de cercaires pouvait effectivement posséder des capacités protectrices. Cependant, lors d'une communication au congrès de Keystone, USA (1996), J. McKerrow (1996) a signalé que d'après ses travaux, la protection observée après administration de l'élastase dépendait de l'activité protéolytique de celle-ci. L'élastase recombinante que nous avons produite en *E. coli* ne présentant pas d'activité, nous avons choisi de "contourner" ce problème par une stratégie de vaccination génique.

La vaccination génique est une technique récente, initiée par les travaux de Ulmer *et al.* (1993) sur le virus de l'Influenza A, consistant à injecter chez l'animal un plasmide contenant la séquence nécessaire à l'expression d'une protéine à propriétés vaccinales. On assiste alors à une réponse cellulaire et humorale et, dans certains modèles les animaux présentent une protection significative. Dans le cas de la schistosomiase, Yang *et al.* (1995) ont montré la production d'anticorps anti-paramyosine de *S. japonicum* induite par vaccination génique. Dupré *et al.* (soumis pour publication) ont également obtenu, suite à une administration par voie intradermique, une réponse anticorps anti-Sm28GST, susceptible de conférer une protection à des rats.

Nous avons choisi cette même voie afin de tester l'hypothèse que nous formulions: l'injection d'un plasmide contenant la séquence d'ADNc codant pour l'élastase (EL et ELM) permet-elle une expression de cette protéase sous forme active, et la production d'anticorps anti-élastase? Auparavant, nous avons vérifié par transfection dans des cellules Cos-1 la fonctionnalité des constructions plasmidiques utilisées. Cependant, 21 jours après la troisième injection de plasmide recombinant (3 injections de 100µg à 14 jours d'intervalle), aucune réponse anti-élastase n'est détectée dans les sérums de souris immunisées. Les mécanismes mis en jeu *in vivo* conduisant à la production d'anticorps suite à une immunisation par ADN nu étant mal connus, il est difficile d'apporter une explication à un tel résultat. Cependant, la fonctionnalité des constructions ayant été vérifiée *in vitro*, l'éventualité d'une non traduction en protéine peut être écartée. L'immunogénicité de l'élastase semble plutôt être en cause. En effet, Toy *et al.* (1987) ont montré, à partir d'études sur des sérums d'infections humaines et expérimentales, que l'immunogénicité de cette protéase était relativement faible, et qu'aucune réponse mémoire n'était observée. Une hypothèse pouvant expliquer cette faible immunogénicité a été apportée par J. McKerrow (1997b): l'élastase étant une des premières molécules du parasite vue par l'hôte, il semblerait que cette molécule soit "adaptée" à l'hôte ; ainsi, tout en conservant l'activité protéolytique de

l'enzyme, le parasite présenterait au système immunitaire des parties peu immunogènes de l'élastase, de sorte que l'hôte ne produise pas de réponse efficace. Ceci pourrait être facilité par l'interaction de l'enzyme avec des inhibiteurs de l'hôte, comme suggéré par les travaux de Modha & Doenhoff (1994a) ou bien avec un inhibiteur propre au parasite tel que le Smpi56 (Ghendler *et al.*, 1994).

Quel que soit le mécanisme à l'origine de la non-immunogénicité de l'élastase, il semble que celle-ci soit due à l'activité de l'enzyme. En effet, on a pu remarquer que l'élastase recombinante non active produite en *E. coli* est très immunogène dans différents modèles animaux. Il serait donc intéressant de tester si l'élastase recombinante peut permettre l'induction d'une réponse contre l'élastase native et protéger ainsi contre une infection par *S. mansoni*. Pour cela, nous avons réalisé une expérience d'immunisation directe de l'élastase recombinante à des rats. Cette expérience est actuellement en cours et l'éventuelle protection observée 21 jours après une infestation d'épreuve pourra nous permettre de répondre à cette question.

Actuellement, les études s'inscrivant dans la recherche d'un moyen de lutte contre les schistosomiasés s'orientent vers la caractérisation de composantes de la réponse immune impliquées dans la protection. Dans ce contexte, de nombreuses études expérimentales ont établi que les réponses immunitaires (humorale et cellulaire) sont souvent orientées au cours des infections parasitaires. Ce n'est que récemment que ces observations ont trouvé une explication lors de la mise en évidence de la capacité des lymphocytes T à produire soit des cytokines de type Th1 (IL-2, IFN- γ et IL-12) soit des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10).

Dans l'infection par *S. mansoni*, la nature des lymphocytes impliqués dans l'immunité peut être à la fois de type Th1 (réponse cellulaire) et/ou de type Th2 (réponse anticorps) dans l'infection murine (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991; Coulson, communication personnelle). Chez l'homme, des études immuno-épidémiologiques réalisées dans le cas d'infections à *S. haematobium* et *S. mansoni* ont montré une corrélation positive entre la production d'anticorps IgE, isotype sous contrôle de l'IL-4, et l'immunité à la réinfection. De plus, une étude a montré une corrélation entre le taux d'IL-5 (cytokine impliquée dans la différenciation des éosinophiles) sécrétée en réponse à une stimulation par l'antigène d'oeuf

et la résistance à l'infection à *S. mansoni* observée chez des enfants moins de 15 ans (Roberts *et al.*, 1993). Chez le rat, hôte semi-permissif, des études menées dans notre laboratoire ont montré que les cytokines produites pendant la phase précoce de l'infection sont principalement de type Th2 (Cêtre *et al.*, manuscrit en préparation). Par contre, aucune augmentation significative de l'IFN- γ , composante essentielle de l'immunité cellulaire, n'a été détectée au cours de l'infection. Ces résultats suggèrent que les cytokines de type Th2 peuvent être non seulement impliquées dans le phénomène d'expulsion des vers entre la troisième et la quatrième semaine d'infection, mais aussi responsables de l'expression de l'immunité à la réinfection observée chez le rat (Capron & Capron, 1986). Il semble donc que des molécules d'origine parasitaire sont capables de polariser la réponse immune vers une production de cytokine de type Th2. Sachant le rôle bénéfique de ces cytokines pour l'hôte, on voit donc l'intérêt de caractériser et d'exprimer les molécules capables de polariser la réponse immune vers ce profil.

Or plusieurs travaux convergent vers l'hypothèse que les protéases seraient de bons candidats. Ainsi, Urban *et al.* (1992) ont montré que la papaïne, une cystéine protéase, peut augmenter *in vitro* l'expression du gène de l'IL4 (profil Th2), ainsi que la réponse anticorps IgE. De plus, Mottram *et al.* (1997) ont montré que des souris infectées par une souche de *Leishmania mexicana* déficiente pour le gène codant une cystéine protéase produisaient une réponse cytokine de type Th1, en déplaçant la réponse d'un type Th2 initialement produite.

Dans le cas de la schistosomiase Vewaeerde *et al.* (1986, 1988) ont montré que la régulation de la synthèse des immunoglobulines d'isotype IgE *in vitro* et *in vivo* dépendait de la présence de molécules à activité protéolytique: les sérine protéases. Deux molécules de 27,5 kDa et 29 kDa ont été identifiées dans les produits relargués par le schistosomule comme étant responsables de cet effet.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que le mécanisme de polarisation de la réponse immune par les sérine protéases peut s'expliquer par une augmentation de l'expression de cytokines de type Th2 et/ou par une diminution de l'expression de cytokines de type Th1. Au cours de cette thèse, nous avons produit l'élastase de *S. mansoni*, cependant, quel que soit le système d'expression utilisé, la protéine recombinante ne présente pas d'activité protéolytique. Or les travaux de Verwaerde *et al.* (1986, 1988) indiquaient que la modulation observée dépendait de l'activité des sérine protéases. Afin de contourner ce problème, nous avons utilisé une élastase purifiée à partir du pancréas de porc. Auparavant,

nous avons évalué, chez le rat, le rôle polarisateur des sérine protéases contenues dans des extraits totaux d'antigènes de cercaires (stade où l'élastase est majoritairement exprimée, Fig. 14) en présence ou non de PMSF (inhibiteur de sérine protéases). Dans le cas où nous avons utilisé l'élastase de porc, seule une analyse qualitative par RT-PCR nous a permis de détecter une augmentation de l'expression de l'IL-10 (type Th2). Par contre, nous n'avons pas détecté de différence dans l'expression de l'IL-4 et l'IL-5 entre le groupe immunisé et le groupe contrôle. Il semble donc que l'élastase pancréatique de porc, une sérine protéase, augmente l'expression de l'IL-10, mais le rôle de cette cytokine dans l'induction de la réponse IgE reste à définir. Quand nous avons utilisé les extraits totaux d'antigènes en présence ou non de PMSF, les résultats obtenus semblent indiquer une diminution de l'expression de l'IFN- γ plutôt qu'une augmentation de l'expression de l'IL-4. La résultante de ce déséquilibre permettrait l'établissement d'une réponse de type Th2.

Cependant, il est important de corréler la présence de l'élastase essentiellement aux stades larvaires du parasite, avec l'apparition de la réponse Th2 chez le rat seulement 11 jours après l'infestation. Il est donc peu probable que l'élastase seule soit impliquée dans l'établissement de cette réponse Th2. Aussi, actuellement, nous nous attachons à caractériser de nouvelles sérine protéases chez *S.mansoni* (Cocude *et al.*, sous presse).

L'ensemble de ces résultats seraient donc en faveur du rôle des sérine protéases dans l'induction ou dans l'établissement d'une réponse de type Th2. Cependant il faut garder à l'esprit qu'une réponse protectrice est à la fois dépendante des anticorps d'isotype IgE et des éosinophiles; ainsi, la ou les molécules de choix pour polariser la réponse immune devrait(ent) à la fois produire des cytokines impliquées dans l'induction de la réponse IgE (IL-4) et dans la différenciation des éosinophiles (IL-5). De plus, le recrutement de ces composantes dans les tissus où le parasite réside soulève un problème important.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABEL, L., DEMENAI, F., PRATA, A., SOUZA, A.E. & DESSEIN, A. (1991) Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Human Genetic* **48**, 959-970.
- ACTOR, J.K., SHIRAI, M., KULLBERG, M.C., BULLER, R.M.L., SHER, A. & BERZOFKY, J.A. (1993) Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 948-954.
- ACTOR, J.K., MARSHALL, M.A., ELTOUM, I.A., BULLER, R.M.L., BERZOFKY, J.A. & SHER, A. 1994. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. *European Journal of Immunology* **24**, 3050-3056.
- AKIRA, S., ISSHIKI, H., SUGITA, T., TANABE, O., KINOSHITA, S., NISHIO, Y., NAKAJIMA, T., HIRANO, T. & KISHIMOTO, T. (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO Journal* **9**, 1897-1906.
- ALTIERI, D.C. (1995) Proteases and protease receptors in modulation of leucocyte effector functions. *Journal of Leucocyte Biology* **58**, 120-127.
- AMIRI, P., LOCKSLEY, R.M., PARSLow, T.G., SADICK, M., RECTO, E., RITTER, D., AND MCKERROW, J.H. (1992) Tumor necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* **356**, 604-606.
- AMORY-SOISSON, L.M., MASTERSON, C., TOM, T.D., McNALLY, M.T., LOWELL, G.H. & STRAND, M. (1992) Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *Journal of Immunology* **149**, 3612-3620.
- ANDRESEN, K., TOM, T.D. & STRAND, M. (1991) Characterization of cDNA encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 15085-15090.
- ASCH, H.L. & DRESDEN, M.H. (1979) Acidic thiol proteinase activity of *Schistosoma mansoni* egg extracts. *Journal of Parasitology* **65**, 543-549.

AURIAULT, C., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. (1980) Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by *Schistosoma* larvae proteases. *Immunology Letters* **2**, 135-139.

AURIAULT, C., OUASSI, M.A., TORPIER, G., EISEN, H. & CAPRON, A. (1981a) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunology* **3**, 33-44.

AURIAULT, C., PESTEL, J., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. (1981b) Interaction between macrophages and *Schistosoma mansoni* schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cellular Immunology* **62**, 15-27.

AURIAULT, C., PIERCE, R., CESARI, I.M. & CAPRON, C. (1982a) Neutral protease activities at different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in mammalian hosts. *Comparative and Biochemical Physiology* **72B**, 377-384.

AURIAULT, C., CAPRON, M. & CAPRON, C. (1982b) Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Cellular Immunology* **66**, 59-69.

AURIAULT, C., JOSEPH, M., TARTAR, A & CAPRON, A. (1983a) Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of human IgG. *FEBS Letters* **153**, 11-15.

AURIAULT, C., CAPRON, M., CESARI, I.M. & CAPRON, A. (1983b) Enhancement of eosinophil effector function by soluble factors released by *S. mansoni*: role of proteases. *Journal of Immunology* **131**, 464-470.

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

AURIAULT, C., JOSEPH, M., TARTAR, A., BOUT, D., TONNEL, A.B. & CAPRON, A. (1985) Regulatory role of a tripeptide (TKP) from the second constant domain of Immunoglobulin G. I. Inhibition of rat and human macrophage activities. *International Journal of Immunopharmacology* **7**, 73-79.

BALLOUL, J.M., SONDEMEYER, P., DREYER, D., CAPRON, M. GRZYCH, J.M., PIERCE, R.J., CARVALLO, D., LECOCQ, J.P. & CAPRON, A. (1987a) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes? *Nature* **326**, 149.

BALLOUL, J.M., BOULANGER, D., SONDERMEYER, P., DREYER, D. CAPRON, M., GRZYSCH, J.M., PIERCE, R.J., CARVALLO, D., LECOCQ, J.P. & CAPRON, A. (1987b) Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli*. In: Molecular Paradigms for the eradication of helminth parasites. A.J. MacInnis, ed, Alan R. Liss, New York, pp 77-84.

BANDA, M.J. & WERB, Z (1981) Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. *Biochemical Journal* **193**, 589-605.

BARRET, A.J. (1977) Introduction to the history and classification of proteinases. In: Proteinases in mammalian cells and tissues, Barret A.J. ed., Amsterdam, Elsevier, pp 1-56.

BASCH, P.F. & BASCH, N. (1984) Intergeneric reproductive stimulation and parthenogenesis in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **89**, 369-376

BASCH, P.F. (1990) Why do schistosome have separate sexes? *Parasitology Today* **6**, 160-163.

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

BERNICK, J. J. & SIMPSON, J.W. (1976) Distribution of elastase-like activity among snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology* **54**, 51-54.

BIONDI, C. (1896) *Virchows Archiv* **144**, 373-400.

BIRKEDAL-HANSEN, H., MOORE, W.G.I., BODDEN, M.K., WINDSOR, L.J., BIRKEDAL-HANSEN, B., DECARLO, A. & ENGLER, J.A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **4**, 197-250.

BLEACKLEY, R.C., LOBE, C.G., DUGGAN, B. EHRMAN, N., FREGEAU, C., MEIER, M., LETELLIER, M., HAVELE, C., SHAW, J. & PAETKAN, V. (1988) The isolation and

characterization of a family of serine protease genes in activated cytotoxic T lymphocytes. *Immunological Reviews* **103**, 5-19.

BOBEK, L.A., REKOSH, D.M. & LO VERDE, P.T. (1988) Analysis of a small gene family encoding an egg shell (chorion) protein of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 3008-3016.

BOBEK, L.A., LO VERDE, P.T. & REKOSH, D.M. (1989) *Schistosoma haematobium*: Analysis of egg shell protein genes and their expression. *Experimental Parasitology* **68**, 17-30.

BONTEMPI, E., FRANKE DE CAZZULO, B.M., RUIZ, A.M. & CAZZULO, J.J. (1984) Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 43-48.

BOULANGER, D., REID, G.D.F., STURROCK, R.F., WOLOWCZUK, I., BALLOUL, J.M., GREZEL, D., PIERCE, R.J., OTIENO, M.F., GUERRET, S., GRIMAUD, J.A., BUTTERWORTH, A.E. & CAPRON, A. (1991) Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **13**, 473-490.

BRAUN BRETON, C., BLISNICK, T., JOUIN, H., BARALE, J.C., LANGSLEY, G. & PEREIRA DA SILVA, L.H. (1992) *Plasmodium chabaudi* p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 9647-9651.

BRAUN BRETON, C. & PEREIRA DA SILVA, L.H. (1993) Malaria proteases and red blood cell invasion. *Parasitology Today* **9**, 92-96.

BUTLER, R., MICHEL, A., KUNZ, W. & KLINKERT, M.Q. (1995) Sequence of *Schistosoma mansoni* cathepsin C and its structural comparison with papain and cathepsins B and L of the parasite. *Protein and Peptide Letters* **2**, 313-320.

BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. & REES, P.H. (1975a) Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula *in vitro*. *Nature* **252**, 503.

BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. & REES, P.M. (1975b) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* **256**, 27-730.

BUTTERWORTH, A.E., BENSTED-SMITH, R., CAPRON, A., CAPRON, M., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., GRZYCH, J.M., KARIUKI, H.C., KHALIFE, J., KOECH, D., MUGAMBI, M. OUMA, J.H., ARAP SIONGOK, T.K. & STURROCK, R.F. (1987) Immunity in human schistosomiasis: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology* **94**, 281-300.

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

CALDERON, R.O., LUJAN, H.D., AGUERRI, A.M., BRONIA, D.H. (1989) *Trypanosoma cruzi*: involvement of proteolytic activity during cell fusion induced by epimastigote form. *Molecular and Cellular Biochemistry* **86**, 189-200.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., & BAZIN, H. (1975) Specific IgE antibodies in immune response adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature*. **253**, 274-275.

CAPRON, M., BAZIN, H. JOSEPH, M. & CAPRON, A. (1981) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rats eosinophils. *Journal of Immunology* **126**, 1764-1768.

CAPRON, M. & CAPRON, A. (1986) Rats, mice and men - models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitology Today* **2**, 69-75.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., OUMA, J.H. & BUTTERWORTH, A.E. (1987) Immunity to schistosomes: progress towards vaccine. *Science* **238**, 1065-1072.

CAPRON, A. (1993) La bilharziose: du papyrus à l'ordinateur. *Le généraliste* **1411**, 8-18.

CAPRON, A., RIVEAU, G., GRZYCH, J.M., BOULANGER, D., CAPRON, M. & PIERCE, R.J. (1995a) Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **90**, 235-242.

CAPRON, A. (1995b) Le langage moléculaire des parasites. *Médecine & Sciences* **11**, 431-433.

CAWSTON, T.E., McLAUGHLIN, P. & HAZELMAN, B.L. (1987) Paired serum and synovial fluid values of α 2-macroglobuline and TIMP in rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology* **26**, 354-358.

CAWSTON, T.E. (1995) Proteinases and inhibitors. *British Medical Bulletin* **51**, 385-401.

CETRE, C., COCUBE, C., PIERROT, C., GODIN, C., CAPRON, A., CAPRON, M. & KHALIFE, J. *In vivo* mRNA expression of cytokines in rats infected with *Schistosoma mansoni*. Manuscrit en préparation.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C., RESENDE, M. & TAVARES, C.A.P. (1992) Purification and characterization of a 47kDa protease from *Schistosoma mansoni* cercarial secretion. *Parasitology* **105**, 211-218.

CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, A. E., MACDONALD, J. & RUTTER, W. J. (1978) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.

CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. (1972) The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *International Journal of Parasitology* **2**, 79-98.

COCUBE, C., PIERROT, C., CETRE, C., GODIN, C., CAPRON, A. & KHALIFE, J. Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease. (soumis pour publication).

COFFMAN, R.L., SEYMOUR, B.W.P. HUDAK, S., JACKSON, J. & RENNICK, D. (1989) Antibody to interleukin 5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* **245**, 308-310.

COHEN, S.D., ISRAEL, E., SPIESS-MEIER, B. & WAINBERG, M.A. (1981) Plasminogen activator is an apparent lymphocyte mitogen. *Journal of Immunology* **126**, 1415-1420.

COHEN, F.E., GREGORET, L.M., AMIRI, P., ALDAPE, K., RECTOR, E., RAILEY, J. & MCKERROW, J. H. (1991) Arresting tissue invasion of a parasite by protease inhibitors chosen with the aid of computer modeling. *Biochemistry* **30**, 11221-11229.

COMBES, C., DELAY, B., JARNE, P., JOURDANE, J. & POINTIER, J.P. (1992) Seminar on "International cooperation in the field of genetic transformation of Invertebrates and resistance to diseases". Washington, December 4-5.

COMBES, C. (1993) Les schistosomes, l'eau et l'homme. *La Revue du Praticien* **43**(4), 405-415.

COUISSINIER-PARIS, P. & DESSEIN, A.J. (1995) *Schistosoma*-specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. *European Journal of Immunology* **25**, 2295-2302.

CRABTREE, J.E. & WILSON, R.A. (1986) The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **8**, 265-285.

CRAIG, S.P., MURALIDHAR, M.G., MCKERROW, J.H. & WANG, C.C. (1989) Evidence for a class of very small introns in the gene of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase in *Schistosoma mansoni*. *Nucleic Acids Research* **17**, 1635-1647.

DALTON, J.P., SMITH, A.M., CLOUGH, K.A. & BRINDLEY, P.J. (1995a) Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on. *Parasitology Today* **11**, 299-303.

DALTON, J.P., HOLA-JAMRISKA, L. & BRINDLEY, P.J. (1995b) Asparaginyl endopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **111**, 575-580.

DALTON, J.P. & BRINDLEY, P.J. (1996a) Schistosome asparaginyl endopeptidase Sm32 in hemoglobin digestion. *Parasitology Today* **12**, 125.

DALTON, J.P. & BRINDLEY, P.J. (1996b) Digestion of haemoglobin by schistosomes; Reply *Parasitology Today* **12**, 165.

DALTON, J.P., CLOUGH, K.A., JONES, M.K. & BRINDLEY, P.J. (1996) Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity* **64**, 1328-1334.

DALTON, J.P., CLOUGH, K.A., JONES, M.K. & BRINDLEY, P.J. (1997) The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* **114**, 105-112.

DAMIAN, R.T., GREENE, N.D. & HUBBARD, W.J. (1973) Occurrence of mouse alpha-2-macroglobulin antigenic determinants on *Schistosoma mansoni* adults, with evidence on their nature. *Journal of Parasitology* **59**, 67-73.

DAMIAN, R.T. (1987) Molecular mimicry revisited. *Parasitology Today* **3**, 263-266.

DA SILVA, A.C., LEPRESLE, T., CAPRON, A. & PIERCE, R.J. (1992) Molecular cloning of a 16kDa Cu/Zn suyperoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **52**, 275-278.

DAVIE, E.W., FUJIKAWA, K. & KISIEL, W. (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* **30**, 10363-10370.

DAVIS, A.H., NANDURI, J. & WATSON, D.C. (1987) Cloning and gene expression of *Schistosoma mansoni* protease. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 12851-12855.

DAVIS, R.E., DAVIS A.H. CARROLL, S.M., RAIJKOVIC, A. & ROTTMAN, F.M. (1988) Tandemly repeated exons encode 81 base repeats in multiple, developmentally regulated *Schistosoma mansoni* transcripts. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 4745-4755.

DEMEURE, C.E., RIHET, P., ABEL, L., OUATTARA, M., BOURGOIS, A. & DESSEIN, A.J. (1993) Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *Journal of Infectious Diseases* **168**, 1000-1011.

DESSAINT, J.P., CAMUS, D., FISCHER, E. & CAPRON, A. (1977) Inhibition of lymphocyte proliferation by factor(s) produced by *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Immunology* **7**, 624-629.

DISSOUS, C., GRZYCH, J.M. & CAPRON, A. (1982) *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a. *Journal of Immunology* **129**, 2232-2234.

DISSOUS, C., PRATA, A. & CAPRON, A. (1984) Human antibody response to *Schistosoma mansoni* surface antigens defined by protective monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases* **149**, 227-233.

DISSOUS, C., GRZYCH, J.M. & CAPRON, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature* **323**, 443-445.

DOENHOFF, M.J., YOUSOFI DARANI, H., PRICE, H.P., CURTIS, R.H.C. & SAYERS, J.R. (1997) Modulated immunogenicity of a 27kDa *Schistosoma mansoni* larval protease associated with protective immunity. British Society for Parasitology Spring Meeting, UMIST, Manchester, UK, 8-10 April 1997, paper 22.

DUCHOSAL, M.A., ROTHERMEL, A.L., MCCONAHEY, P.J., DIXON, F.J. & ALTIERI, D.C. (1996) *In vivo* immunosuppression by targeting a novel protease receptor. *Nature* **380**, 352-356.

DUFFY, M.J. (1992) Role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis* **10**, 145-155.

DUFFY, M.J. (1996) Proteases as prognostic markers in cancer. *Clinical Cancer Research* **2**, 613-618.

DUNNE, D.W., GRABOWSKA, A.M., FULFORD, A.J.C., BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., KOECH, D. & OUMA, J.H. (1988) Human antibody responses to *Schistosoma mansoni*: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. *European Journal of Immunology* **18**, 123-131.

DUNNE, D.W., BUTTERWORTH, A.E., FULFORD, A.J., KARIUKI, H.C., LANGLEY, J.G., OUMA, J.H., CAPRON, A., PIERCE, R. & STURROCK, R.F. (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *European Journal of Immunology* **22**, 1483-1488.

DUPRE, L., POULAIN-GODEFROY, O., IVANOFF, N., MEKRANFAR, M., SCHACHT, A.M., CAPRON, A., & RIVEAU, G. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase. Soumis pour publication.

DUVAUX-MIRET, O., BARRATTE, B., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1991) Molecular cloning and sequencing of the α -tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **49**, 337-340.

- DUVAUX-MIRET, O., STEFANO, G.B., SMITH, E.M., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1992) Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 778-787.
- EL SHERBEINI, M., RAMADAN, N., BOSTIAN, K.A. & KNOPF, P.M. (1991) Cloning and sequence analysis of the *Schistosoma mansoni* membrane glycoprotein antigen gene GP22. *Molecular and Biochemical Parasitology* **49**, 83-98.
- EVANS, B.A., DRINKWATER, C.C. & RICHARDS, R.I. (1987) Mouse glandular Kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**, 8027-8034.
- FAISST, S. & MEYER, S. (1992) Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Research* **20**, 3-26.
- FALLON, P.G., COOPER, R.O., PROBERT, A.J. & DOENHOFF, M.J. (1992) Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology* **105**, S41-S48.
- FALLON, P.G. & DOENHOFF, M.J. (1994) Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **51**, 83-88.
- FALLON, P.G., STURROCK, R.F., NIANG, A.C. & DOENHOFF, M.J. (1995) Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **53**, 61-72.
- FALLON, P.G., TAO, L.F., ISMAIL, M.M. & BENNET, J.L. (1996). Schistosome resistance to praziquantel: fact or artifact ? *Parasitology Today* **12**, 316-322.
- FINKELMAN, F.D., KATONA, I.M., URBAN, J.F., SNAPPER, C.M., OHARA, J. & PAUL, W.E. (1986) Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **83**, 9675-9678.

FISHELSON, Z., AMIRI, P., FRIEND, D. S., MARIKOVSKY, M., PETTIT, M., NEWPORT, G. & MCKERROW, J. H. (1992) *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. *Experimental Parasitology* **75**, 87-98.

FISHELSON, Z. (1995) Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **90**, 289-301.

GADASI, H. & KOBILER, D. (1983) *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Experimental Parasitology* **55**, 105-110.

GAZZINELLI, G. & PELLEGRINO, J. (1964) Elastinolytic activity of *Schistosoma mansoni* cercarial extract. *Journal of Parasitology* **50**, 591-592.

GHENDLER, Y., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1994) Isolation and characterization of Smpi56, a novel serine protease inhibitor. *Experimental Parasitology* **78**, 121-131.

GHENDLER, Y., PARIZADE, M., ARNON, R., MCKERROW, J.H. & FISHELSON, Z. (1996) *Schistosoma mansoni*: evidence for a membrane anchored protease on schistosomula. *Experimental Parasitology* **83**, 73-82.

GOGUEN, J.D., HOE, N.P. & SUBRAHMANYAM, Y.V.B.K. (1995) Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches. *Infectious Agents and Disease* **4**, 47-54.

GOLDBERG, D.E., SLATER, A.F.G., BEAVIS, R., CHAIT, B., CERAMI, A. & HENDERSON, G.B. (1991) Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. *Journal of Experimental Medicine* **173**, 961-969.

GOLDBERG, B. & STRICKER, R.B. (1996) HIV protease and the pathogenesis of AIDS. *Research in Virology* **147**, 375-379.

GÖTZ, B. & KLINKERT, M.Q. (1993) Expression and partial characterization of a cathepsine B-like enzyme (Sm31) and a proposed "haemoglobinase" (Sm32) from *Schistosoma mansoni*. *Biochemical Journal* **290**, 801-806.

GOUDOT-CROZEL, V., CAILLOL, D., DJABALI, M. & DESSEIN, A.J. (1989) The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37 kDa

glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase. *Journal of Experimental Medicine* **170**, 2065-2080.

GRAF, L., CRAIK, C.S., PATHY, A., ROCZNIAK, S., FLETTERICK, R.J. & RUTTER, W.J. (1987) Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry* **26**, 2616-2623.

GREZEL, D., CAPRON, M., GRZYCH, J.M., FONTAINE, J., LECOCQ, J.P. & CAPRON, A. (1993) Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *European Journal of Immunology* **23**, 454-460.

GRZYCH, J.M., CAPRON, M., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1982) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *Journal of Immunology* **129**, 2739-2744.

GRZYCH, J.M., CAPRON, M., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology* **133**, 998-1004.

GRZYCH, J.M., PEARCE, E., CHEEVER, A., CAULADA, Z.A., CASPAR, P., HEINY, S., LEWIS, F. & SHER, A. (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology* **146**, 1322-1327.

GRZYCH, J.M., GREZEL, D., XU, C.B., NEYRINCK, J.L., CAPRON, M., OUMA, J.H., BUTTERWORTH, A.E. & CAPRON, A. (1993) IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, **150**, 527-535.

HAGAN, P., BLUMENTHAL, U., DUNNE, D., SIMPSON, A.J.G. & WILKINS, H.A. (1991) Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* **349**, 243-245.

HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.

- HARN, D.A. (1985) Identification by monoclonal antibody of a major (28 kDa) surface membrane antigen of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **16**, 345-354.
- HECK, L.W., ALARCON, P.G., KULHAVY, R.M., MORIHARA, K., RUSSELL, M.W. & MESTECKY J.F. (1990) Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Journal of Immunology* **144**, 2253-2257.
- HEDSTROM, R., CULPEPPER, J., HARRISON, R.A., AGABIAN, N. & NEWPORT, G. (1987) A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infection is homologous to the heat-shock protein hsp 70. *Journal of Experimental Medicine* **165**, 1430-1435.
- HENKLE, K.J., COOK, G.A., FOSTER, L.A. ENGMAN, D.M., BOBEK, L.A., CAIN, G.D. & DONELSON, J.E. (1990) The gene family encoding egg shell proteins of *Schistosoma japonicum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **42**, 69-82.
- HUDIG, D., EWOLDT, G.R. & WOODARD, S.L. (1993) Proteases and lymphocyte cytotoxic killing mechanisms. *Current Opinion in Immunology* **5**, 90-96.
- HONG, Y. & GHEBREHIWET, B. (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated C1q and C3. *Clinical and Immunology and Immunopathology* **62**, 133-138.
- HOTEZ, P.J. & CERAMI, A. (1983) Secretion of a proteolytic anticoagulant by *Ancylostoma* hookworms. *Journal of Experimental Medicine* **157**, 1594-1603.
- ISMAIL, M.M., TAHA, S.A., FARGHALY, A.M. & EL AZONY, A.S. (1994) Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **24**, 685-693.
- JANKOVIC, D., ASLUND, L., OSWALD, I.P., CASPAR, P., CHAMPION, C., PEARCE, E., COLIGAN, J.E., STRAND, M., SHER, A. & JAMES, S.L. (1996) Calpain is the target antigen of a Th1 clone that transfers protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **157**, 806-814.

- JANOFF, A. & SCHERER, J. (1968) Mediators of inflammation in leucocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Experimental Medicine* **128**, 1137-1155.
- JOSEPH, M., AURIAULT, C., CAPRON, A., VORNG, H. & VIENS, P. (1983) A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* **303**, 810-811.
- KARCZ, S.R., PODESTA, R.B., SIDDIQUI, A.A., DEKABAN, G.A., STREJAN, G.H. & CLARKE, M.W. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of a calcium-activated neutral protease (calpain) from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **49**, 333-336.
- KEENE, W. E., JEONG, K. H. MCKERROW, J. H. & WERB, Z. (1983) Degradation of extra cellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. II. Degradation by newly transformed and developing schistosomula. *Laboratory Investigation* **49**, 201-207.
- KHALIFE, J., CAPRON, M., CAPRON, A., GRZYCH, J.M., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D. & OUMA, J. (1986) Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *Journal of Experimental Medicine* **164**, 1626-1640.
- KHALIFE, J., DUNNE, D.W., RICHARDSON, B.A., MAZZA, G. THORNE, K.J.I., CAPRON, A. & BUTTERWORTH, A.E. (1989) Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **142**, 4422-4427.
- KHALIFE, J., PIERCE, R.J., GODIN, C. & CAPRON, A. (1993) Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin. *Molecular and Biochemical Parasitology* **62**, 313-316.
- KHALIFE, J., GODIN, C. & CAPRON, A. (1995) Transcriptional regulation of *Schistosoma mansoni* Calreticulin: possible role of AP1. *Parasitology* **111** 469-475.
- KILPATRICK, L., JOHNSON, J.L., NICKBARG, E.B., WANG, Z.M., CLIFFORD, T.F, BANACH, M., COOPERMAN, B.S., DOUGLAS, S.D. & RUBIN, H. (1995) Inhibition of human neutrophil superoxide generation by α 1-antichymotrypsine. *Journal of Immunology* **146**, 2388-2893.

KLINKERT, M.Q., RUPPEL, A. & BECK, E. (1987) Cloning of diagnostic 31/32 kilodalton antigens of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **25**, 247-255.

KLINKERT, M.Q., FELLEISEN, R., LINK, G., RUPPEL, A. & BECK, E. (1989) Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 113-122.

KLINKERT, M.Q. & KUNZ, W. (1996) Digestion of haemoglobin by schistosomes. *Parasitology Today* **12**, 165.

KLOETZEL, K (1968) A collagenase-like substance produced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* **54**, 177-178.

KRAUT, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual Reviews in Biochemistry* **46**, 331-358.

LAEMMLI, U.K. (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

LANAR, D.E., PEARCE, E.J., JAMES, S.L. & SHER A. (1986) Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science*, **234**, 593-596.

LANDSPERGER, W.J., STIREWALT, M.A. AND DRESDEN, M.H. (1982) Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochemical Journal* **201**, 137-144.

LARIVIERE, M. (1993) Epidémiologie des bilharzioses humaines. *La Revue du Praticien* **43**, 417-423.

LENGYEL, E., KLOSTERGAARD, J. & BOYD, D. (1995) Stimulation of urokinase expression by TNF- α requires the activation of binding sites for the AP-1 and PEA-3 transcription factors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1268**, 65-72.

LIPPS, G., FÜLLKRUG, R. & BECK, E. (1996) Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*: purification and activation of the recombinant proenzyme secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1717-1725.

- LUACES, A.L. & BARRET, A.J. (1988) Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *E. histolytica*. *Biochemical Journal* **250**, 603-909.
- MACKNIGHT, A.J., MASON, D.W. & BARCLAY, A.N. (1989) Sequence of rat interleukin 2 and anomalous binding of a mouse interleukin 2 cDNA probe to rat MHC class II-associated invariant chain mRNA. *Immunogenetics* **30**, 145-147.
- MACKNIGHT, A.J., BARCLAY, A.N. & MASON, D.W. (1991) Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of CD4+ T cells. *European Journal of Immunology* **21**, 1187-1194.
- MAEDA, H., MOLLA, A., ODA, T. & KATSUKI, T. (1987) Internalization of Serratial protease into cell as an enzyme inhibitor complex with α 2-macroglobulin and regeneration of protease activity and cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 10946-10950.
- MANGOLD, B.L. & DEAN, D.A. (1986) Passive transfert with serum and IgG antibodies of irradiated cercaria-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *Journal of Immunology* **136**, 2644-2647.
- MARIKOVSKY, M., FISHELSON, Z. & ARNON, R. (1988a) Purification and characterization of proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **30**, 45-54.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1988b) Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* **141**, 273-278.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1990) *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunology* **12**, 389-401.
- MASSON, D. & TSCHOPP, J. (1987) A family of serine esterases in lytic granules of cytotoxic T lymphocytes. *Cell* **49**, 679-685.

MAZINGUE, C., WALKER, C., DOMZIG, W., CAPRON, A., DE WECK, A. & STADLER, B.M. (1987) Effect of the schistosome-derived inhibitory factor on the cell cycle of T lymphocytes. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **83**, 12-18.

MCDONALD, R.J., SWIFT, G.H., QUINTO, C., SWAIN, W., PICTET, R.L., NIKOVITS, W. & RUTTER, W.J. (1982) Primary structure of two distinct rat pancreatic preproelastases determined by sequence analysis of the complete cloned messenger ribonucleic acid sequences. *Biochemistry* **21**, 1453-1463.

MCIVER, K. S., KESSLER, E., OLSON, J.C. & OHMAN, D.E. (1995) The elastase propeptide functions as an intramolecular chaperone required for elastase activity and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **18**, 877-889.

MCKERROW, J. H., KEENE, W. E., JEONG, K. H. & WERB, Z. (1983) Degradation of extra cellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I: Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Laboratory Investigation* **49**, 195-200.

MCKERROW, J. H., PINO-HEISS, S. LINDQUIST, R. & WERB, Z. (1985) Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3703-3707.

MCKERROW, J.H. (1989) Parasite proteases. *Experimental Parasitology* **68**, 111-115.

MCKERROW, J.H., NEWPORT, G. & FISHELSON, Z. (1991) Recent insights into the structure and function of a larval proteinase involved in host infection by a multicellular parasite. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **197**, 119-124.

MCKERROW, J.H., SUN, E., ROSENTHAL, P. & BOUVIER, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Reviews of Microbiology* **47**, 821-853.

MCKERROW, J.H. (1996) Helminth protease : biology structure and drug design. Keystone Symposia on Molecular and cellular Biology, Santa Fe, New Mexico, USA, 22-28 february 1996, paper 025.

MCKERROW, J.H. (1997a) Evaluation of small molecular weight cysteine protease inhibitors as chemotherapy for protozoan infections. British Society for Parasitology Spring Meeting, UMIST, Manchester, UK, 8-10 April 1997, paper 01.

MCKERROW, J.H. (1997b) The role of proteases in helminth parasite invasion and molting. British Society for Parasitology Spring Meeting, UMIST, Manchester, UK, 8-10 April 1997, plenary lecture.

McNAIR, A.T., DISSOUS, C., DUVAUX-MIRET, O. & CAPRON, A. (1993) Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-Transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene* **124**, 245-249.

McTIGUE, M.A., WILLIAMS, D.R. & TAINER, J.A. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *Journal of Molecular Biology* **246**, 21-27.

MEGYERI, P., PABST, K.M. & PABST, M.J. (1995) Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. *Immunology* **86**, 629-635.

MICHEL, A., GHONEIM, H., RESTO, M., KLINKERT, M.Q. & KUNZ, W. (1995) Sequence, characterization and localization of a cystein proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **73**, 7-18.

MILLER, K.J., KENNEDY, E.P. & REINHOLD, V.N. (1986) Osmotic adaptation by gram-negative bacteria. Possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231**, 48-51.

MODHA, J., PARIKH, V., GAULDIE, J. & DOENHOFF, M.J. (1988) An association between schistosomes and contrapsin, a mouse serine protease inhibitor (serpin). *Parasitology* **96**, 99-109.

MODHA, J. & DOENHOFF, M.J. (1994a) Complex formation of human alpha-1-antitrypsin with components of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasite Immunology* **16**, 447-450.

MODHA, J. & DOENHOFF, M.J. (1994b) *Schistosoma mansoni* host-parasite relationship: interaction of contrapsin with adult worms. *Parasitology* **109**, 487-495.

MODHA, J., ROBERTS, M.C. & KUSEL, J.R. (1996) Schistosomes and serpins: a complex business. *Parasitology Today* **12**, 119-121.

MOLONEY, N.A., HINCHCLIFFE, P. & WEBBE, G. (1987) Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice after treatment with praziquantel. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**, 247-254.

MOLONEY, N.A. & WEBBE, G. (1990) Antibody is responsible for the passive transfer of immunity to mice from rabbits, rats or mice vaccinated with attenuated *Schistosoma japonicum* cercariae. *Parasitology* **100**, 235-239.

MORIHARA, K., TSUSUKI, H. & ODA, K. (1979) Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of human plasma α 1-proteinase inhibitor. *Infection and Immunity* **24**, 188-193.

MORRIS, S.R. & SAKANARI, J.A. (1994) Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from tissue penetrating nematode *Anisakis simplex*. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27650-27656.

MOSER, D., TENDLER, M., GRIFFITHS, G. & KLINKERT, M.Q. (1991) A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 8447-8453.

MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Reviews of Immunology* **7**, 145-173.

MOTTRAM, J.C., BROOKS, D.R., SELZER, P.M. & COOMBS, G.H. (1997) Genetic manipulation of *Leishmania mexicana* cysteine proteinases to study structure and function. British Society for Parasitology Spring Meeting, UMIST, Manchester, UK, 8-10 April 1997, paper 03.

NAGASE, H., ENGHILD, J.J., SUZUKI, K. & SALVESEN, G. (1990) Stepwise activation of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* **29**, 5783-5789.

NENE, V., DUNNE, D.W., JOHNSON, K.S., TAYLOR, D.W. & CORDINGLEY, J.S. (1986) Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to

heat-shock proteins and alpha crystallins. *Molecular and Biochemical Parasitology* **21**, 179-188.

NEUMANN, S., ZIU, E., LANTEN, F. & SCHESCHTER, I. (1992) Cloning and sequencing an hsp 70 of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **56**, 357-360.

NEWPORT, G.R., HARRISON, R.A., MCKERROW, J., TARR, P. KALLESTAD, J. & AGABIAN, N. (1987) Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* myosine. *Molecular and Biochemical Parasitology* **26**, 29-38.

NEWPORT, G., CULPEPPER, J. & AGABIAN, N. (1988a) Parasite heat-shock proteins. *Parasitology Today* **4**, 306-318.

NEWPORT, G. R., MCKERROW, J. H., HEDSTROM, R., PETITT, M., MCGARRIGLE, L., BARR, P.J. & AGABIAN, N. (1988b) Cloning of the proteinase that facilitates infection by Schistosome parasites. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 13179-13184.

NORRANDER, J., KEMPE, T. & MESSING, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101-106.

NUDEL., U., ZAKUT., R., SHANI., M., NEUMAN, S., LEVY, Z. & YAFFE, D. (1983). The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Research* **11**, 1759-1771.

PANCRE, V., WOLOWCZUK, I., BOSSUS, M., GRAS-MASSÉ, H., GUERRET, S., DELANOYE, A., CAPRON, A. & AURIAULT, C. (1994) Evaluation of the effect of Sm28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis: interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. *Molecular Immunology* **31**, 1247-1256.

PARMELY, M., GALE, A., CLABAUGH, M., HORVAT, R. & ZHOU, W. (1990) Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* **58**, 3009-3014.

PEARCE, E.J., JAMES, S.L., DALTON, J., BARRALL, A., RAMOS, C., STRAND, M. & SHER, A. (1986) Immunological characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non-living vaccine. *Journal of Immunology* **137**, 3593-3600.

- PEARCE, E.J., JAMES, S.L., HIENY, S., LANAR, D.E. & SHER, A. (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **85**, 5678-5682.
- PEARCE, E.J., CASPAR, P., GRZYCH, J.M., LEWIS, F.A. & SHER, A. (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine* **173**, 159-166.
- PENG, C., HO, B.K., CHANG, T.W. & CHANG, N.T. (1989) Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *Journal of Virology* **63**, 2550-2556.
- PERLMUTTER, D.H., JOSLIN, G. NELSON, P., SCHASTEEN, C., ADAMS, S.P. & FALLON, R.J. (1990) Endocytosis and degradation of the α 1-antitrypsin-protease complexes is mediated by the serpin-enzyme complex (SEC) receptor. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 16713-16716.
- PINO-HEISS, S., PETITT, M., BECKSTEAD, J.H. & MCKERROW, J.H. (1986) Preparation of mouse monoclonal antibodies and evidence for a host immune response to the preacetabular gland proteinase of *Schistosoma mansoni* cercariae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**, 536-543.
- POTEMPA, J., KORZUS, E. & TRAVIS, J. (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 15957-15960.
- POULAIN-GODEFROY, O., GAUBERT, S., LAFITTE, S., CAPRON, A. & GRZYCH, J.M. (1996) Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: Stimulatory role of egg antigens. *Infection and Immununity* **64**, 763-768.
- RAMALHO-PINTO, F.J., GAZZINELLI, G., HOWELLS, R.E., MOTA-SANTOS, T.A., FIGUEIREDO, E.A. & PELLEGRINO, J. (1974) *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomulae *in vitro*. *Experimental Parasitology* **36**, 360-372.

- RAWLINGS, N.D., & BARRET, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* **290**, 205-218.
- REDMAN, C.A., ROBERTSON, A., FALLON, P.G., MODHA, J., KUSEL, J.R., DOENHOFF, M.J. & MARTIN, R.J. (1996) Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitology Today* **12**, 14-20.
- REYNOLDS, S.R., SHOEMAKER, C.B. & HARN, D. (1992) T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, **149** 3995-4001
- RIBEIRO DE JESUS, A.M., ALMEIDA, R.P., BACELLAR, O., ARANJO, M.I., DEMEURE, C., BINA, J.C., DESSEIN, A.J. & CARVALHO, E.M. (1993) Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis. *European Journal of Immunology* **23**, 152-158.
- RICHARD-LENOBLE, D., KOMBILA, M., DUONG, T.H., & GENDREL, D. (1993) Bilharziose à *Schistosoma intercalatum*, bilharziose récente et oubliée. *La Revue du Praticien* **42**, 432-439.
- RIHET, P., DEMEURE, C., BOURGOIS, A., PRATA, A. & DESSEIN, A.J. (1991) Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *European Journal of Immunology* **21**, 2679-2684.
- RIHET, P., DEMEURE, C.E., DESSEIN, A.J. & BOURGOIS, A. (1992) Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4 revealed by a new methodology in subjects from a *Schistosoma mansoni* endemic area. *European Journal of Immunology* **22**, 2063-2070.
- ROBERTS, M., BUTTERWORTH, A.E., KIMANI, G., KAMAU, T., FULFORD, A.J.C., DUNNE, D.W., OUMA, J. & STURROCK, R.F. (1993) Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infection and Immunity* **61**, 4984-4993.
- ROCHE, C., WILLIAMS, D.L., KHALIFE, J., LEPRESLE, T., CAPRON, A., & PIERCE, R.J. (1994) Cloning and characterization of the gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase. *Gene* **138**, 149-154.

ROCHE, C., LIU, J. L., LEPRESLE, T., CAPRON, A. & PIERCE, R. J. (1996) Tissue localization and stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 187-195.

RUPPEL, A., DIESFELD, H.J. & ROTHER, U. (1985a) Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. *Clinical and Experimental Immunology* **62**, 499-506.

RUPPEL, A., ROTHER, U., VONGERICHTEN, H., LUCIUS, R. & DIESFELD, H.J. (1985b) *Schistosoma mansoni* : immunoblot analysis of adult worm proteins. *Experimental Parasitology* **60**, 195-206.

SALKOWSKI, E. (1890) *Zeitschrift fuer Klinische Medezine* **17**, suppl., 77-100.

SAMBROOK, J., FRITSH, E.F. & MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory.

SCALLON, B.J., BOGITSH, B.J. & CARTER, C.E. (1987) Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding a major immunogen recognized by hyperinfected rabbits. *Molecular and Biochemical Parasitology* **24**, 237-245.

SCHWEINING, H. (1894) *Virchows Archiv* **136**, 444-481.

SERRA, E., ZEMZOU, K., TROLET, J., CAPRON, A. & DISSOUS, C. (1996) Functional analysis of the *Schistosoma mansoni* 28kDa glutathione S-transferase gene promoter: involvement of SMNF-Y transcription factor in multimeric complexes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **83**, 69-80.

SHAPIRO, S.D., KOBAYASHI, D.K. & LEY, T.J. (1993) Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloprotease produced by human alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 23824-23829.

SHOEMAKER, C.B., RAMACHANDRAN, H., LANDA, A. DOS REIS, M.G. & STEIN, L.D. (1992a) Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding homologue of epidermal growth factor receptor. *Molecular and Biochemical Parasitology* **53**, 17-32.

SHOEMAKER, C., GROSS, A., GEBREMICHAEL, A. & HARN, D. (1992b) cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 1842-1846.

SHOEMAKER, C.B. (1994) The *Schistosoma mansoni* phosphogen kinase gene contains two closely apposed transcription initiation sites and arose from a fused gene duplication. *Molecular and Biochemical Parasitology* **68**, 319-322.

SIMPSON, A.J.G., SHER, A., & MCCUTCHAN, T.F. (1982) The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* **6**, 125-137.

SIMPSON, A., DIAS NETO, E., VIDIGAL, T., PENA, H., CARVALHO, O. & PENA, S. (1995) DNA polymorphism of schistosomes and their snail hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **90**, 211-232.

SIMURDA, M.C., VANKEULEN, H., REKOSH, D.M. & LO VERDE, P.T. (1988) *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of a mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Experimental Parasitology* **67**, 73-84.

SMITH, A.M., DALTON, J.P., CLOUGH, K.A., KILBANE, C.L., HARROP, S.A., HOLE, N. & BRINDLEY, P.J. (1994) Adult *Schistosoma mansoni* express cathepsin L proteinase activity. *Molecular and Biochemical Parasitology* **67**, 11-19.

SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1965) Acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the albinos rat. *Parasitology* **55**, 695.

SMYTHIES, L.E., COULSON, P.S. & WILSON, R.A. (1992) Monoclonal antibody to IFN- γ modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *Journal of Immunology* **149**, 3654-3661.

SOUTO-PADRON, T., CAMPETELLA, O., CAZZULO, J.J., DE SOUZA, W. (1990) Cystein proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *Journal Cell. Sci* **96**, 485-490.

SPEER, C.P., PABST, M.J., HEDEGAARD, H.B., REST, R.F. & JOHNSTON R.B. (1984) Enhanced release of oxygen metabolites by monocyte-derived macrophages exposed to proteolytic enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G. *Journal of Immunology* **133**, 2151-2156.

STARKEY, P.M. (1977) Elastase and Cathepsin G. In: Proteinases in mammalian cells and tissues, Barret A.J. ed., Amsterdam, Elsevier, pp 57-89.

STIREWALT, M.A. (1974) *Schistosoma mansoni*: cercariae to schistosomule. *Advance in Parasitology* **12**, 115-182.

SUNG, C.K. & DRESDEN, M.H. (1986) Cysteinyll proteinases of *Schistosoma mansoni* eggs: purification and partial characterzation. *Journal of Parasitology* **72**, 891-900.

TCHUEM TCHUENTE, L.A. (1995) Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology* **110**, 45-52.

TCHUEM TCHUENTE, L.A., SOUTHGATE, V.R., COMBES, C., & JOURDANE, J. (1996) Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful? *Parasitology Today* **12**, 231-236.

TENDLER, M., VILAR, M.M., BRITO, C.A., DA SERRA FREIRE, N.M., KATZ, N. & SIMPSON, A. (1995) Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: Potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **90**, 255-265.

THERON, A. & COMBES, C. (1988) Genetic analysis of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma mansoni*. *Behav. Genet.* **18**, 201-209.

TIMMS, A.R. & BUEDING, E. (1959) Studies of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. *British Journal of Pharmacology* **14**, 68-73.

TOOTHILL, V.J., VAN MOURIK, J.A., NIEWENHUIS, H.K., METZELAAR, M.J. & PEARSON, J.D. (1990) Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leucocytes to thrombin-stimulated endothelial cells. *Journal of Immunology* **145**, 283-291.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T. & GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels onto nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350-4354.

TOY, L., PETTIT, M., WANG, Y. F., HEDSTROM, R. & MCKERROW, J. H. (1987) The immune response to stage specific proteolytic enzymes of *Schistosoma mansoni*. In: UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, vol. **60**, Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites, Alan R. Liss, Inc., W.Y., pp 85-103.

TRAVIS, J., POTEMPA, J. & MAEDA, H. (1995) Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends in Microbiology* **3**, 405-407.

TROTTEIN, F., KIENY, M.P., VERWAERDE, C., TORPIER, G., PIERCE, R.J., BALLOUL, J.M., SCHMITT, D., LECOCQ, J.P. & CAPRON, A. (1990) Molecular cloning and tissue distribution of a 26kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **41**, 35-44.

TROTTEIN, F., VANEY, M.C., BACHET, B., PIERCE, R.J., COLLOC'H, N., LECOCQ, J.P., CAPRON, A. & MORNON, J.P. (1992) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a protective cloned 28 kDa glutathion S-transferase from *Schistosoma mansoni*. *Journal of Molecular Biochemistry* **224**, 515-518.

TU, A.T. (1977) Proteolytic enzymes. Venoms: chemistry and molecular biology. New York, John Wiler & sons, pp. 104-126.

TZENG, S., MCKERROW, J.H., FUKUYAMA, K. & EPSTEIN, W.L. (1983) Degradation of purified skin keratin by a protease secreted from *Schistosoma mansoni* cercariae. *Journal of Parasitology* **69**, 992-994.

ULMER, J.B., DONNELLY, J.J., PARKER, S.E., RHODES, G.H., FELGENER, P.L., DWARKI, V.J., GROMKOWSKI, S.H., RANDALL DECK, R., DEWITT, C.M., FRIEDMAN, A., HAWES, L.A., LEANDER, K.R., MARTINEZ, D., PERRY, H.C., SHIVER, J.W., MONTGOMERY, D.L. & LIU, M.A. (1993) Heterologous protection against Influenza by Injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**, 1745-1748.

- URBAN, J.F., MADDEN, K.B., SVETIC, A., CHEEVER, A., TROTTA, P.P., GAUSE, W.C., KATONA, I.M. & FINKELMAN, F.D. (1992) The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunological Reviews* **127**, 205-220.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J. B., NIESCHLAF, E. & ROSS, G. T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *Journal of Clinical Endocrinology* **33**, 988-991.
- VERWAERDE, C., AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, M., NEYRINCK, J.L., VENDEVILLE, C. & CAPRON, A. (1986) Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scandinavian Journal of Immunology* **24**, 509-516.
- VERWAERDE, C., JOSEPH, M., CAPRON, M., PIERCE, R., DAMONNEVILLE, M., VELGE, F., AURIAULT, C. & CAPRON, A. (1987) Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **138**, 4441-4447.
- VERWAERDE, C., AURIAULT, C., NEYRINCK, J.L. & CAPRON, A. (1988) Properties of serine proteases of *Schistosoma mansoni* involved in the regulation of IgE synthesis. *Scandinavian Journal of Immunology* **27**, 17-24.
- WAN, M. & LOH, B.N. (1995) Expression and purification of a active form of HIV-1 protease from *E. coli*. *Biochemistry and Molecular Biology International* **35**, 899-912.
- WASILEWSKI, M.M., LIM, K.C., PHILLIPS, J. & MCKERROW, J.H. (1996) Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **81**, 179-189.
- WEINSTOCK, J.V., & BOROS, D.L. (1983) Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology* **127**, 1906-1913.
- WERB, Z., GLASS, R. & AGGELER, J. (1980) Interaction of mouse trophoblast with extracellular matrices-a model for embryo implantation. *Journal of Cellular Biology* **87**, 138.
- WERB, Z., BANDA, J., MCKERROW, J.H. & SANDHAUS, R.A. (1982) Elastases and elastin degradation. *Journal of Investigate Dermatology* **79**, 154-159.

WIEST, P.M. (1996) The epidemiology of morbidity of schistosomiasis. *Parasitology Today* **12**, 215-220.

WILLIAMS, D.L. PIERCE, R.J., COOKSON, E. & CAPRON, A. (1992) Molecular cloning and sequencing of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **52**, 127-130.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1993) Expanded Programme on Immunization. W.H.O. Weekly Epidemiology Rec. **68**, 17-24.

XU, Y.Z. & DRESDEN, M.H. (1986) Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Parasitology* **72**, 507-511.

XU, H., MILLER, S., VANKEULEN, H., WAWRZYNSKI, M.R., REKOSH, D.M. & LOVERDE, P.T. (1989) *Schistosoma mansoni* tropomyosin: cDNA characterization, sequence, expression and gene product localization. *Experimental Parasitology* **69**, 373.

XU, Y.Z., SHAWAR, S.M. & DRESDEN, M.H. (1990) *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of a membrane-associated leucine aminopeptidase. *Experimental Parasitology* **70**, 124-133.

XU, C.B., VERWAERDE, C., GRZYCH, J.M., FONTAINE, J. & CAPRON, A. (1991) A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *European Journal of Immunology*, **21** 1801-1807.

XU, C.B., VERWAERDE, C., GRAS-MASSE, H., FONTAINE, J., BOSSUS, M., TROTTEIN, F., WOLOWCZUK, I., TARTAR, A. & CAPRON, A. (1993) *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability: role of the amino- and carboxy-terminal domains. *Journal of Immunology* **150**, 940-949.

YANG, W., WAINE, G.J. & MCMANUS, D.P. (1995) Antibodies to *Schistosoma japonicum* (asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212**, 1029-1039.

YOSHINO, T.P., LODES, M.J., REGE, A.A. & CHAPPELL, C.L. (1993) Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* **79**, 23-31.

YOUSOFI DARANI, H., CURTIS, R.H.C., DOENHOFF, M.J. (1996) Anomalous immunological properties of a *Schistosoma mansoni* larval protease. British Society for Parasitology Spring Meeting, University of Wales, Bangor, UK, 1-3 April 1996, paper 121.

ZEMZOUMI, K., DISSOUS, C., COCHU, A. TROLET, J., CAPRON, A & MC NAIR, A. (1995) *Schistosoma mansoni*: interaction of nuclear extracts with the CCAAT-binding site revealed by the gel shift assay. *Experimental Parasitology* **80**, 149-154.

ZEMZOUMI, K., SERRA, E., MANTOVANI, R., TROLET, J., CAPRON, A & DISSOUS, C. (1996) Cloning of *Schistosoma mansoni* transcription factor NF-YA subunit: phylogenetic conservation of the HAP-2 homology domain. *Molecular and Biochemical Parasitology* **77**, 161-172.

ZERDA, K.S., DRESDEN, M.H., DAMIAN, R.T. & CHAPPEL, C.L. (1987) *Schistosoma mansoni*: anti-Sm32 proteinase response in vaccinated and challenged baboons. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **37**, 320-326.

ZIMMERMAN, G.A., MCINTYRE, T.M. & PRESCOTT, S.M. (1985) Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells *in vitro*. *Journal of Clinical Investigations* **76**, 2235-2246.

ANNEXES

MILIEUX	TAMPONS
LB: 10g Bacto Tryptone, 5g Yeast extract, 10g NaCl, qsp 1l LBA: LB +Ampicilline 50mg/l SOB: 20g Bacto Tryptone, 5g Yeast extract, 520mg NaCl, 180mg KCl, qsp 1l, +MgCl 210mM extemporanément SOC: SOB +glucose 20mM MEM: Minimal Eagles Medium (GIBCO), penicilline 1million U/10l, streptomycine 0,5g/10l NZY: NZY broth 21g/l TOP NZY: NZY + 0,7% agarose SM: 5,8g NaCl, 2g MgSO₄.7H₂O, 50ml Tris HCl 1M pH7,5, gélatine 2%, qsp 1l A10: Dulbecco 90%, Sérum de Veau Foetal 10%, Acides aminés non essentiels 1%, glutamine 1,2%	Tampon 20X SSC : NaCl 3M, Na₂ citrate 2H₂O 0,3M pH 7,2 Tampon de dénaturation : NaOH 0,5M; NaCl 1,5M Tampon de neutralisation : Tris 0,5M pH 7,2; NaCl 1,5M PBS : NaCl 137mM, KCl 2,7mM, NaHPO₄, 7H₂O 4,3mM, KH₂PO₄ 1,4 mM. Tampon de migration gel d'agarose TAE 50X : 242g Tris-Base, 57,1 ml acide acétique glacial, 37,2 g Na₂EDTA, 2 H₂O. TFB: 1,21g RbCl, 0,12g MnCl₂.2H₂O, 0,14g CaCl₂ 2H₂O, 0,08g HeCoCl₃, qsp 99ml +1ml KMES (MES 1M ajusté à pH 6,3 avec KOH) TE 1X pH8.0: Tris 10mM, pH 7,4, 0,1mM EDTA, pH 8,0 qsp H₂O TBS: NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM pH7,4 Tp transfert (western blot): Tris-base 20mM, Glycine 150mM, méthanol 20%, SDS 0,1% Tp SDS PAGE: 6g Tris-base, 28,8g Glycine, 2gSDS, qsp 2l

Article 1

Pierrot, C., Capron, A. & Khalife, J. (1995) Cloning and characterization of two genes encoding *Schistosoma mansoni* elastase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 113-117.



Short communication

Cloning and characterization of two genes encoding *Schistosoma mansoni* elastase

Christine Pierrot*, André Capron, Jamal Khalife

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167, Institut Pasteur, 59019-Lille, France

Received 12 July 1995; revision received 25 September 1995; accepted 29 September 1995

Keywords: *Schistosoma mansoni*; Elastase

Schistosome proteases have been implicated as key enzymes during the life cycle. They seem to play a role during skin penetration [1,2], and in several biological processes including digestion [3] as well as during the immune response. They are notably involved in the cleavage of IgG bound to the surface Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula [4] and the resulting peptides inhibit the essential functions of macrophages [5]. Such a process could be involved in parasite evasion of the host immune response. Moreover, *S. mansoni* proteases seem to interact with host protease inhibitors [6,7], which would render them immunologically inert.

Among schistosome proteases, a 28-kDa serine

protease has been described which was shown to be involved in facilitating infection [8]. Subsequently, this elastase was cloned from a sporocyst cDNA library [9]. Northern blot analysis showed that its expression is developmentally regulated during the *S. mansoni* life cycle. Moreover, in situ hybridization indicated that the enzyme is synthesized within a discrete time period in specialized cells of the organism, suggesting that the expression of this elastase is tightly controlled. In order to study the regulation of the expression of the elastase gene, we have isolated and sequenced a genomic DNA clone. A PCR-based approach allowed us to confirm the genomic DNA sequence and to demonstrate the existence of a second elastase gene.

The screening of a genomic library was done with a probe obtained by a reverse transcription of *S. mansoni* RNA, followed by PCR amplification with specific primers derived from the elastase cDNA sequence [9]. The sequence of the PCR

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the EMBL GeneBank™ under the accession numbers U31768 and U31769.

* Corresponding author, Tel.: +33 20877966; Fax: +33 208 77888.



Fig. 1. The organisation of *S. mansoni* elastase gene EL1. (A) Exons are shown with filled boxes. The total length of this gene is about 3 kb. The symbol * indicates the position of the ATG start codon. (B) The nucleotide sequence of *S. mansoni* gene EL1. Exons are indicated by uppercase letters. The full exon sequences are not presented. ▽ indicates the transcription start point (nt + 1) and * the translation initiation codon. A putative TATA box (TATAAA), an inverted CCAAT box (ATTGG) and two possible polyadenylation sites are underlined. The putative AP1 (TGAGTAA) and NFIL6 (TTGTGAAAG) binding sequences are double underlined when in the coding direction, and underlined with broken lines when in the reverse direction. Repeated motifs are boxed.

product and the restriction enzyme analysis revealed that it was identical to the published one [9]. The use of this probe to screen a genomic library constructed in λ EMBL3 yielded one positive clone (named EL1), purified after several rounds of screening. Digestion with *EcoRI* and Southern blotting with cDNA probes specific for the 5'- and 3'-portions suggested that this clone contained the complete gene, and led to the isolation of two genomic inserts. In order to study its organisation, PCR was performed on EL1 with internal synthetic primers derived from the elastase sequence. All the fragments were subcloned into *EcoRI*-digested PUC-18 and sequenced. Sequencing reactions by the dideoxy chain termination method were carried out using fluoresceine-labelled M13 primers (Auto-Read Sequencing Kit, Pharmacia), and analysed on an A.L.F. sequencer (Pharmacia).

Fig. 1A shows the organisation of the gene EL1 and the nucleotide sequence is shown in Fig. 1B. The comparison with the published cDNA sequence allowed the delineation of introns and exons. The gene contains three exons and two introns of 140 and 604 nt. The first intron is found at a conserved position compared to other eukaryotic serine proteinase genes [10,11]. Both introns possess the 5'-GT and 3'-AG dinucleotide consensus splice signal sequence. The cap site was determined by PCR on cDNA obtained from a λ ZAPII library with a primer specific derived from the elastase cDNA and the reverse primer present in the λ ZAP vector. Three clones have been sequenced and the cap site was found 24 nt from the start codon. The analysis of the 5'-region (spanning 1207 nt) revealed the presence of a putative 'TATA' box (5'-TATAAA) at position-46 and an inverted 'CAAT' box (5'-ATTGG) at position-55 (Fig. 1B). The 5'-region also contains consensus sequences, among which are four motifs corresponding to the recognition site for the transcription factor NF-IL6 [12]. Similar sites were found on human acute phase genes [13] which are induced by IL6 and IL1 during acute inflammation. Moreover, two motifs corresponding to the consensus recognition site for the transcription factor AP-1 were found. This site has already been described in the proximal 5'-region of the *S. mansoni* genes encoding the 28-kDa glutathione S-

transferase [14] and calreticulin [15]. Recently, Khalife et al. [16] have shown that the AP-1 site present in the calreticulin gene may be transactivated by antioxidant agents.

Within the 5'-flanking sequence there are also several repeated motifs: 5'-CAT is repeated eight times, while its complementary sequence 5'-ATG is found nine times; and the tetranucleotide sequence 5'-TGAC is repeated three times in the 5'-flanking region, while its complementary sequence 5'-GTCA is found three times in the 3'-flanking region. The role of this motif is not known, but it has already been described in the 5'-region of the μ -chain C-region germ line gene [17]. All these motifs may be involved in the formation of hair pin loops, which could be essential in the regulation of gene expression. Two possible polyadenylation sites are present, 119 nt (5'-AATAAATAAA) and 139 nt (5'-AATTA) from the end of the open reading frame.

S. mansoni genomic DNA was analysed by Southern blot hybridization with the 0.8-kb cDNA elastase probe and washings were done at 60°C in 0.1 SSC, 0.1% SDS. Different preparations of genomic DNA were digested with *HindIII* which was predicted not to cut within the elastase gene, and with *EcoRI* predicted to cut once. Southern blot analysis revealed several hybridizing fragments which did not correspond to the expected profile (data not shown). This suggests the presence of at least two copies of the gene within the haploid genome. In order to confirm these results, we performed PCR amplification on *S. mansoni* genomic DNA with primers derived from the 5'- and 3'-ends of the elastase cDNA. This method resulted in two PCR products of approximately 1.5 and 1.1 kb. Analysis of the 1.5-kb product by PCR in combination with restriction mapping and sequencing showed that it is identical to EL1, as expected. However, the analysis of the sequence of the 1.1-kb fragment (named EL2, data not shown), subcloned into the PCRTMII vector using the TA Cloning system (Invitrogen), revealed a high degree of identity (89%) at the exon sequences level with EL1, explaining the obtention of two fragments by PCR on genomic DNA. The sequence of EL2 showed the presence of two introns, 131 and 254 nt in length, respectively, located at

EL1	M S N R W R F L V V T L F T Y C L T F E R V S T W L I R S G E P V Q H R T E F P F I A F L T T E R T	50
EL2	M S N R W R F L V V T L F I Y C L T F K R V S T W L I R S D Q P V Q K H T E F P F I A Y I A S K K S	
EL1	M C T G S L V S T R A V L T A G H C V C S P L P V I R V S F L T L R N G D Q Q G I H H Q P S G V K V	100
EL2	M C T G S L V S T R V L T A G H C V C P P M P V I K V T F L T L R N G D Q Q G I H H Q P S G V K V	
EL1	A P G Y M P S C M S A R R R R P I A Q T L S G F D I A I V M L A Q M V N L Q S G I T V I S L P Q A S	150
EL2	A P E Y M P S C T A S P Q R R R I R Q T L S G F A I A T A M L A Q M V N L Q S G I R V I G L P Q A S	
EL1	D I P T P G T G V F I V G I G R D D N D R D P S R K N G G I L K K G R A T I M E C R H A T N G N P I	200
EL2	D I P T P G T D V F I V G Y G R D D N D R D P S R R A G G F E E R G R A T V T E C R H E T H V N P I	
EL1	C V K A G Q N F G Q L P A P G D S G G P L L P S P Q G P V L G V V S H G V T L P N L P D I I V E Y A	250
EL2	C V K A G P N S G Q L L G P G D S G G P L L P S P Q G P V L G V V S H G V T L S H L P - - - E Y V	
EL1	S V A R M L D F V R S N I	263
EL2	S V A R M L N F V R S N I	

Fig. 2. Comparison of the amino acid sequences deduced from EL1 gene (EL1) and EL2 gene (EL2). Identities are boxed.

the same positions when compared to EL1. Both introns possess the 5'-GT and 3'-AG dinucleotide consensus splice signal. The deduced amino acid sequence revealed 79% identity with EL1 (Fig. 2). However, the aspartic acid at position 125, which is involved in the catalytic triad of the substrate binding site of elastase, is replaced by an alanine in EL2.

In conclusion, we have cloned a gene of *S. mansoni* elastase which contains potential regulatory sequences in the proximal 5'-region. The functional significance of these elements remains to be tested. While confirming the sequence of this elastase on *S. mansoni* genomic DNA using a PCR-based strategy, we have detected a second elastase gene with 79% identity of the deduced amino acid sequence in comparison to the elastase described by Newport et al. [9]. The presence of a second elastase gene raises the question whether it

is expressed by *S. mansoni*. It is important to note that the reverse transcription-PCR amplification that we performed revealed the presence of only the elastase transcript previously described. This may be due to the low level of mRNA for the second gene and/or to the competition of primers with the two transcripts. Studies are underway to verify whether both transcripts are actually translated.

Acknowledgements

This work was supported by the Unité INSERM U167. We would like to thank Dr. K. Zemzoumi for providing the *S. mansoni* genomic library, J.P. Kusnierz for the construction of oligonucleotides and C. Godin for technical assistance. We are grateful to Dr. R. Pierce for helpful discussions.

References

- [1] Landsperger, W.J., Stirewalt, M.A. and Dresden, M.H. (1982) Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* 201, 137–144.
- [2] McKerrow, J.H., Keene, W.E., Jeong, K.H., Werb, Z. (1983) Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*: I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Lab. Invest.* 49, 195–200.
- [3] Lindquist, R.N., Senft, A.W., Pettit, M. and McKerrow, J. (1986) *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of the major acidic proteinase from adult worms. *Exp. Parasitol.* 61, 398–404.
- [4] Auriault, C., Ouassi, M.A., Torpier, G., Eisen, H. and Capron, A. (1981) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* 3, 33–44.
- [5] Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A. and Capron, A. (1983) Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of human immunoglobulin G. *FEBS Lett.* 153, 11.
- [6] Modha, J. and Doenhoff, M.J. (1994) *Schistosoma mansoni* host-parasite relationship: interaction of contrapsin with adult worms. *Parasitology*, 109, 487–495.
- [7] Modha, J. and Doenhoff, M.J. (1994) Complex formation of alpha-1-antitrypsin with components in *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasite Immunol.* 16, 447–450.
- [8] McKerrow, J.H., Pino Heiss, S., Lindquist, R. and Werb, Z. (1985) Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 260, 3703–3707.
- [9] Newport, G.R., McKerrow, J.H., Hedstrom, R., Pettitt, M., McGarrigle, L., Barr, P.J. and Agabian, N. (1988) Cloning of the proteinase that facilitates infection by Schistosome parasites. *J. Biol. Chem.* 263, 13179–13184.
- [10] Craik, C., Choo, Q.-L., Swift, G., Quinto, C., MacDonald, R. and Rutter, W. (1984) Structure of two related rat pancreatic trypsin genes. *J. Biol. Chem.* 259, 14225–14264.
- [11] Swift, G., Craik, C., Stary, J., Quinto, C., Lahaie, R., Rutter, W. and MacDonald, R. (1984) Structure of the two related elastase genes expressed in the rat pancreas. *J. Biol. Chem.* 259, 14271–14278.
- [12] Faisst, S. and Meyer, S. (1992) Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 20, 3–26.
- [13] Majello, B., Arcone, R., Toniatti, C. and Ciliberto, G. (1990) Constitutive and induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J.* 9, 457–465.
- [14] McNair, A.T., Dissous, C., Duvaux-Miret, O. and Capron, A. (1993) Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene* 124, 245–249.
- [15] Khalife, J., Pierce, R.J., Godin, C. and Capron, A. (1993) Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 313–316.
- [16] Khalife, J., Godin, C. and Capron, A. (in press) Transcriptional regulation of *Schistosoma mansoni* Calreticulin: possible role of AP1. *Parasitology*.
- [17] Takahashi, N., Kataoka, T. and Honjo, T. (1980) Nucleotide sequence of class-switch recombination region of the mouse immunoglobulin $\gamma 2b$ -chain gene. *Gene* 11, 117–127.

Article 2

Pierrot, C., Godin, C., Liu, J.L., Capron, A. & Khalife, J. (1996) *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during parasite life-cycle. *Parasitology* 113, 519-526.

Schistosoma mansoni elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle

C. PIERROT*, C. GODIN, J. L. LIU, A. CAPRON and J. KHALIFE

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167, Institut Pasteur, 1 Rue du Professeur Calmette, B.P. 245, 59019-Lille, France

(Received 1 April 1996; revised 13 June 1996; accepted 13 June 1996)

SUMMARY

Recombinant *Schistosoma mansoni* elastase was expressed in *Escherichia coli* and an antiserum raised against the recombinant protein was used to investigate stage-specific control of elastase in the parasite, and to determine whether the enzyme could form the basis of a strategy to prevent larval invasion of the host. Results showed that the expression of elastase is developmentally regulated, even if the basal promoter activity does not seem to be stage specific. The analysis of mRNA expression showed the presence of elastase transcript in adult worms although we could not detect the protein at this stage, suggesting that *S. mansoni* employs a form of translational control. The measurement of elastase levels in supernatants of culture schistosomula combined with the localization of elastase in cercariae invading mouse skin showed that the enzyme is heavily released during penetration. Finally, we studied the cytotoxic activity of rat anti-elastase sera, and the analysis of the isotypic profile suggested that IgG2a anti-elastase may be responsible for the cytotoxic effect.

Key words: *Schistosoma mansoni*, elastase, developmentally regulated, immune target.

INTRODUCTION

Schistosoma mansoni is one of the causative agents of schistosomiasis, a parasitic disease affecting 200 million people. Infection of the human host is initiated when an aquatic larval form, the cercaria, penetrates intact skin. Passage through the skin is facilitated by an elastinolytic serine protease, released from the acetabular glands of the cercariae (McKerrow *et al.* 1983). The *S. mansoni* elastase has been implicated in the degradation of macromolecules contained in the skin, such as keratin, laminin, type IV collagen, fibronectin and elastin (McKerrow *et al.* 1985). This suggests that the elastase can be excreted by the parasite and may become a target for the host immune system. The analysis of sera from *S. mansoni*-infected patients has shown the presence of antibodies capable of binding to native elastase (Toy *et al.* 1987).

The cDNA encoding for this elastase was obtained from a sporocyst library and the deduced amino acid sequence showed that the protein is synthesized as a proenzyme (Newport *et al.* 1988). Northern blot analysis showed that the transcript is present in sporocysts but not in adult worms. We have recently reported the organization and the complete sequence of a genomic DNA clone covering the entire elastase gene (Pierrot, Capron & Khalife, 1995), and analysis of the proximal 5'-region revealed several potential

regulatory sequences, among which are 'TATA' box, 'CAAT' box, NF-IL6 and AP1 consensus recognition sites. These observations strongly encourage us to investigate the use of *S. mansoni* elastase, both as a model for investigating stage-specific control of protein expression in this parasite, and to determine whether the enzyme could form the basis of a strategy to prevent larval invasion of the host.

The aims of the present work were the following. (1) To investigate the regulation of elastase expression during the *S. mansoni* life-cycle. This was accomplished at the mRNA level by using RT-PCR and by the detection of protein expression during parasite development. (2) To study *in vivo* the localization of elastase in cercariae invading skin, and to examine *in vitro* the killing capacity of anti-elastase antibodies against *S. mansoni* schistosomula in the presence of macrophages. The results of these experiments are presented in this paper.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and antigen preparations

A Puerto Rican strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters. Eggs were recovered from infected livers of hamsters. Cercariae were released from infected snails and concentrated on ice. Schistosomula were produced by mechanical transformation as described by Ramalho-Pinto *et al.* (1974), and cultured in

* Corresponding author. Tel: +20 877800. Fax: +20 877888.

MEM containing 8 µg/ml of gentamycin at 37 °C in a 5% CO₂ gassed incubator for 3–18 h. Adult worms were prepared by hepatoportal perfusion of infected hamsters 40 days after cercarial infection. Antigens were prepared for Western blot and ELISA experiments. Eggs were first ground to a powder in liquid nitrogen and then treated as other stages. Parasites were homogenized in PBS containing 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 1 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA). The homogenate was sonicated 6 times for 30 s using a Labsonic sonicator (B. Braun, USA), and centrifuged twice at 10000 *g* for 10 min at 4 °C. The supernatant fractions were recovered and used as the source of antigens. The measurement of protein content was done using the BCA protein assay reagent (Pierce, USA).

RNA preparations and RT-PCR

Total RNA from eggs, cercariae and adult worms was prepared using 4 M guanidine thiocyanate lysis solution and the caesium chloride gradient purification method (Chirgwin *et al.* 1978). Single-stranded cDNA was synthesized from 10 µg of total RNA in the presence of Mu-MLV reverse transcriptase and oligo(dT) 1 h at 37 °C. PCR experiments were then performed on 1 µl (of 25 µl final volume) of these matrices with specific synthetic primers derived from the published sequence of the elastase (Newport *et al.* 1988): forward 5'-AATCACATCGATGTCTGAACCGATGGAGG-3', reverse 5'-GAGACCCGGGGTTCAAATATTGGAGCGTAC-3'. Thirty-five cycles were performed, each composed of a denaturation step for 1 min at 94 °C, primer annealing for 1 min at 55 °C and extension for 1.5 min at 72 °C. In order to subclone the PCR product coding for mature elastase into an expression vector, we performed a PCR under the same conditions with a 5'-primer derived from the sequence of the mature protein (5'-ACCGGATCCATACGTAGTGGTGGACCT-3'). To orientate the cloning, we have inserted restriction sites in the 5' (*Bam*HI) and 3' (*Sma*I) primer sequences (underlined).

Expression of recombinant elastase

In order to produce a recombinant elastase we used the pQE 30 vector (Qiagen) which uses 6 histidines at the N-terminus as a carrier. (His)₆ fusion proteins produced in this system have the advantage of needing only one affinity-chromatography step for purification. For the purpose of our study, we subcloned into the pQE 30 plasmid the *Bam*HI–*Sma*I fragment encoding for mature elastase, obtained by RT-PCR on *S. mansoni* adult

worm RNA. The sequence of this fragment revealed that it was identical to that previously published (Newport *et al.* 1988). The expression and purification of the recombinant protein were done using the QIAexpress system (Qiagen). Briefly, the protein was expressed in M15 *E. coli* host in LB medium containing 100 µg/ml of ampicillin and 25 µg/ml kanamycin. The purified protein was dialysed against serial dilutions of Tris buffer pH 8.5, containing 4 M to no urea. The measurement of protein content was done using the BCA protein assay reagent (Pierce, USA) and the yield of recombinant protein was 5 mg/l of culture (O.D. 600 nm = 0.6).

Antisera production

A New Zealand rabbit was immunized by injection of 350 µg of recombinant elastase as described by Vaitukaitis *et al.* (1971) in the presence of complete Freund's adjuvant. A secondary boost was performed 3 weeks later by a subclavicular injection of 200 µg elastase with incomplete Freund's adjuvant. Five LOU M rats were also immunized by the same method (30 µg elastase/rat) and all the sera were collected 4 weeks after injection or boost. Serum specificity was tested by Western blotting.

Western blotting

Antigen preparations were fractionated on 13% SDS–polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to nitrocellulose filters (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979). Non-specific protein binding sites were blocked with PBS containing 5% non-fat dried milk for 2 h at room temperature. Filters were incubated with the primary serum (1:200) diluted in PBS containing 5% non-fat dried milk overnight at 4 °C and washed 3 times in PBS containing 0.4% Tween-20. Detection with HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:500) (Sanofi-Pasteur, France) or anti-rat IgG (1:500) (Sigma, USA) was done as previously described (Khalife *et al.* 1990).

Capture sandwich ELISA

IgG was purified from rabbit anti-elastase serum on protein-A Sepharose (Pharmacia, Sweden) and 1 µg of the purified IgG was labelled with biotin according to the manufacture's procedure (Calbiochem). Then 96-well microtitre plates (Immulon III, Dynatech Laboratories, USA) were coated for 3 h at 37 °C with 100 µl/well of purified IgG diluted to 10 µg/ml in PBS. After 3 washes in PBS containing 0.1% Tween-20, and saturation for 1 h at room temperature with 200 µl of PBS containing 0.5% gelatin, 100 µl/well of antigens or recombinant

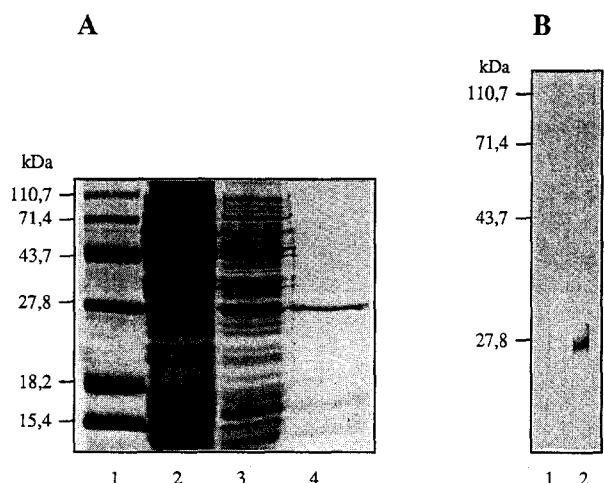


Fig. 1. Expression of recombinant elastase and antiserum production. (A) SDS-PAGE analysis of recombinant elastase. Lane 1, molecular weight standards (GIBCO-BRL); Lane 2, non-induced culture; Lane 3, IPTG induced culture; Lane 4, purified recombinant elastase. (B) Immunoblot analysis of rabbit anti-elastase antiserum. Cercarial extracts were subjected to SDS-PAGE. After transfer to nitrocellulose membrane, strips were incubated with pre-immune rabbit serum (1) or rabbit anti-elastase serum (2). Rabbit antibodies were probed with an HRP-conjugated anti-rabbit antibody.

elastase serially diluted in PBS-0.1% Tween-20 were added and incubated overnight at 4 °C. The plates were then washed as above, incubated for 1.5 h at 37 °C with 100 µl of biotin-labelled purified IgG diluted in PBS-0.1% Tween-20 (1:2500), and incubated for 30 min at 37 °C with 100 µl of streptavidin-HRP conjugate (1:2500) (Amersham, France). After 5 final washes, 1 mg/ml substrate (ortho-phenylenediamine, Sigma) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.5), containing 0.03% H₂O₂ was added and incubated for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 100 µl of 2 M HCl and the optical density was measured using a Titertek Multiscan MCC/340 reader at 492 nm. Results are expressed in ng of elastase per mg of total protein.

Immunolocalization in cercariae invading skin

The localization of elastase was carried out on *S. mansoni* schistosomula during skin invasion. Schistosomula were obtained by placing a drop of water containing cercariae on the shaved abdominal skin of a mouse anaesthetized with pentobarbital. After 1 h the skin was excised, cut into small pieces, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, dehydrated and embedded in paraffin. Deparaffinized sections cut at a thickness of 3 µm were rehydrated and incubated for 30 min in a solution of 0.5% ovalbumin (OVA) in Tris-HCl-buffered saline

(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4, TBS) containing 5% decomplexed goat serum. This was followed by incubation with rabbit anti-elastase serum diluted in TBS-0.5% OVA (1:1000) overnight at 4 °C. After washing with TBS-0.5% OVA (2 × 15 min), alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) was added and incubated for 1 h at room temperature. After washing, the enzyme reaction was revealed with New Fuschin substrate (Dako, Denmark). Counterstaining was performed with Harris's haematoxylin. As controls, the immunized rabbit serum was replaced by pre-immune serum at the same dilution.

Macrophage-mediated cytotoxicity

Peritoneal macrophages from non-immune LOU rats were purified after the removal of non-adherent cells following culture for 2 h. The macrophages were incubated overnight at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in MEM containing 20% normal rat serum. The cells were then activated for 4 h in the presence of sera (diluted 1:10 in culture medium) from rats immunized with the recombinant elastase. A total of 70 skin-prepared schistosomula (Clegg & Smithers, 1972) were then added in 50 µl and mortality was measured 24 h later by microscopical examination.

Analysis of serum anti-elastase isotypic profile by ELISA

Microtitre plates (Immulon III, Dynatech Laboratories) were coated overnight at 4 °C with 50 µl/well of purified recombinant elastase diluted at 10 µg/ml in PBS. After 3 washes in PBS containing 0.1% Tween-20, and saturation for 1 h at room temperature with 100 µl of PBS containing 0.5% gelatin, rat sera serially diluted in PBS-0.1% Tween-20 were added and incubated for 3 h at 37 °C. The plates were then washed as above and incubated for 1.5 h at 37 °C with 50 µl of HRP-conjugated rat anti-IgG2a (1:8000) or anti-IgG2c (1:4000) (Cimex, Louvain) diluted in PBS-0.1% Tween-20. Colour development and measurement were done as described above.

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of recombinant elastase

Fig. 1A shows SDS-PAGE of recombinant elastase expressed in *E. coli*, that migrates at approximately 28 kDa. The recombinant protein is pure (lane 4) and is recognized by a rabbit antiserum raised against cercariae-released products (kindly provided by M. Doenhoff) (data not shown). The specificity of rabbit antiserum raised against recombinant elastase

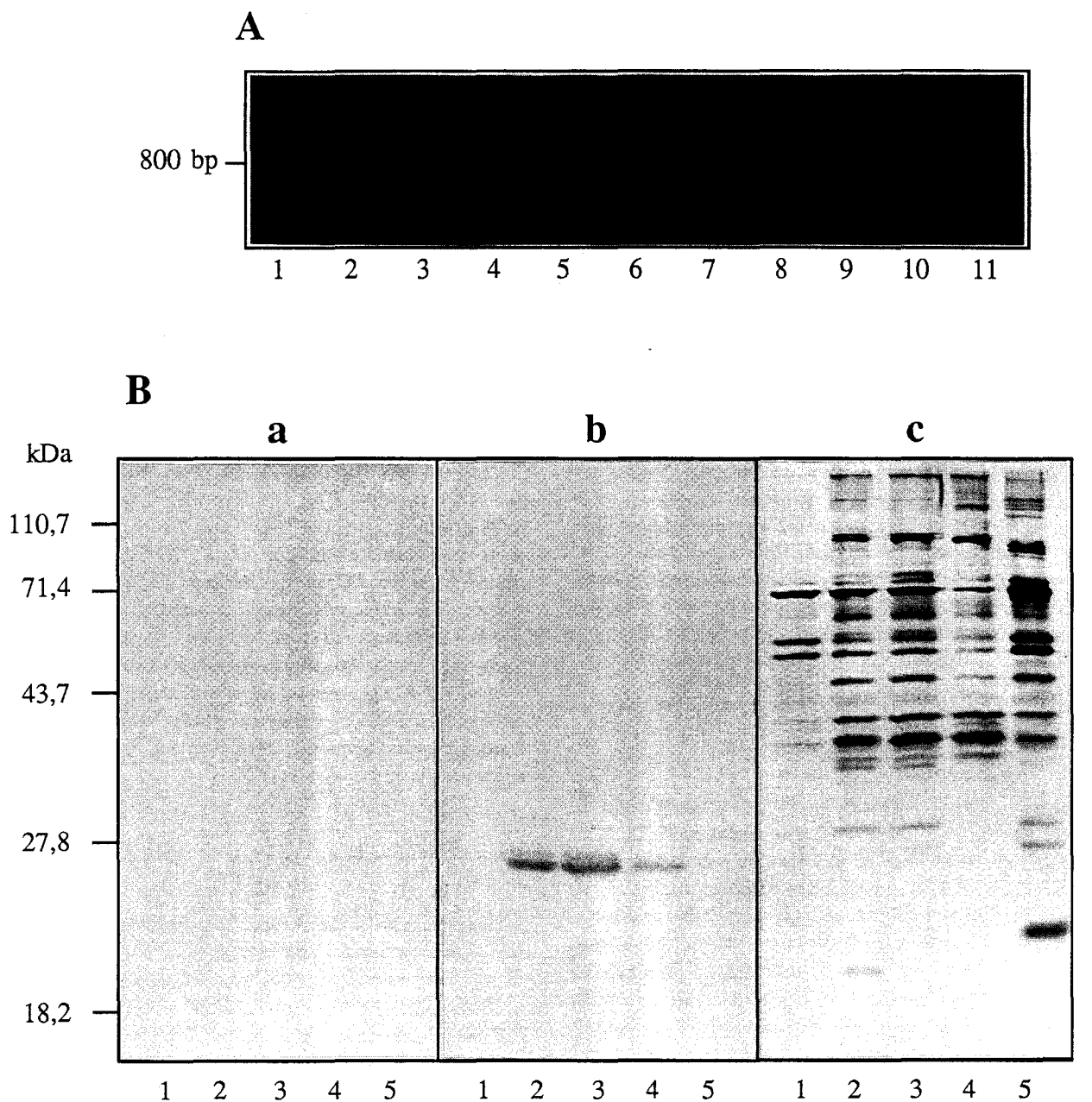


Fig. 2. Expression of native elastase during the *Schistosoma mansoni* life-cycle. (A) Agarose gel analysis of RT-PCR products after amplification with elastase-specific primers of RNA extracted from eggs (Lanes 2–4), cercariae (Lanes 5–7) and adult worms (Lanes 8–10). In each case, PCR were performed with 5' and 3' primers (Lanes 2, 5, 8), with the 5' primer (Lanes 3, 6, 9), with the 3' primer (Lanes 4, 7, 10). Lane 11: PCR control with no template; Lane 1: 100 bp DNA ladder (Pharmacia). (B) Western blots of total extracts of mixed eggs (Lanes 1), cercariae (Lanes 2), 3 h (Lanes 3) and 18 h (Lanes 4) mechanically transformed schistosomulae, and adult worms (Lanes 5) probed with normal rabbit serum (a), rabbit anti-recombinant elastase (b), or rabbit serum raised against whole worm antigens (c).

was tested by Western blotting. The serum recognized a single antigen of 28 kDa in homogenates of cercariae, corresponding to the native elastase (Fig. 1B). This serum was then used to evaluate the presence of native elastase during the *S. mansoni* life-cycle.

Stage-specific expression of native elastase

The regulation of the elastase gene was studied at the mRNA and protein levels. First, the elastase mRNA

was detected by RT-PCR experiments on RNA from eggs, cercariae and adult worms. This yielded a 800 bp fragment at each stage (Fig. 2A). The sequencing of these fragments reveals that all stages contain an elastase transcript. Whereas Newport *et al.* (1988) could not detect the presence in adult worms of the elastase transcript by Northern blot analysis we detected it by RT-PCR which is a more sensitive method. While these results showed the presence of transcripts, it is not known if they are actually translated. A Western blot of total extracts

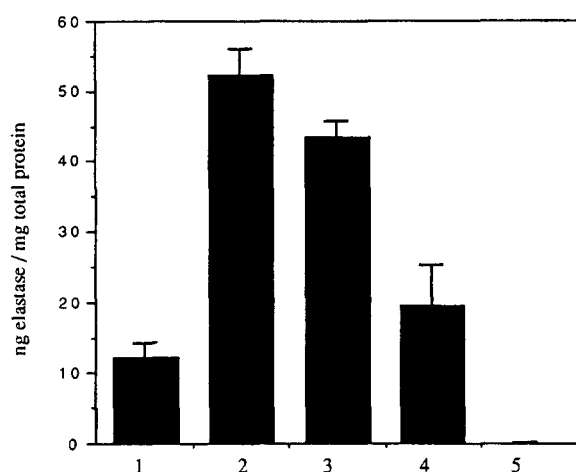


Fig. 3. Immuno-capture ELISA analysis of elastase expression during the *Schistosoma mansoni* life-cycle. Representative profile of amounts of native elastase in ng/mg of total proteins of eggs (1), cercariae (2), 3 h (3) and 18 h (4) mechanically transformed schistosomula, and adult worms (5).

prepared from different life-cycle stages of *S. mansoni* was probed with the rabbit antiserum raised against the purified recombinant elastase (Fig. 2B). We detected the presence of native elastase in homogenates of cercariae and schistosomula (Fig. 2B, b, Lanes 2–4) but not in eggs and adult worms (Fig. 2B, b, Lanes 1 and 5), although the quality of the different antigen preparations was checked with a rabbit anti-SWAP antiserum (Fig. 2B, c). Nevertheless, the amount of total protein (20 µg/lane) might be insufficient to detect low quantities of native elastase on a Western blot. In order to verify this, an immuno-capture ELISA was performed. A standard curve established with the purified recombinant elastase allowed us to evaluate the quantities of elastase per mg of total protein. Fig. 3 shows the amounts of native elastase at each life-cycle stage. Although we could not measure any elastase in adult worms by this assay, we detected it in eggs. This experiment was repeated with two different antigen preparations and the profile was identical.

These results confirm and extend previous immunological and enzymological analyses which suggest that the expression of the elastase is stage specific (Gazzinelli & Pellegrino, 1964; Keene *et al.* 1983; Pino Heiss *et al.* 1986) and tightly controlled. It is interesting to point out from our RT-PCR studies, that the presence of elastase mRNA in all stages of *S. mansoni* indicates that the basal promoter activity of the elastase gene is not stage specific, suggesting the absence of control at the level of transcription initiation. However, the regulation of its expression could be explained by two possibilities. First, the absence of elastase in adult worms suggests that *S. mansoni* employs a form of translational control preventing the translation of elastase mRNA at this stage. One such example of stage-specific

translational control occurs in the case of *S. mansoni* glutathione peroxidase (Roche *et al.* 1996). The GSHpx mRNA is present in both larval and adult worm stages but is translated only in adult worms. Secondly, the difference of elastase expression in larvae and eggs might be due to the control of translation or to the presence of nuclear factors involved in a transcriptional enhancer activity. In the case of elastase, these factors could be over-expressed in larval stages.

Immunolocalization in cercariae invading skin

Since *S. mansoni* elastase facilitates invasion of host tissues, we wished to measure its level both in schistosomula and in the released products at various times of culture. The immuno-capture ELISA allowed us to show that while elastase increases in the released products (data not shown) it decreases in schistosomula. This result is compatible with previous studies (Keene *et al.* 1983) and with the role of the elastase during the invasion of host skin. To extend these observations, we examined the localization of elastase during the penetration of host skin. This question was addressed by using sections of mouse skin after contact for 1 h with cercariae and the presence of elastase was revealed using the rabbit anti-elastase serum. Very strong labelling was observed inside the cercariae in the acetabular glands and their secretions (Fig. 4) as previously described (Pino-Heiss *et al.* 1986; Fishelson *et al.* 1992). We also observed labelling in the mouse skin, showing clearly that the elastase is excreted. This specific staining indicates that the native protein recognized by antibodies against recombinant elastase is heavily released during skin invasion. Moreover, this suggests that the elastase may be a target for the host immune response.

Macrophage-mediated cytotoxicity

During *S. mansoni* infection, it is well admitted that antibody-dependent cytotoxicity mechanisms play an essential role in the destruction of larvae in rats, primates and man (Clegg *et al.* 1972; Butterworth *et al.* 1975). Subsequently, it has been shown that sera of *S. mansoni*-infected patients contained antibodies against elastase (Toy *et al.* 1987). To investigate whether elastase could be a target for immune attack, rats were immunized with the recombinant elastase in the presence of complete Freund's adjuvant. Western blot analysis showed the presence in sera of antibodies against native protein after a single immunization (Fig. 5). The functional role of these antibodies was then evaluated. *In vitro* experiments on the sera from immunized rats revealed significant levels of cytotoxicity against schistosomula in the presence of macrophages purified from normal rats

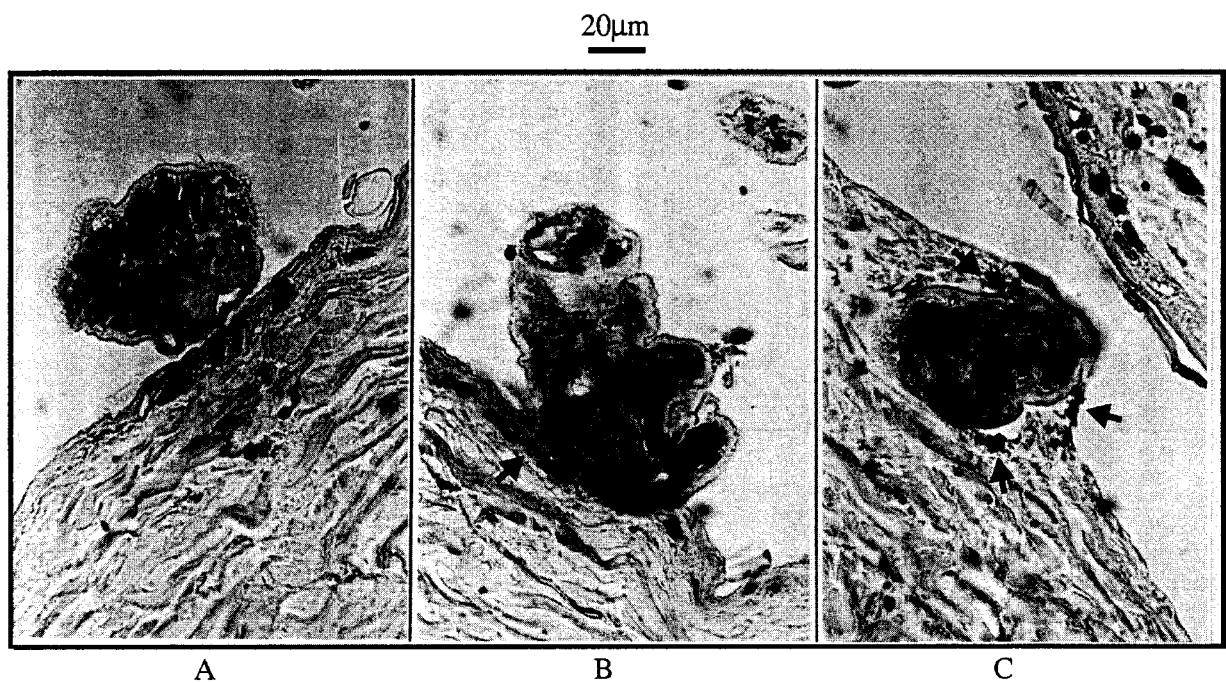


Fig. 4. Immunolocalization of elastase in *Schistosoma mansoni* cercariae invading mouse skin (A–C). Alkaline phosphatase labelling. Elastase is located inside the cercariae in the acetabular glands and their secretions, and also in the mouse skin (indicated by arrows).

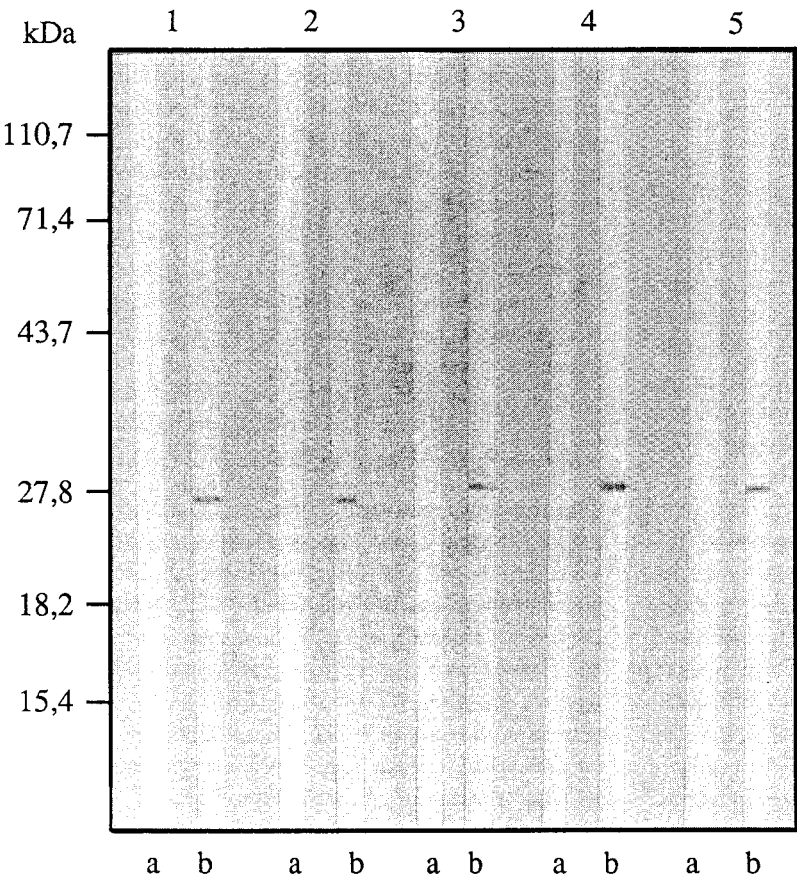


Fig. 5. Immunoblot analysis of rat sera raised against recombinant elastase. Cercarial antigens were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose filters. Strips were incubated for each rat serum (1–5) with pre-immune (a) or anti-elastase (b) sera.

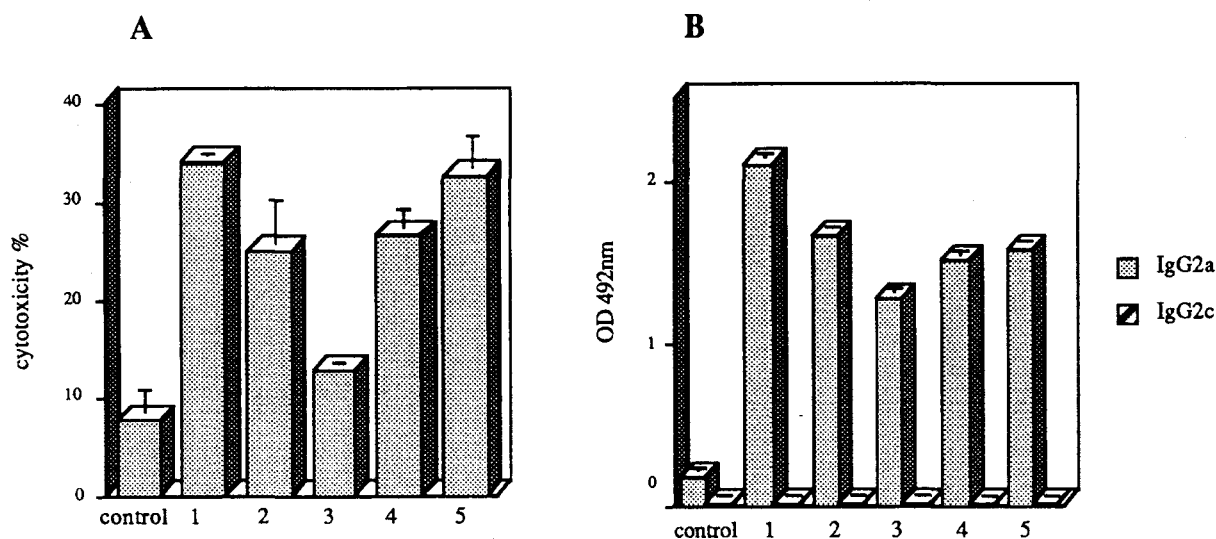


Fig. 6. (A) Macrophage-mediated cytotoxicity *in vitro*. Percentage cytotoxicity for each rat anti-elastase serum (1–5) and pool of pre-immune rat sera (control) on *Schistosoma mansoni* schistosomulae. (B) Analysis of rat anti-elastase sera isotypic profile by ELISA, for each rat anti-elastase serum (1–5) and pool of pre-immune rat sera (control). O.D. measured at 492 nm after incubation with HRP-conjugated anti-IgG2a (□) or anti-IgG2c (■) antibodies.

(Fig. 6A). However, serum from one immunized rat showed a low cytotoxic activity (rat no. 3). Under the same conditions, negative control serum failed to show any significant killing activity. These results show that, after a single immunization with recombinant elastase, rats are able to produce effector antibodies. It is important to note that in experimental rat schistosomiasis the effector antibodies are of the IgG2a isotype and that their activity can be blocked by IgG2c (Grzych *et al.* 1984). This led us to test the hypothesis that immunization with elastase may mainly induce effector antibodies. To address this point, we performed a direct ELISA with the recombinant elastase. Results presented in Fig. 6B showed that sera from immunized rats tested above contained high levels of IgG2a antibodies when compared to IgG2c levels. Concerning the serum of rat no. 3 which had a low cytotoxic activity, the level of IgG2a antibodies was low when compared to the other sera. The interpretation of these observations is that IgG2a anti-elastase may be responsible for the cytotoxic effect.

Although these findings contribute to the evidence that elastase could be a target for immune attack at the larval stage, it will be of interest to determine whether animals immunized with recombinant elastase will exhibit immunity to *S. mansoni*.

This work was supported by the Unité INSERM U167 and by the MESR ACCSV no. 7. We are grateful to Dr R. J. Pierce for helpful discussions, J. P. Papin for technical assistance and to J. P. Kusnier for synthesizing oligonucleotides. We acknowledge the support of Volvic S.A. for the maintenance of the schistosome life-cycle. C.P. is a doctoral fellow of the CNRS and the Région Nord-Pas de Calais.

REFERENCES

- BUTTERWORTH, A. E., STURROCK, R. F., HOUBA, V. & REES, P. H. (1975). Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula *in vitro*. *Nature, London* **252**, 503–505.
- CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, A. E., MACDONALD, J. & RUTTER, W. J. (1978). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294–5299.
- CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. (1972). The effect of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *International Journal for Parasitology* **2**, 79–85.
- FISHELSON, Z., AMIRI, P., FRIEND, D. S., MARIKOVSKY, M., PETTIT, M., NEWPORT, G. & MCKERROW, J. H. (1992). *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. *Experimental Parasitology* **75**, 87–98.
- GAZZINELLI, G. & PELLEGRINO, J. (1964). Elastolytic activity of *Schistosoma mansoni* cercarial extract. *Journal of Parasitology* **50**, 591–592.
- GRZYCH, J. M., CAPRON, M., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1984). Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology* **133**, 998–1004.
- KEENE, W. E., JEONG, K. H., MCKERROW, J. H. & WERB, Z. (1983). Degradation of extra cellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. II. Degradation by newly transformed and developing schistosomula. *Laboratory Investigation* **49**, 201–207.
- KHALIFE, J., GRZYCH, J. M., PIERCE, R. J., AMEISEN, J. C., SCHACHT, A. M., GRAS-MASSE, H., TARTAR, A., LECOCQ, J. P. & CAPRON, A. (1990). Immunological cross-reactivity between the human immunodeficiency virus type I virion infectivity factor and a 170 kDa surface antigen of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine* **172**, 1001–1004.
- MCKERROW, J. H., KEENE, W. E., JEONG, K. H. & WERB, Z. (1983). Degradation of extra cellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I: Degradation by cercariae as

- a model for initial parasite invasion of host. *Laboratory Investigation* **49**, 195–200.
- McKERRROW, J. H., PINO-HEISS, S., LINDQUIST, R. & WERB, Z. (1985). Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3703–3707.
- NEWPORT, G. R., McKERRROW, J. H., HEDSTROM, R., PETITT, M., McGARRIGLE, L., BARR, P. J. & AGABIAN, N. (1988). Cloning of the proteinase that facilitates infection by Schistosome parasites. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 13179–13184.
- PIERROT, C., CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1995). Cloning and characterisation of two genes encoding *Schistosoma mansoni* elastase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 113–117.
- PINO-HEISS, S., PETTIT, M., BECKSTEAD, J. H. & McKERRROW, J. H. (1986). Preparation of mouse monoclonal antibodies and evidence for a host immune response to the preacetabular gland proteinase of *Schistosoma mansoni* cercariae. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**, 536–543.
- RAMALHO-PINTO, F. J., GAZZINELLI, G., HOWELLS, R. E., MOTA-SANTOS, T. A., FIGUEIREDO, E. A. & PELLEGRINO, J. (1974). *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomulae *in vitro*. *Experimental Parasitology* **36**, 360–372.
- ROCHE, C., LIU, J. L., LEPRESLE, T., CAPRON, A. & PIERCE, R. J. (1996). Tissue localization and stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 187–195.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels onto nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350–4354.
- TOY, L., PETTIT, M., WANG, Y. F., HEDSTROM, R. & McKERRROW, J. H. (1987). The immune response to stage specific proteolytic enzymes of *Schistosoma mansoni*. In *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, vol. **60**, *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*, pp. 85–103, Alan R. Liss, Inc., W.Y.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J. B., NIESCHLAF, E. & ROSS, G. T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *Journal of Clinical Endocrinology* **33**, 988–991.

Article 3

Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. (1997)
Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni*
serine protease. *Parasitology*, sous presse.

**Molecular characterization of a partial sequence
encoding a novel *Schistosoma mansoni*
serine protease.**

C. COCUBE, C. PIERROT, C. CETRE, C. GODIN, A. CAPRON and
J. KHALIFE.

Running Title: *Schistosoma mansoni* Kallikrein-like protease.

*Address Correspondence: Cécile Cocude: Centre d'Immunologie et de
Biologie Parasitaire, INSERM U167, Institut Pasteur, 1 Rue du Prof.
Calmette, B.P. 245, 59019- Lille, France.*

e-mail: Cecile.Cocude@pasteur-lille.fr

SUMMARY

A PCR strategy using degenerate oligonucleotide primers based upon consensus sequences of the active site of serine proteases yielded the obtention of a 467 bp fragment from genomic DNA from *Schistosoma mansoni* cercariae. The sequence presented a continuous open reading frame and the deduced amino acid sequence (156 aa) presented homologies with various serine proteases, in particularly the highest percentage of identity was observed with a mammalian plasmatic kallikrein. The expression of this serine protease was studied first at the mRNA level and it was only detected by RT-PCR in cercariae and in adult worms. At the protein level we were able to detect it by Western blotting and by using antigen extracts from metabolically radiolabelled worms. The absence of any positive signal in Northern blot and the detection of the protein suggest that the mRNA has a very short half-life, however the protein may be accumulated in the parasite. The significance of identity with mammalian kallikrein was confirmed by cross-immunoreactivity with a natif porcine pancreatic kallikrein. However, no cross-reactivity was observed with the elastase of *S.mansoni*, another serine protease. Thus, we suggest that the serine protease described in this paper is a kallikrein-like protease.

Key words: *Schistosoma mansoni*, serine protease, kallikrein-like.

INTRODUCTION

The life cycle of *Schistosoma mansoni* consists of larval, intermediate and adult forms which have different morphologies. Asexual multiplication occurs in the snail intermediate host and released cercariae can penetrate the skin of man or laboratory animals. Early studies showed that this process was mediated by proteases. They facilitate penetration by digestion of host skin (Lansperger, Stirewalt & Dresden, 1982; McKerrow *et al.* 1983, Newport *et al.* 1988; Marikovsky, Arnon & Fishelson, 1990), which results in the formation of small « tunnels » in the epidermis. Proteolytic enzymes are also involved in a wide range of biological processes such as nutrition (Lindquist *et al.* 1986; Senft, Goldberg & Byram, 1981; Chappell & Dresden, 1987) and play a key role in the survival of *S.mansoni* (McKerrow & Doenhoff, 1988). Aside from these activities, proteases are involved in immune evasion by destruction of antibody bound to the Fc receptor on the surface of schistosomula (Auriault *et al.* 1981), or by cleavage of complement, promoting the resistance of the larvae to complement-mediated killing (Marikovsky, Arnon & Fishelson, 1988). Moreover, proteases have been implicated in the modulation of the host immune response. Indeed, the role of proteases, particularly serine proteases, in the regulation of *in vitro* and *in vivo* IgE synthesis has been demonstrated (Verwaerde *et al.* 1986,1988).

Since serine proteases play critical roles in *S. mansoni* infection and may be targets of anti-parasitic vaccines or chemotherapy, we undertook this study in order to identify novel serine protease gene fragments by using degenerate oligonucleotide primers based on the active site of these enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Parasite

A Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters. Cercariae were released from infected snails and concentrated on ice. Adult worms were prepared by hepatoportal perfusion of infected hamsters 40 days after cercarial infection. They were immediately washed in MEM containing 0,02% gentalline-gentamycine (GIBCO).

PCR procedure

Primers were designed based upon serine protease consensus sequences flanking the histidine-5' (CAC) and serine-3' (AGT/c or TCi) of the active site (Sakanari *et al.* 1989). We used different degenerate oligonucleotides to amplify genomic DNA from *S. mansoni* cercariae, single stranded cDNA reverse transcribed from adult worm RNA, extracted according to standard methods (Sambrook, Fritsh & Maniatis, 1989), or a DNA preparation from a cDNA library. The sequence of primers used were: primer 5' (sense): 1: 5'- TGG GTi GTi ACi GCi GCi CAC TG -3', primers 3' (antisense): 2: 5'- AG iGG iCC iCC iCT ATC iCC -3', 3: 5'- AG iGG iCC iCC iGA ATC iCC -3', 4: 5'- AG iGG iCC iCC iCT GTC iCC -3', 5: 5'- AG iGG iCC iCC iGA GTC iCC -3'.

The cycling parameters were as follows: 94°C 7 min as an initial denaturing step, followed by 94°C for 1 min, 45°C for 1min, 1.5 min at 72°C for 40 cycles and a final extension at 72°C for 10 min.

Cloning and sequencing

All PCR products were subcloned into the PCR[™] II vector using the TA Cloning system (Invitrogen), and were sequenced. The sequencing reaction by the dideoxy chain termination method was performed using fluoresceine labelled primers (Autoread[™] Sequencing kit, Pharmacia, Sweden), and analysed on an ALF sequencer (Pharmacia).

Specific primers

We have synthesized specific primers based upon the fragment of interest (SmSP1). The sequence of primers applied were: P1 (sense): 5' TGT ATT CAA CCA ATG CCA 3' and P2 (antisense): 5' CTT GGC AAG CAT CAA TTC 3'. The expected fragment size of the fragment amplified with P1 and P2 is 427 bp long.

mRNA preparations and RT-PCR

Total RNA from adult worms and cercariae was prepared using the 4M guanidine thiocyanate lysis solution and the caesium chloride gradient purification method (Chirgwin *et al.* 1978). The mRNA was isolated by passage of total RNA through an oligo (dT)-cellulose column (mRNA Purification Kit, Pharmacia).

Single stranded cDNA was synthesized from 5µg of mRNA in the presence of Mu-MLV reverse transcriptase and oligo (dT) for 1h at 37°C. PCR experiments were then performed on 1µl of these matrices with synthetic primers (P1 and P2) derived from the sequence of interest. Forty

cycles were performed, each composed by a denaturation step for 1 min at 94°C, primer annealing for 1 min at 50°C and extension for 1 min at 72°C.

Expression of recombinant protein

The sequenced PCR product, cloned into the PCR[™] II vector was digested by *Sac* I and *Xho* I and was subcloned into the *Sac* I/*Sal* I digested pQE30 vector (Qiagen) which produces a fusion protein with six histidines at the N-terminus. (His)₆ tagged protein produced in this system has the advantage of needing only one affinity-chromatography step for purification on a Ni-agarose column. The expression and purification of the recombinant protein were done using the QIAexpress system (Qiagen). The concentration of protein content was measured by the BCA method (Pierce, USA).

Antisera production

LOU M rats were immunized by injection (50µg/rat) of recombinant protein as described by Vaitukaitis *et al.* (1971) in the presence of complete Freund's adjuvant. A secondary boost was performed 4 weeks later with incomplete Freund's adjuvant. The sera were collected 3 weeks later. Serum specificity was tested by Western blotting.

Western blotting

Purified recombinant protein or kallikrein from porcine pancreas (SIGMA), were loaded independently on a 13% SDS-PAGE and then electrophoretically transferred onto nitrocellulose filters (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979). The nitrocellulose was washed in PBS and

preincubated, to block non-specific binding, in PBS containing 5% non-fat dried milk for 2h at room temperature. Filters were incubated with the primary serum diluted in PBS containing 5% non-fat dried milk overnight at 4°C. After 3 washes in PBS containing 0,4% Tween-20, detection with goat anti-rat IgG conjugated to peroxylase (1/500) (Sigma, USA) was done by using the HRP color development reagent (BIORAD).

Metabolic labelling and Immunoprecipitation

Adult worms (2 pairs/ml) were maintained first in MEM containing 0,02% gentalline-gentamycine and 10% foetal calf serum (FCS) without methionine (GIBCO) for 1 h at 37°C in a 5% CO₂ gassed incubator. The parasites were then incubated overnight with ³⁵S-Met (50µci/ml) (Amersham). After washes with MEM, adult worms (about 15 pairs) were homogenized in lysis buffer (Tris 10mM, NaCl 0.15M, NP40 0.5%, EDTA 1mM, PMSF 0.5mM pH 7.4), sonicated using a Labsonic sonicator (B. Braun, USA) and centrifuged at 10000 rpm for 5min. The supernatant was recovered and the labelling was estimated after precipitation by TCA (25%) for 1h on ice. Before immunoprecipitation, antigens were depleted on protein G-sepharose (SIGMA) with normal rat serum in TNTE buffer (Tris 5mM, NaCl 0,15M, NP40 0,5%, EDTA 2mM, PMSF 0,5mM. pH 7,4) for 2 h at 4°C. The sample of antigens was then mixed with the protein G-sepharose preincubated with normal rat serum or rat antiserum directed against recombinant protein, in TNTE overnight at 4°C. After several washes, the immune complexes were recovered from beads by boiling in sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 10% sucrose and 0.005% bromophenol blue) and analysed on SDS-PAGE 15%. After treatment with an « Amplify » solution (Amersham), the dried gel was exposed to KODAK BIOMAX™ MR film.

RESULTS

Amplification of serine protease gene fragments

Genomic DNA, a cDNA library and reverse transcription products obtained from adult worm mRNA were used in PCR for amplification of serine protease genes. After several PCR rounds, a specific fragment of 467 bp with degenerate primers 1 and 2 was obtained in the presence of genomic DNA. Controls using only the 5' and 3' oligonucleotide primers and the two primers without DNA were negative (Fig. 1).

Identification of clones and sequencing

Following purification of the PCR product, the fragment was subcloned and sequenced. Different clones that had inserts of the right size gave identical sequences, the nucleotide and derived amino acid sequences of a clone named SmSP1 are shown in Fig. 2. The nucleotide sequence has an open reading frame (ORF) of 467 bp. This ORF encoded 156 amino acids and contained an Asp residue (D) which constitutes one of the three amino acids involved in the active site of serine proteases along with the His (5') and the Ser (3') residues. However, due to the fact that these two amino acids were predicted by using degenerate primers, we screened a *S. mansoni* genomic library in order to confirm the presence of the histidine and serine amino acids. This screening led us to the isolation of two genomic clones which hybridized with the SmSP1 fragment. Partial sequencing of these two genomic clones without prior amplification confirmed the nucleotide sequence of SmSP1 and the presence of the histidine and the serine residues in this serine protease. The complete

gene sequence will be further characterized by sequencing of these genomic clones.

Homology with other proteins

The combined Swiss-Prot and NBRF-PIRTM-protein databases (DNA Star, Madison WI, USA) were screened for sequences related to the predicted polypeptide sequence of the SmSP1 clone. The SmSP1 clone encodes a protein sequence which is 42% identical to the vampire bat tissue plasminogen activator from the N terminal side (positions 1 to 59) and 36% identical to the human protein C precursor from the C terminal side (positions 44 to 99). The comparison of the amino acid sequence derived from the sequence of SmSP1 with mouse plasmatic kallikrein shows an overall 35% identity (Fig. 3). It is interesting to note that the SmSP1 encoded protein has a conserved sequence NDIALl which is found in all compared serine proteases. Moreover, the comparison with another *S.mansoni* serine protease, the elastase, revealed an overall 26% identity (data not shown).

Expression of mRNA corresponding to SmSP1 clone at different life-cycle stages

The stage-specific expression of mRNA corresponding to SmSP1 was detected by RT-PCR experiments on mRNA from cercariae and adult worms in the presence of specific primers derived from the SmSP1 nucleotide sequence. As expected, we obtained a fragment of 427 bp at both stages (Fig. 4). The sequencing of these fragments confirmed the presence of the mRNA. In order to rule out any genomic DNA contamination of the RT-PCR products, we amplified the same products used above with

the primers derived from the elastase gene of *S.mansoni* which contains an intron between these two primers. The absence of amplification of this intron confirmed that the SmSP1 fragment gene was amplified from the mRNA. Controls using only the 5' and 3' oligonucleotide primers and the two primers without DNA were negative. In addition, RT-PCR control containing all components without reverse transcriptase did not give any amplification product.

Study of SmSP1 protein in S.mansoni

Fig. 5A shows SDS PAGE of recombinant protein (rSmSP1) expressed in *E.coli*, that migrates at about 21kDa (lane 3). The recombinant protein was extremely pure and was used for production of antisera. The specificity of rat antiserum raised against purified recombinant protein was tested by Western blotting (Fig. 5B) which showed that the serum recognized the recombinant protein. In order to check whether the mRNA is in fact translated, we immunoprecipitated soluble antigens obtained from adult worms labelled with ³⁵S Met. Results presented in Fig. 6 showed that the antiserum directed against rSmSP1 specifically precipitated an antigen at about 30kDa. This result was further confirmed by western blotting (data not shown).

Immunoreactivity of porcine kallikrein with rat sera directed against rSmSP1 protein

Due to the identity of amino acid sequences between the SmSP1 protein and kallikrein, we tested whether this similarity could be reflected in cross-immunoreactivity. To address this question, we performed Western blotting on kallikrein purified from porcine pancreas with the rat antiserum directed against the rSmSP1 protein. Results presented in Fig. 7 showed that the purified kallikrein is recognized by antibodies directed against the rSmSP1, suggesting that this protein could induce cross-reactive antibodies. The obtention of two bands might be explained either by a degradation product of the porcine kallikrein or/and by the presence of the proenzyme (higher band) and the active enzyme (lower band) which lost the propeptide. However when this antiserum was tested against the recombinant elastase of *S.mansoni*, another serine protease, results did not show a positive signal (data not shown) suggesting that antibodies induced by rSmSP1 are specific of kallikrein protease.

DISCUSSION

Through the evolution of the host-parasite relation in schistosomiasis, the parasite has developed a variety of proteolytic enzymes (McKerrow *et al.* 1988) to assist in different aspects of its invasion, metabolism and exit from its host. Thus several serine proteases have been described; among them, the elastinolytic (30 kDa) preacetabular gland secretions of cercaria, soluble proteins (28 and 60kDa) released from transforming schistosomula, two proteins in SRP (27,5 and 29kDa) which are involved in the enhancement of IgE Fc receptor expression (Verwaerde *et al.* 1988), and a membrane anchored protease (28kDa) on schistosomula (Ghendler *et al.* 1996). In addition several cysteine proteases have been previously described in extracts of adult worms, in eggs and in miracidia (Dalton *et al.* 1995; Sung & Dresden, 1986; Pino-Heiss, Brown & McKerrow, 1985).

In the present paper, we describe the isolation and characterization of a novel *S. mansoni* serine protease with a partial cDNA sequence which encodes a 17kDa polypeptide. The deduced amino acid sequence shows a significant identity with the vampire bat tissue plasminogen activator, the human protein C precursor but the greatest overall similarity was to the mouse plasma kallikrein. In general, kallikrein is involved in a wide variety of essential physiological functions, among which are the processing of bioactive peptides, blood coagulation and the enhancement of glycosylation of IgE binding factors (Iwata, Munoz & Ishizaka, 1983). The role of the protein encoded by SmSP1 in the cellular function of *S. mansoni* and its location are unknown. Analysis of the amino acid sequence revealed the presence of the catalytic triad site (H, D and S) surrounded by conserved amino acids. The molecular cloning and sequencing of the gene encoding *S. mansoni* elastase showed the presence of at least two genes, one of them EL1 presented the catalytic triad site

(H,D,S). However the second gene (EL2) appears not to encode an active enzyme due to the absence of the aspartic acid (D) residue (Pierrot, Capron & Khalife, 1995). It was proposed by Brenner (1988) that there are two subclasses of serine protease; one contains a TCN codon where N=A, T, C or G and the other containing an AGY codon where Y= C or T for the active site serine protease amino acid. Sequence data showed that both the elastase (EL1) and the SmSP1 genes encoded two serine proteases of *S.mansoni* use the AGY codon where Y= T to code for the active site serine residue.

At the nucleotide sequence level, the alignment of SmSP1 with the EL1 sequence and other serine proteases revealed the absence of an intron in the SmSP1 sequence. However, comparisons between different serine proteases often revealed that the intron-exon junctions are conserved even when intron sizes are different. These data suggest that the gene fragment described here encodes a kallikrein-like serine protease that is structurally and may be functionally different from *S. mansoni* elastase. Moreover, Southern blot analysis with *S. mansoni* DNA digested with different restriction enzymes showed a single hybridizing fragment (data not shown) suggesting the presence of a single SmSP1 copy in this haploid genome which is not the case for mammalian species. Indeed, the analysis of mouse kallikrein genes led to the identification of a multigene family (Evans, Drinkwater & Richards, 1987), among which 14 genes are potentially able to encode functional proteins and 10 are pseudogenes. In humans, there are only 3 genes and in the rat 13 genes (McDonald, Margolius & Ergos, 1988; Muray et al. 1990). As would be expected, some schistosomes genes show developmental regulation of expression, while others do not. In the case of *S.mansoni* elastase, we showed that cercariae and schistosomula produce more elastase than do other life cycle stages (Pierrot et al. 1996). Concerning the SmSP1 gene expression, we were

unable to detect the corresponding mRNA by Northern blot (data not shown). However, we showed by RT-PCR that the mRNA was present at both cercarial and adult worm stages. Taken together, these results led us to check whether the native protein corresponding to the SmSP1 gene could be detected using metabolically radiolabelled adult worms in the presence of ^{35}S -Met. The results of immunoprecipitation experiments performed on soluble extracts using rat serum directed against the recombinant protein of SmSP1 gene showed the presence of a single band at about 30kDa, the expected size of serine proteases. These results suggest that the adult mRNA is in fact translated. We further confirmed these results by Western blotting using total antigen extracts from adult worms. This was not the case for *S. mansoni* elastase. Indeed, the elastase mRNA was found in the adult worms but not its protein product. These data are in favour of a stage specific expression of serine proteases in *S. mansoni* which may be related to different physiological functions.

Sequence analysis has shown that *S. mansoni* SmSP1 is more closely related to mammalian serine protease and particularly to kallikrein. The significance of these similarities and a possible immunological cross-reactivity with known kallikrein was examined using the rat antiserum directed to the recombinant protein of SmSP1 gene. The outcome of the Western blot experiments showed the reactivity with the kallikrein from porcine pancreas confirming that we isolated a partial cDNA that encodes part of a kallikrein-like molecule in *S. mansoni*.

Currently, with the rat antiserum directed against the kallikrein-like protein and with the partial cDNA probe, we intend to isolate the full length clone from a schistosome cDNA library. By producing the recombinant protein, we will be able to elucidate its function and the role of this serine protease in host-parasite interactions.

REFERENCES

- AURIAULT, C., OUASSI, M.A., TORPIER, G., EISEN, H. & CAPRON, A. (1981) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunology* **3**, 33-44.
- BRENNER, S. (1988) The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* **334**, 528-530.
- CHAPPELL, C.L. & DRESDEN, M.H. (1987) Purification of cysteine proteinases from adult *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **256**, 560-568.
- CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., McDONALD, J. & RUTTER, W.J. (1978) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.
- DALTON, J.P., SMITH, A.M., CLOUGH, K.A. & BRINDLEY, P.J. (1995) Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on. *Parasitology Today* **11**, 299-303.
- EVANS, B.A., DRINKWATER, C.C. & RICHARDS, R.I. (1987) Mouse glandular Kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 8027-8034.
- GHENDLER, Y., PARIZADE, M., ARNON, R., MCKERROW, J.H. & FISHELSON, Z. (1996) *Schistosoma mansoni*: Evidence for a 28kDa membrane-anchored protease on schistosomula. *Experimental Parasitology* **83**, 73-82 .

IWATA, M., MUNOZ, J.J. & K. ISHIZAKA. (1983) Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor. IV Identification of glycosylation-enhancing factor as a kallikrein-like. *Journal of Immunology* 131, 1954-1960.

LANSPERGER, W.J., STIREWALT, M.A. & DRESDEN, M.H. (1982) Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochemical Journal* 201, 137-144.

LINDQUIST, R.N., SENFT, W., PETTIT, M. & MCKERROW, J. (1986) *Schistosoma mansoni*: Purification and characterization of the major acidic proteinase from adult worms. *Experimental Parasitology* 61, 398-404.

Mc DONALD, R.J., MARGOLIUS, H.S. & ERDOS, E.G. (1988) Molecular biology of tissue kallikrein. *Biochemical Journal* 253, 313-321.

MCKERROW, J.H., KEENE, W.E., JEONG, K.H. & WERB, Z. (1983) Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*: I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Laboratory Investigations* 49, 195-200.

MCKERROW, J.H. & DOENHOFF, M.J. (1988) Schistosome proteases. *Parasitology Today* 4, 334-340.

- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1988) Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* **141**, 273-278.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1990) *Schistosoma mansoni*: localization of the 28kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunology* **12**, 398-401.
- MURAY, S.R., CHAO, J., LIN, F.K. & CHAO, L. (1990) Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **15** (Suppl.) S7-S16.
- NEWPORT, G.R., McKERROW, J.H., HEDSTROM, R., PETITT, M., McGARRIGLE, L., BARR, P.J. & AGABIAN, N. (1988) Cloning of the proteinase that facilitates infection by schistosome parasites. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 13179-13184.
- PIERROT, C., CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1995) Cloning and characterization of two genes encoding *Schistosoma mansoni* elastase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 113-117.
- PIERROT, C., GODIN, C., LIU, J.L., CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1996) *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle. *Parasitology* **113**, 519-526.
- PINO-HEISS, S., BROWN, M. & McKERROW, J.H. (1985) *Schistosoma mansoni*: Degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia. *Experimental Parasitology* **59**, 217-222.

SAKANARI, J.A., STAUTON, C.E., EAKIN, A.E., CRAIK, C.S. & McKERROW, J.H. (1989) Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **86**, 4863-4867.

SAMBROOK, J. FRITSH, E.F. & MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory.

SENFT, A.W., GOLDBERG, M.W. & BYRAM, J.E. (1981) Haemoglobinolytic activity of serum in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **30**, 96-101.

SUNG, C.K. & DRESDEN, M.H. (1986) Cysteinyll proteinases of eggs: Purification and partial characterization. *Journal of Parasitology* **72**, 891-900.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels onto nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350-4353.

VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAF, E. & ROSS, G.T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *Journal of Clinical Endocrinology* **33**, 988-991.

VERWAERDE, C., JOSEPH, M., CAPRON, M., PIERCE, R.J., DAMONNEVILLE, M., VELGE, F., AURIAULT, C. & CAPRON, A. (1986) Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **138**, 4441-4446.

VERWAERDE, C., AURIAULT, C., NEYRINCK, J.L. & CAPRON, A. (1988)
Properties of serine proteases of *Schistosoma mansoni* schistosomula
involved in the regulation of IgE synthesis. *Scandinavian Journal of
Immunology* 27, 17-24.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: PCR on genomic DNA with degenerate primers based upon consensus sequences of the active site of serine proteases. Lane 1: λ digested by *Hind* III- *Eco*R I (Appligen), lane 2: primer 1 & 2, lane 3: primer 1 alone, lane 4: primer 2 alone, lane 5: primers without DNA.

Figure 2: Nucleotide and amino acid sequences from SmSP1. H, D and S which constitute the catalytic site are bolded. Sequences predicted by degenerate primers and confirmed by two genomic sequences are underlined with broken lines.

Figure 3: Alignment of the amino acids sequences encoding for the *S.mansoni* (SmSP1) protein with the mouse plasmatic kallikrein (A), vampire bat tissue plasminogen activator (B) and human protein C (C). The Histidine (H), aspartic acid (D) and serine (S), which constitute the catalytic site are bolded. *MpKLK*, mouse plasmatic kallikrein; from 428 to 582 aa. *VbtPa*, Vampire bat tissue plasminogen activator; from aa 269 to 324, *HuPC*, human protein C; from aa 246 to 301.

Figure 4: Agarose gel analysis of RT-PCR products after amplification with specific primers based upon the SmSP1 fragment of RNA extracted from cercariae (lanes 2-4) and adult worms (lanes 6-8). In each case, PCR was performed with 5' and 3' primers (lanes 2, 5), with the 5' primer (lanes 3, 6) and with the 3' primer (lanes 4, 7). Lane 8: PCR control with no template, lane 1: 100 bp DNA ladder (Pharmacia).

Figure 5: A: SDS-PAGE analysis of recombinant SmSP1 protein. Lane 1, whole extracts of non induced bacterial culture; lane 2, whole extracts of induced bacterial culture; lane 3, recombinant protein after Ni column purification. B: Western blotting of purified recombinant protein with normal rat serum (1:500) (lane 2) and rat antiserum directed against the rSmSP1 protein (1:500) (lane 3). Lane 1. Molecular weights (GIBCO),

Figure 6: Immunoprecipitation of adult worm antigens labelled with ^{35}S by normal serum (lane 1) and rat antiserum directed against the rSmSP1 (lane 2). Soluble extracts of labelled antigens were incubated with 20 μl of total serum. Immune complexes were adsorbed on protein G and were analyzed by SDS-PAGE.

Figure 7: Immunoblot analysis of rat antiserum anti rSmSP1 protein against native Kallikrein purified from porcine pancreas. Native kallikrein were subjected to SDS-PAGE. After transfer onto a nitrocellulose filter, membrane strips were incubated with control serum (lane 1), or with rat antiserum anti-rSmSP1 (lane 2). Rat antibodies were probed with a goat anti-rat IgG conjugated with horse-radish peroxylase.

Acknowledgments: This work was supported by the Unité INSERM U167 and by the MESR ACCSV n°7. We are grateful to Dr. R.J. Pierce for helpful discussions, to J.P. Kusnierz for synthesizing oligonucleotides. We acknowledge the support of Volvic S.A. for maintenance of the schistosome life-cycle. C.C. is a doctoral fellow of the Institut Pasteur de Lille.

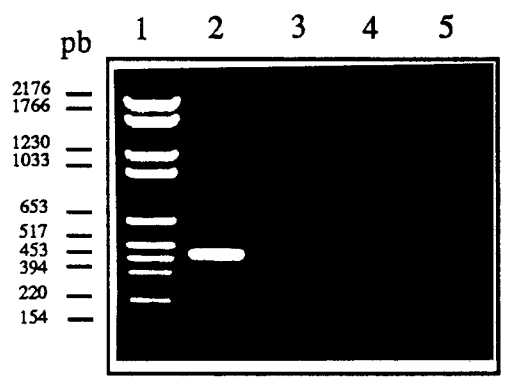


Figure 1

<u>TGGGTAATGACAGCTGCACACTGTATTCAACCAATGCCAGATCCAAAGCGATGGTTTGTA</u>	60
W V M T A A H C I Q P M P D P K R W F V	
GACGTTGGAAGATACTATAGAACTTTGGTGGTCCTGAAGTTCAAAGAATAAACTTTCA	120
D V G R Y Y R N F G G P E V Q R I K L S	
CAAATTGTTATACACCCATCTTACAATAAAAAAATTTACGCCAATGACATAGCACTGTTA	180
Q I V I H P S Y N K K I Y A N D I A L L	
CGTCTACAAACTCCAGCTAATTTAGATAATCGTCAGGTACGACTTTCTCCAGTTCCACGT	240
R L Q T P A N L D N R Q V R L S P V P R	
AATCCTCATTTATCCGATTTATTAACAGATAATGTTTCAGTGCATGGTCGCTGGTTGGGGA	300
N P H L S D L L T D N V Q C M V A G W G	
GATACACATAATACAGGTTCAAATGATGTTCTAAGACAAGCAGTTCTTCCTGTCATTAAT	360
D T H N T G S N D V L R Q A V L P V I N	
TATGATCTTTGCAAATCATGGTATCAATATCTTAATAAAGCAAGCTTTTGTGCTGGATAC	420
Y D L C K S W Y Q Y L N K A S F C A G Y	
AAACAACGAGGAATTGATGCTTGCCAAGGTGATAGTGGGGGTCCTCT	467
K Q R G I D A C Q G D S G G P L	

Figure 2

A

<i>SmSP1</i>	WTAAHCIQPMPPDKRWFVDVGRYYRNEGGPEVQRIKLSQIVIHPSYNKKIYANDIALLRQLTP :TAAHC:::P P W : G : E ::::IH Y: DIAL::LQTP	64
<i>MpKLK</i>	VTAAHCFDGIPIYPDVWRIYGGILSLSEITKETPSSRIKELIIHQEYKVSEGNYDIALIKLQTP	492
<i>SmSP1</i>	ANLDNRQVRLSPVPRNPHLSDLLTDNVQCMVAGWGDTHNTG-SNDVLRQAVLPVINYDLCKSW N : Q ... :P::::: T :C V:GWG T.: G ::::L::A.:P::: C:.	125
<i>MpKLK</i>	LNYTEFQKPIC-LPSKADTNTIYT---NCWVTGWGYTKEQGETQNILQKATIPLPNNEECQKK	551
<i>SmSP1</i>	YRDYVINKQMICAGYKEGGTDACKGDSGGPL	582
	Y :Y: NK. :CAGYK: G.DAC:GDSGGPL	
<i>MpKLK</i>	Y-QYL-NKASFCAGYKQRGIDACQGDSSGGPL	155

B

<i>SmSP1</i>	TAAHCIQPMPPDKRWFVDVGRYYRNEGGPEVQRIKLSQIVIHPSYNKKIYANDIALLRQLTP TAAHC:Q P:: V :GR YR G E Q : : : :IH :: Y NDIALLRQLTP	60
<i>VbtPa</i>	TAAHCFQERYPPQHRLRVVLGRTYRVKPGKEEQTFEVEKCIIEEFDDDTYNNDIALLRQLTP	324

C

<i>SmSP1</i>	HPSYNKKIYANDIALLRQLTPANLDNRQVRLSPVPRNPHLSDLLTDNVQCMVAGWG HP:Y:Y NDIALLRQLTPAL : V : :L : :v:GWG	98
<i>HuPC</i>	HPNYSKSTTDNDIALLRQLTPATLSQTIVPICLPDSGLAERELNQAGQETLVTGWG	301

Figure 3

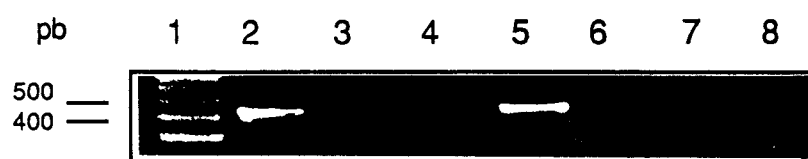
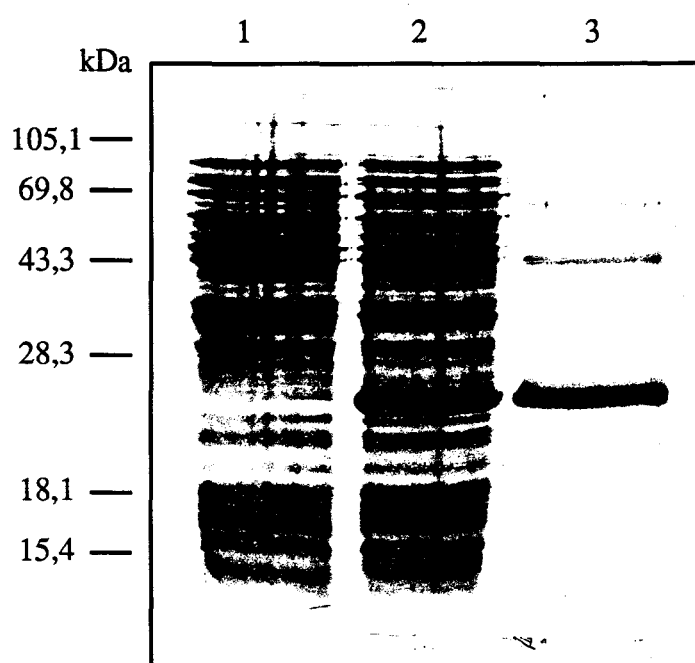


Figure 4

A



B

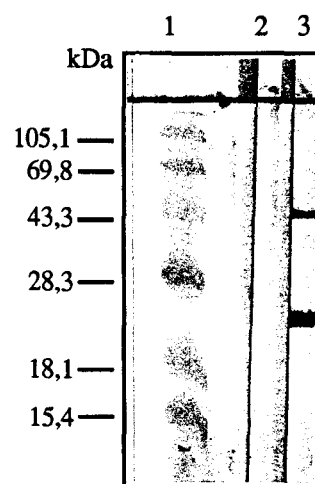


Figure 5

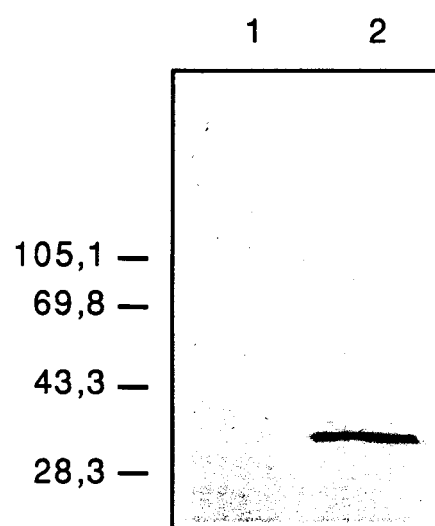


Figure 6

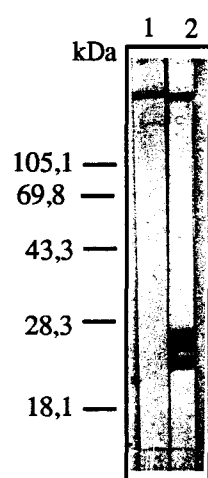


Figure 7

Table des Matières

Listes des Figures et Tableaux

Résumé	10
Abréviations	11
INTRODUCTION-GENERALITES	12
LA SCHISTOSOMIASSE OU BILHARZIOSE	13
1. LE PARASITE.....	14
1.1. GENERALITES.....	14
1.2. CYCLE	15
1.3. BIOLOGIE	17
1.3.1. <i>Caractères originaux des schistosomes</i>	17
1.3.2. <i>Génétique du schistosome</i>	18
1.3.3. <i>Antigènes du schistosome</i>	20
1.3.3.1. Epitopes carbohydrates.....	20
1.3.3.2. Enzymes	21
1.3.3.3. Protéines de structure.....	22
1.3.3.4. Protéines de choc thermique.....	22
2. REGIONS ENDEMIQUES ET PATHOLOGIES.....	23
2.1. REPARTITION GEOGRAPHIQUE	23
2.2. PATHOLOGIES ASSOCIEES AUX BILHARZIOSES	25
3. LUTTE CONTRE LES SCHISTOSOMIASSES.....	28
3.1. PROPHYLAXIE SANITAIRE	28
3.2. LUTTE ANTI-VECTORIELLE.....	28
3.2.1. <i>Utilisation de molluscicides</i>	29
3.2.2. <i>Réalisation de grands travaux</i>	29
3.2.3. <i>Procédés biologiques: les prédateurs et les compétiteurs</i>	29
3.3. PROPHYLAXIE MEDICALE.....	30
3.3.1. <i>Chimiothérapie</i>	30
3.3.2. <i>Stratégie vaccinale</i>	32
4. REPOSE IMMUNE DEVELOPPEE AU COURS D'UNE INFECTION	
A S. MANSONI.....	36
4.1. LA REPOSE ANTICORPS ET LES PHENOMENES D'ADCC: LES MECANISMES EFFECTEURS CHEZ LE RAT ET CHEZ L'HOMME.....	36
4.2. L'IMMUNITE PROTECTRICE CHEZ LA SOURIS.....	39
4.3. STRATEGIES D'ECHAPPEMENT A LA REPOSE IMMUNE DEVELOPPEES PAR LE PARASITE	40
LES PROTEASES.....	43
1. DEFINITION ET CLASSIFICATION DES PROTEASES.....	44
1.1. HISTOIRE ET DEFINITION.....	44
1.2. LES EXO- ET ENDOPROTEASES.....	45
1.2.1. <i>Les exoprotéases</i>	45
1.2.2. <i>Les endoprotéases</i>	45
1.3. LES SERINE PROTEASES	46

1.4. LES ELASTASES	47
2. ROLES DES PROTEASES.....	50
2.1. FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES.....	50
2.1.1. <i>Processus physiologiques impliquant des protéases.....</i>	<i>50</i>
2.1.2. <i>Régulation et dérégulation des fonctions physiologiques des protéases.....</i>	<i>52</i>
2.2. ROLE DES PROTEASES DANS LES PHENOMENES D'INVASION ET DE MIGRATION - IMPLICATION DANS LA VIRULENCE.....	54
2.2.1. <i>Invasion et migration des microorganismes.....</i>	<i>54</i>
2.2.2. <i>Les protéases: facteurs de virulence?</i>	<i>55</i>
2.3. PROTEASES ET REPONSES IMMUNE ET INFLAMMATOIRE	57
2.3.1. <i>Les protéases: composantes de la réponse immunitaire.....</i>	<i>57</i>
2.3.2. <i>Les protéases: rôle dans l'échappement des microorganismes à la réponse immune.....</i>	<i>59</i>
2.4. LES PROTEASES CHEZ LES PARASITES.....	60
3. LES PROTEASES CHEZ SCHISTOSOMA MANSONI.....	63
3.1. PROTEASES DECRITES CHEZ SCHISTOSOMA MANSONI.....	63
3.1.1. <i>Invasion et migration des larves.....</i>	<i>63</i>
3.1.2. <i>Métabolisme et survie des vers chez l'hôte définitif.....</i>	<i>66</i>
3.1.3. <i>Extravasation, excrétion et éclosion des oeufs.....</i>	<i>68</i>
3.1.4. <i>Expression des protéases de S. mansoni au cours du développement.....</i>	<i>69</i>
3.1.5. <i>Immunogénicité des protéases de S. mansoni</i>	<i>70</i>
3.2. REGULATION DE LA REPONSE DE L'HOTE PAR LES PROTEASES DE S. MANSONI.....	72
3.2.1. <i>Rôles des protéases bénéfiques pour le parasite</i>	<i>72</i>
3.2.2. <i>Rôles des protéases néfastes pour le parasite.....</i>	<i>73</i>
CADRE ET OBJECTIFS.....	75
MATERIELS ET METHODES	79
1. MATERIELS.....	80
1.1. PARASITES.....	80
1.2. SOUCHES BACTERIENNES ET CELLULAIRES.....	80
1.3. VECTEURS.....	81
1.3.1. <i>Vecteurs phagiques.....</i>	<i>81</i>
1.3.2. <i>Vecteurs d'expression</i>	<i>81</i>
1.3.3. <i>Vecteurs utilisés pour le sous-clonage des fragments à séquencer.....</i>	<i>82</i>
1.4. ANIMAUX.....	82
1.5. TAMPONS, SOLUTIONS ET MILIEUX	82
2. METHODES.....	83
2.1. REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'ELASTASE DE S. MANSONI	83
2.1.1. <i>Expression de l'élastase recombinante.....</i>	<i>83</i>
2.1.1.1. RT-PCR	83
2.1.1.2. Clonage en vecteur d'expression.....	83
2.1.1.3. Traduction in vitro.....	84
2.1.1.4. Production et purification de la protéine recombinante.....	84
2.1.1.5. Détermination de l'activité enzymatique de la protéine recombinante.....	84
2.1.1.5.1. Caséine.....	85
2.1.1.5.2. Azocoll.....	85
2.1.2. <i>Production du sérum α-élastase</i>	<i>85</i>
2.1.3. <i>Etude de la régulation de l'expression de l'élastase au cours du développement</i>	<i>85</i>

2.1.3.1. Au niveau de l'ARN	85
2.1.3.1.1. Extraction de l'ARN aux différents stades.....	85
2.1.3.1.2. RT-PCR.....	86
2.1.3.1.3. RT-PCR semi-quantitative.....	86
2.1.3.2. Au niveau protéique.....	86
2.1.3.2.1. Préparations antigéniques	86
2.1.3.2.2. Western blot.....	87
2.1.3.2.3. Test ELISA en immunocapture	87
2.1.4. Immunolocalisation	87
2.2. ETUDE DU GENE DE L'ELASTASE.....	88
2.2.1. Isolation d'un clone génomique	88
2.2.1.1. Criblage de la banque λ EMBL3	88
2.2.1.1.1. Préparation des cellules P2392 compétentes.....	88
2.2.1.1.2. Criblage.....	88
2.2.1.2. Préparation de l'ADN phagique.....	89
2.2.1.3. Southern blot et marquage non radioactif.....	89
2.2.2. Séquençage	90
2.2.3. Etude de l'ADN génomique.....	91
2.2.3.1. Préparation de l'ADN génomique de <i>S. mansoni</i>	91
2.2.3.2. Southern blot et marquage radioactif au ^{32}P	92
2.2.3.2.1. Marquage de la sonde au ^{32}P	92
2.2.3.2.2. Hybridation des membranes.....	92
2.2.3.3. PCR.....	92
2.3. L'ELASTASE DE <i>S. MANSONI</i> : CIBLE ET/OU IMMUNO-MODULATEUR.....	93
2.3.1. Etude de l'élastase en tant que cible du système immunitaire	93
2.3.1.1. Cytotoxicité macrophage-dépendante	93
2.3.1.2. Analyse du profil isotypique des sérums de rats α -élastase par ELISA	93
2.3.1.3. Etude de la protection conférée par transfert passif d'IgG α -élastase.....	94
2.3.1.3.1. Purification des IgG.....	94
2.3.1.3.2. Transfert passif.....	94
2.3.1.3.3. Infestation expérimentale et perfusion.....	94
2.3.1.4. Vaccination génique.....	94
2.3.1.4.1. Construction des plasmides recombinants	94
2.3.1.4.2. Expression de l'élastase en cellules Cos-1.....	95
2.3.1.4.3. Immunisations par ADN nu.....	96
2.3.2. Etude des propriétés immuno-modulatrices de l'élastase chez le rat Fischer	96
2.3.2.1. Protocoles animaux.....	96
2.3.2.2. Prélèvements biologiques.....	97
2.3.2.3. Extraction de l'ARN.....	97
2.3.2.4. RT-PCR et Southern blot.....	97

RESULTATS.....100

1. REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'ELASTASE DE *S. MANSONI*.....101

1.1. EXPRESSION DE L'ELASTASE RECOMBINANTE	101
1.1.1. Obtention de l'ADNc de l'élastase	101
1.1.2. Transcription-Traduction <i>in vitro</i>	102
1.1.3. Production et purification de l'élastase recombinante.....	102
1.1.4. Dosage de l'activité enzymatique de l'élastase recombinante.....	104
1.1.5. Immunogénicité de l'élastase recombinante	104
1.2. ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'ELASTASE AU COURS DU DEVELOPPEMENT	105
1.2.1. Au niveau de l'ARN.....	105
1.2.2. Au niveau protéique	107
1.2.3. Immunolocalisation	108

2. ETUDE DU GENE DE L'ELASTASE	110
2.1. CLONAGE ET SEQUENÇAGE DU GENE EL1	110
2.1.1. Séquence et organisation du gène	110
2.1.2. Recherche des séquences potentiellement promotrices.....	112
2.2. ETUDE DE L'ADN GENOMIQUE.....	113
2.2.1. Southern blot.....	114
2.2.2. PCR sur l'ADN génomique de <i>S. mansoni</i>	115
2.3. ETUDE DU GENE EL2	116
2.3.1. Séquence et organisation	116
2.3.2. Comparaison EL1/EL2.....	118
3. L'ELASTASE DE <i>S. MANSONI</i>: CIBLE ET/OU IMMUNO-MODULATEUR.....	119
3.1. ETUDE DE L'ELASTASE EN TANT QUE CIBLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	119
3.1.1. Cytotoxicité macrophage dépendante.....	119
3.1.2. Analyse du profil isotypique des sérums de rats.....	121
3.1.3. Etude de la protection conférée par transfert passif d'IgG α -élastase	122
3.1.4. Vaccination génique	123
3.1.4.1. Expression de l'élastase recombinante en cellules Cos.....	123
3.1.4.2. Analyse de la réponse sérique après immunisation de souris Balb/c par ADN nu.....	125
3.2. ETUDE DES PROPRIETES IMMUNO-MODULATRICES DE L'ELASTASE CHEZ LE RAT FISCHER.....	125
3.2.1. Analyse du profil de cytokines après administration d'antigène de cercaire en présence ou non d'inhibiteurs de protéases.....	126
3.2.2. Analyse du profil de cytokines après administration de SRP ou élastase de porc	127
 DISCUSSION - PERSPECTIVES.....	 129
1. REGULATION DE L'EXPRESSION DE L'ELASTASE DE <i>S. MANSONI</i>	131
2. ETUDE DU GENE DE L'ELASTASE DE <i>S. MANSONI</i>	136
3. L'ELASTASE DE <i>S. MANSONI</i> : CIBLE ET/OU IMMUNOMODULATEUR?.....	139
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 145
ANNEXES.....	175
TAMPONS ET MILIEUX	176
ARTICLE 1.....	177
ARTICLE 2.....	183
ARTICLE 3.....	192
 Table des Matières	 222
Liste des Figures et Tableaux.....	227

Liste des Figures

Introduction - Généralités

Figure 1:	Cycle de vie de <i>Schistosoma mansoni</i>	16
Figure 2:	Répartition géographique des bilharzioses	24
Figure 3:	Réactions en chaîne catalysées par les sérine protéases.....	47
Figure 4:	Illustration des glandes acétabulaires de la cercaire de <i>Schistosoma mansoni</i>	64
Figure 5:	Expression des protéases de <i>S. mansoni</i> au cours du développement	70

Matériels et Méthodes

Figure 6:	Position des oligonucléotides synthétiques utilisés pour le séquençage des gènes EL1 et EL2 de l'élastase de <i>S. mansoni</i>	91
------------------	--	----

Résultats

Figure 7:	Séquence du produit de la RT-PCR réalisée à l'aide des oligonucléotides synthétiques spécifiques de l'élastase de <i>S. mansoni</i>	101
Figure 8:	Analyse en SDS-PAGE du produit de transcription-traduction <i>in vitro</i>	102
Figure 9:	Analyse sur SDS-PAGE de l'expression de l'élastase recombinante en vecteur pQE 30.....	104
Figure 10:	Analyse en western blot du sérum de lapin α -élastase recombinante	105
Figure 11:	Analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR menées sur l'ARN total des différents stades de <i>S. mansoni</i>	106
Figure 12:	Analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR semi quantitative menée sur l'ARN total de cercaires et vers adultes	106
Figure 13:	Analyse en western blot de l'expression de l'élastase native au cours du cycle de <i>S. mansoni</i>	107
Figure 14:	Analyse en ELISA immunocapture de l'expression de l'élastase native au cours du cycle de <i>S. mansoni</i>	108
Figure 15:	Immunolocalisation de l'élastase de <i>S. mansoni</i> chez la cercaire envahissant la peau de l'hôte	109

Figure 16: Organisation du gène EL1 de l'élastase de <i>S. mansoni</i>	110
Figure 17: Séquence nucléotidique du gène EL1 de l'élastase de <i>S. mansoni</i>	111
Figure 18: Carte du gène EL1 de l'élastase de <i>S. mansoni</i> et position des éléments pouvant intervenir dans la régulation de l'expression du gène	113
Figure 19: Southern blot sur ADN génomique de <i>S. mansoni</i>	114
Figure 20: PCR sur ADN génomique de <i>S. mansoni</i>	115
Figure 21: Organisation du gène EL2 de l'élastase de <i>S. mansoni</i>	116
Figure 22: Séquence nucléique du gène EL2 de l'élastase de <i>S. mansoni</i>	117
Figure 23: Alignement des séquences d'acides aminés déduites de EL1 et EL2.....	118
Figure 24: Analyse en western blot de l'immunoréactivité des sérums de rats α -élastase ...	120
Figure 25: Cytotoxicité macrophage dépendante	121
Figure 26: Analyse par ELISA du profil isotypique des sérums de rats α -élastase.....	122
Figure 27: Effet du transfert passif des IgG α -élastase à des rats sur le nombre de vers 21 jours après infestation par 1000 cercaires de <i>S. mansoni</i>	123
Figure 28: Analyse en western blot de la production de l'élastase en cellules Cos-1.....	124
Figure 29: Analyse en immunofluorescence de la production de l'élastase en cellules Cos-1.....	125
Figure 30: Analyse du profil de cytokines (IL-4 et IFN- γ) après administration d'antigène de cercaire en présence ou non d'inhibiteurs de protéases.....	126
Figure 31: Analyse du profil de cytokines (IL-2, IL-5 et IL-10) après administration de SRP ou élastase de porc	127

Discussion - Perspectives

Figure 32: Modèle de sécrétion de l'élastase de <i>P. aeruginosa</i>	133
---	------------

Liste des Tableaux

Introduction - Généralités

TABLEAU I:	Espèces de schistosomes infectant l'homme	14
TABLEAU II:	Quelques gènes de schistosome pour lesquels des sites potentiellement régulateurs ont été décrits.....	20
TABLEAU III:	Antigènes de <i>Schistosoma mansoni</i> à potentiel vaccinal	33
TABLEAU IV:	Quelques membres de la super famille des serpins et leurs fonctions...	52
TABLEAU V:	Rôles suggérés des protéases de bactéries dans l'augmentation de la virulence	55
TABLEAU VI:	Fonctions effectrices des sérine protéases granulaires	58
TABLEAU VII:	Protéases décrites chez <i>Schistosoma mansoni</i>	65

Matériels et Méthodes

TABLEAU VIII:	Caractéristiques des vecteurs d'expression utilisés afin de produire l'élastase recombinante.....	81
TABLEAU IX:	Séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés pour le séquençage des gènes de l'élastase de <i>S. mansoni</i>	90
TABLEAU X:	Séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés pour détecter les différentes cytokines ainsi que la β -actine dans l'expérience 1.....	98
TABLEAU XI:	Séquence des oligonucléotides synthétiques utilisés pour détecter les différentes cytokines ainsi que la β -actine dans l'expérience 2.....	98
TABLEAU XII:	Séquence des sondes utilisées pour l'hybridation des RT-PCR réalisées dans l'expérience 1	99

Résultats

TABLEAU XIII:	Clonage et expression de l'élastase de <i>S. mansoni</i> en <i>E. coli</i>	103
TABLEAU XIV:	Sites consensus d'éléments régulateurs présents dans la région 5' du gène EL1 de l'élastase de <i>S. mansoni</i>	112

