143 397

50376
1997
447

N° d'ordre :

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

présentée à l'université de Lille I pour l'obtention du titre
de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
par

VINCA LARDANS

UNIVERSITÉ DES SC ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE

APPROCHE DE LA TRANSFORMATION GENETIQUE DU GASTEROPODE *BIOMPHALARIA GLABRATA*, HOTE INTERMEDIAIRE DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Soutenue le 4 Juillet 1997 devant la commission d'examen :

Président du Jury : Pr. André Dhainaut
Rapporteurs : Dr. Wil van der Knaap
Pr. Jean-Claude Prudhomme
Dr. Eric Mialhe
Examinateurs : Dr. Bernard Hoflack
Dr. Colette Dissous
Pr. André Capron

Je dédie ce travail à :

Lucie et Caroline, mes deux rayons de soleil.

Nuit Blanche

Orage, orne dans le noir
Arbres, monts et manoirs.
Vus dans le ciel à découdre
Grands vents, pluies et foudres.
Les cieux semblent s'ouvrir
Pour vous faire souffrir.
Ils rongent vos prunelles
de livides Mortels.

Les volcans tout-puissants
Et les grands tremblements
Sévissent et vous effraient.
La Nature se rit de vous
Qui en faites un égout.
Que Diable ! Réagissez !
Montrez que vous l'aimez !

Les eaux sont asphyxiées.
On découpe les forêts.
On noircit les marées.
On expose les déchets.
On aura tout détruit
Pour rester seuls en vie.

Préservez l'Antarctique ?
C'est déjà utopique.
Garder la Tasmanie
Comme dernier paradis
pour que nos fils repèrent
Comme était la Terre.

Stéphane Magron

On ne manipule pas une marionnette avec un seul fil.

Le fouet Zensunni

Ce travail a été effectué :

dans l'unité INSERM 167 de l'Institut Pasteur de Lille, directeur Pr. A. Capron et plus particulièrement dans le laboratoire « Bases Moléculaires de la Relation Hôte-Parasite » dirigé par le Dr. Colette Dissous.

Il a fait l'objet de stages dans les laboratoires suivants :

Laboratoire de Défense et Résistance chez les Invertébrés Marins (DRIM), UMR-CNRS-IFREMER, Université de Montpellier II, dirigé par le Dr. Philippe Roch (du 20/08 au 30/10/1995)

Center for Agricultural Biotechnology (CAB), University of Maryland Biotechnology Institute, College Park MD, USA, dirigé par le Dr. David O'Brochta (du 16/07 au 6/08/1995)

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire (CGMC), UMR 5534-CNRS Université Claude Bernard de Lyon I, dirigé par les Dr. Pierre Couble et Pr. Jean-Claude Prudhomme (du 3/10 au 23/12/1996)

J'adresse mes remerciements à :

- Monsieur le Professeur André Capron de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Vous m'avez encouragée et permis de développer les collaborations nécessaires pour ce sujet de transgénose qui n'était pas facile. Que ce mémoire soit le témoignage de mon profond respect.

- Colette : tu m'as enseignée la biologie moléculaire à un tel niveau pratique et théorique que j'avais parfois l'impression d'être dans l'eppendorf, tu m'as appris à rédiger des articles et tu m'as souvent incitée à faire des communications orales et tu m'as laissée une totale liberté dans mon travail tout en me fournissant les bons conseils et en formulant les bonnes critiques scientifiques.

- Eric : c'est grâce à toi que j'ai pu développer ce sujet à Lille et tu en es d'une certaine manière le parrain et le catalyseur. Après avoir travaillé avec toi, je peux dire que tu représentes pour moi (et pour reprendre tes termes) "la référence" tant au niveau humain que scientifique, ce sera toujours un plaisir de te rencontrer ici ou là dans le monde.

- Wil : tu as accepté sans hésiter (...) de faire partie de mon jury de thèse et je t'en remercie. Je garderai un excellent souvenir des moments agréables passés ensemble au DRIM, à la PLACE et chez notre irlandais préféré.

- Jean-Claude : vous avez accepté d'être rapporteur de cette thése. Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire avec beaucoup de gentillesse et d'hospitalité. J'associe à ces remerciements Pierre qui s'est toujours montré extrêment disponible pour répondre à toutes mes questions. Je remercie aussi toutes les personnes de votre équipe pour leur accueil et leur aide et en particulier Annie, Marie-Andrée, Alain, Béné, la ch'tite Camille, Mylène et Fred, Christophe et Manu ainsi que pour les bons moments passés à Lyon et sur les pistes.

- Monsieur Bernard Hoflack : vous avez accepté d'être examinateur de ce travail. Merci pour votre accueil et vos conseils.

- Monsieur André Dhainaut : vous avez accepté de présider ce jury, veuillez trouver ici toute ma reconnaissance.

- Viviane : ça fait 6 ans que l'on se connait et c'est toujours un plaisir de te voir et de travailler avec toi. Tu m'as enseignée la culture cellulaire et la lipofection avec beaucoup de rigueur et de précision. Tu m'as toujours encouragée quand les résultats positifs se faisaient attendre. J'associe à ces remerciements Philippe qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire ainsi que toute l'équipe du DRIM pour les excellents moments passés ensemble au labo comme à l'extérieur avec une mention particulière pour Yean-Paaaaaul qui, depuis je l'espère, a retrouvé l'ouïe.

- David : tu m'as accueillie très gentillement pendant trois semaines dans ton laboratoire à College Park où nous avons travaillé d'arrache-pied avec Abhi dans une ambiance très "motivée". J'en profite pour remercier Chetan, Virna, Patrick, Elvira et Viviane pour les bonnes soirées passées à Washington.

- Karine : il y a eu tellement de bons moments passés ensemble comme la fondue au chocolat, les Pyrennées, le Gabon, les Wampas, les discussions, le sport et notre filleule et des moments difficiles où tu as toujours été au moins aussi présente et réconfortante, bref, je ne sais plus dans quelle catégorie je dois ranger les fraises. Mais il ne s'agit pas de tout ranger en partant, il s'agit de partir en se disant que l'avenir nous donnera encore pleins de souvenirs communs. Merci pour tout.

- Esteban, chère crapule, comme l'Argentine est loin, et comme je regrette déjà de ne plus chercher ma pipette partout, de ne plus entendre ton petit accent et que tu ne soies pas là pour assister à ma thèse puisque tu as toujours pris soin d'elle autant que de moi. Oui, comme je te regrette déjà.

- Pâcal, il y a évidemment une note particulière pour toi puisque tu m'as supportée (dans les trois sens du terme, je crois) tous les jours...et que ce n'était pas une mince affaire (un seul sens ici, s'il te plait). Tu as toujours pris soin de moi et apporté au laboratoire une ambiance conviviale et joyeuse, c'est vrai "je ne t'aurai échangé contre aucun autre."

- Jean-Marie qui a regroupé dans son labo « Hybridomes » des filles formidables, drôles et humaines.

- Jean-Marc pour les travaux photos et pour ton sourire, ta gentillesse et ton efficacité.

- Chantal et Jacqueline, Claudine et Maria, Monique et Suzanne, Patricia, Marie-Andrée et Danièle qui nous rendent la vie au laboratoire un peu plus facile et les gardiens qui ont bien veillé sur mon vélo.

- toutes les personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de ce manuscrit et en particulier Colette, Estelle et Fofifonfec.

- la-belle-Estelle, Fofifonfec, la chipie Monica, Sofia, Chaussette, Canine, Biquette, Rodolfo, Esteban, Marie-Kiki, Sophie nut-nut, Marina, Bertrand, Agnèèès, Zhou, Rachid et Alexia, Moumous, Wilson chéri, Odile et René, Tobias, Bilel et Delphine, Virginie, Jérome, Jean-François, Galinette, Jacquot (notre coach sportif) et les autres pour les bons moments passés au labo ou en dehors

- David Dimitri pour *Brassica napus* et *Antirrhinum majus*

- ceux qui sont loin : Gégé, Yoyo, Flotte, Ricou, la famille De Bels, Valérie, Gillou, Pierre, Houria, Dine-Dine, Kostas, Sylvie et Yannick, Philou, Chetan, Sylvain, Geneviève, Virginie, Eric, Mymy et Fred, Camille et Alain pour leur amitié et leur soutien.

- toute ma famille et particulièrement Lucie et Caroline, mes parents (les 4), ma mamie qui m'a tricotée des superbes pulls pour le Nord.

PUBLICATIONS :

S. Gendreau, **V. Lardans**, J.-P. Cadoret et E. Mialhe.« Transient expression of luciferase reporter gene after ballistic introduction into *Artemia fransciscana* (Crustacea) embryos. » Aquaculture (1995) 133 : 199-205

V. Lardans, C. Godfraind, J. T. M. van der Logt, F. W. A. Hessen, M. -D. Gonzales & J.-P. Coutelier « Polyclonal B lymphocyte activation induced by mouse hepatitis virus A59 infection. » J. Gen. Virol. (1996) 77 : 1005-1009

V. Lardans, V. Boulo, P. Duclermortier, E. Serra, E. Mialhe, A. Capron & C. Dissous « DNA transfer in a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line by DOTAP lipofection. » Parasitol. Res. (1996) 82 : 574-576

V. Lardans, V. Ringaut, J.-P. Cadoret & C. Dissous «Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Biomphalaria glabrata* actin cDNA.» DNA Sequence (in press)

V. Lardans, E. Serra & C. Dissous « Characterization of a receptor for activated protein kinase C from the mollusc*Biomphalaria glabrata*, the i,termediate host for *Schistosoma mansoni*.» soumis.

COMMUNICATIONS

Communications internationales :

V. Lardans, C. Godfraind, J. T. M. van der Logt, F. W. A. Hessen, G. Dveksler, K. V.Holmes & J. -P. Coutelier « B lymphocyte polyclonal activation after infection of 129/Sv mice with MHV A59. » Sixth symposium on Coronaviruses, Québec, Canada, 1994.

P. Duclermortier, **V. Lardans**, E. Serra, C. Dissous, M. Capron & A. Capron « Molecular basis of the interaction between *Schistosoma mansoni* and its intermediate host *Biomphalaria glabrata.* » First International Workshop on Transgenesis of Invertebrates of Medical, Agricultural and Aquacultural Importance, Montpellier, 21-26 avril 1995.

V. Lardans, V. Boulo, P. Duclermortier, E. Serra, C. Dissous, P. Roch & A. Capron «Genetic transformation of *Biomphalaria glabrata* comes out.» First International Workshop on Transgenesis of Invertebrates of Medical, Agricultural and Aquacultural Importance, Montpellier, 21-26 avril 1995.

V. Lardans, P. Duclermortier, E. Serra & C. Dissous «*Biomphalaria glabrata* : outcome of genetic transformation.» VII European Multicolloquium of Parasitology, 2-6 septembre 1996, Parme, Italie.

Communications nationales :

V. Lardans « Recherche sur la transformation génétique de *Biomphalaria glabrata*, hote intermédiaire du parasite *Schistosoma mansoni.* » Réunion du groupe Immunologie des Invertébrés, Amiens, 1994.

V. Lardans «PKCs et RACKs» Réunion du groupe Transgénèse des Invertébrés, Lyon, 1995.

V. Lardans «Transposons» Séminaire sur invitation, IFREMER, Montpellier, 1995.

V. Lardans,V. Boulo, P. Duclermortier, E. Serra, E. Mialhe, A. Capron & C. Dissous «Approche de la transformation génétique de *Biomphalaria glabrata* : application de la lipofection à la lignée cellulaire Bge.» Réunion du groupe Immunologie des Invertébrés, Montpellier, 27-29 mars 1996.

P. Duclermortier, **V. Lardans**, E. Serra, A. Capron & C. Dissous «Interactions cellulaires entre *Schistosoma mansoni* et *Biomphalaria glabrata* : étude de récepteurs hémocytaires de type lectine.» Réunion du groupe Immunologie des Invertébrés, Montpellier, 27-29 mars 1996.

V. Lardans, V. Boulo, P. Duclermortier, E. Serra, E. Mialhe, A. Capron & C. Dissous «Approche de la transformation génétique de *Biomphalaria glabrata* : application de la lipofection à la lignée cellulaire Bge.» Réunion du groupe Transgénèse des Invertébrés, Lyon, 19 avril 1996,.

V. Lardans, " Schistosomose : interactions parasite-hôte intermédiaire et lutte anti-vectorielle " Séminaire sur invitation, CNRS UMR 5534, 15 novembre 1996, Lyon.

P. Duclermortier, **V. Lardans**, E. Serra & C. Dissous " Interactions moléculaires entre le parasite *Schistosoma mansoni* et son hote intermédiaire *Biomphalaria glabrata.*", 2ème Journée des Jeunes Chercheurs, 18 novembre 1996, Institut Pasteur, Lille.

P. Duclermortier, **V. Lardans**, E. Serra & C. Dissous " Interactions moléculaires entre le parasite *Schistosoma mansoni* et son hote intermédiaire *Biomphalaria glabrata.*", Colloque Lille-ULB, Bruxelles, Belgique, 9 janvier 1997.

V. Lardans « Caractérisation d'un récepteur de *Biomphalaria glabrata* pour les PKCs activées » Séminaire interne, Institut Pasteur de Lille, 17 mars 1997.

autres communications (par posters) :

O. Boyer, E. Porchet, J. Trolet, **V. Lardans**, A. Capron & C. Dissous « Invertebrate cytokines : Identification of TNFα immunoréactive molécules in *Biomphalaria glabrata* » British Society for Parasitology, Spring Meeting, Bath, Angleterre, 1994.

J.-F. Coppin, C. Dissous, P. Duclermortier, **V. Lardans**, E. Serra, J. Trolet & K. Zemzoumi « Bases moléculaires de la relation hote-parasite et de la signalisation chez les Helminthes » Colloque Lille-ULB, Villeneuve d'Ascq, France, 1995.

P. Duclermortier, **V. Lardans**, E. Serra, J. -F. Coppin, A. Capron & C. Dissous « *Biomphalaria glabrata* : Etude des récepteurs hémocytaires de type lectine impliqués dans l'interaction avec le parasite *Schistosoma mansoni* » 1ère Journée des Jeunes Chercheurs, Lille, 1995.

V. Lardans, P. Duclermortier, E. Serra, A. Capron & C. Dissous « *Biomphalaria glabrata* : Characterization of the intracellular receptor for activated protein kinase C (RACK) » British Society for Parasitology, Spring Meeting, University of Wales, Bangor, 1-3 avril 1996.

P. Duclermortier, **V. Lardans**, E. Serra, E. Aroca & C. Dissous « Molecular studies of the interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocyte and *Schistosoma mansoni* sporocyst. » British Society for Parasitology, Spring meeting, Manchester, 7-10 avril 1997.

ABREVIATIONS 13

RESUME 14

CHAPITRE I : LA BILHARZIOSE IMPORTANCE DE L'HOTE INTERMEDIAIRE

I. LA BILHARZIOSE : GENERALITES

A. LES PARASITES 16
B. CYCLE DE VIE DU PARASITE 16
C. LOCALISATION GEOGRAPHIQUE 19
D. PATHOLOGIE 19

II. CYCLE PARASITAIRE DANS LE MOLLUSQUE 20

A. BIOLOGIE GENERALE DU MOLLUSQUE *BIOMPHALARIA GLABRATA* 20
B. SPECIFICITE MOLLUSQUE-TREMATODE 21
C. LES STADES PARASITAIRES INTRAMOLLUSQUE 23
1. LE MIRACIDIUM 23
a) L'éclosion 23
b) Le comportement du miracidium 23
(1) Recherche du biotope de l'hôte intermédiaire 23
(2) Reconnaissance de l'hôte intermédiaire par le miracidium 24
(3) Pénétration du miracidium dans le mollusque 25
2. LES SPOROCYSTES 25
a) Le sporocyste mère 25
b) Le sporocyste fille 26
3. LES CERCAIRES 27
a) La productivité des cercaires 28
b) Facteurs influençant l'émission des cercaires 28

III. L'INTERACTION *B. GLABRATA / S. MANSONI* 30

A. LES FACTEURS GENETIQUES 30
B. EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'INTERACTION *S. MANSONI / B. GLABRATA* 31
C. LE SYSTEME INTERNE DE DEFENSE DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* 32
1. LES FACTEURS CELLULAIRES : LES HEMOCYTES 32
2. LES FACTEURS HUMORAUX 33
3. L'IMMUNOMODULATION : LE MODELE COMPATIBLE 34

IV. LA LUTTE ANTI VECTORIELLE. 35

A. HISTORIQUE 35
B. PERSPECTIVES 38

CHAPITRE II : OUTILS DE TRANSFORMATION GENETIQUE APPLICABLES A *BIOMPHALARIA GLABRATA*

A. LES OUTILS DE TRANSFORMATION

I. TECHNIQUES DE TRANSFECTION

A. METHODES PHYSIQUES 43
1. L'ELECTROPORATION OU ELECTROPERMEABILISATION 43
2. LA MICROINJECTION 43
3. LA BIOLISTIQUE 44
B. METHODES CHIMIQUES 45
1. PRECIPITATION AU PHOSPHATE DE CALCIUM 45
2. LIPOFECTION 45

II. LES ELEMENTS TRANSPOSABLES 46

A. CLASSE I : LES ELEMENTS A INTERMEDIAIRE ARN 46
B. CLASSE II : LES ELEMENTS A INTERMEDIAIRE ADN, LES TRANSPOSONS PROPREMENT DIT 47

III. LA VECTORISATION RETROVIRALE 52

A. LES RETROVIRUS 52
1. LE CYCLE DES RETROVIRUS 52
2. ORGANISATION DU GENOME RETROVIRAL 54
B. LES VECTEURS RETROVIRAUX 56
1. PRINCIPE DE LA CONSTRUCTION DES VECTEURS RETROVIRAUX 57
2. LES LIGNEES D'ENCAPSIDATION 57
3. LE SPECTRE D'HOTE DES RETROVIRUS RECOMBINANTS 58
4. LES ETAPES DE LA VECTORISATION RETROVIRALE 59

B. APPLICATIONS AUX CELLULES Bge

I. LES METHODES PHYSIQUES

A. APPLICATION DE L'ELECTROPORATION AUX CELLULES DE LA LIGNEE BGE 61
B. APPLICATION DE LA MICROINJECTION AUX EMBRYONS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* 65
C. APPLICATION DE LA BIOLISTIQUE AUX EMBRYONS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* 65

II. LES METHODES CHIMIQUES 66

III. LES TRANSPOSONS 73

A. TEST D'EXCISION-INTEGRATION 73
1. PRINCIPE 73
2. PROTOCOLE 76
3. RESULTATS 77
B. RECHERCHE DE TRANSPOSONS CHEZ *B. GLABRATA*. 79

IV. LA VECTORISATION RETROVIRALE 83

A. PRINCIPE 84
B. PRODUCTION DES PARTICULES RETROVIRALES 84
C. INFECTION DES CELLULES BGE 84
D. RESULTATS 85

V. STRATEGIE DE RECHERCHE DU PROMOTEUR DE L'ACTINE NON MUSCULAIRE DE *BIOMPHALARIA GLABRATA.* 86

A. CLONAGE DE L'ADNC D'ACTINE 86
B. NATURE NON MUSCULAIRE DE L'ACTINE 89
C. RECHERCHE DE LA REGION PROMOTRICE 90
D. EXPRESSION DE L'ACTINE NON MUSCULAIRE DANS DIFFERENTS TISSUS 94

CHAPITRE III : CARACTERISATION MOLECULAIRE DU RECEPTEUR POUR LA PROTEINE KINASE C ACTIVEE DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*

I. LA SIGNALISATION CELLULAIRE

A. GENERALITES 104
B. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL INTRACYTOPLASMIQUE PAR LA VOIE DES PKCS 104

II. LES PROTEINES KINASES C (PKCS) 105

A. ROLES PHYSIOLOGIQUES DES PKCS 105
B. FONCTIONS DES PKCS 105
C. STRUCTURE DES PKCS 105
D. LES ISOENZYMES DE LA PKC 106
E. LA LOCALISATION DES PKCS 107
F. LES PROTEINES LIANT LES PKCS 107

III. LES RECEPTEURS POUR LES PKCS ACTIVEES (RACKS) 107

A. MISE EN EVIDENCE DES RECEPTEURS POUR LES PKCS ACTIVEES 107
B. INTERACTIONS MOLECULAIRES PKC-RACK . IMPORTANCE DU DOMAINE C2 DES PKCS 108
C. CLONAGE D'UN RECEPTEUR POUR LES PKCS ACTIVEES ET CARACTERISATION DES SITES DE LIAISON 109

IV. LA RACK DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* 110

A. CLONAGE DE LA BG RACK 110
B. CARACTERISATION DE BG RACK 111
C. DISCUSSION 112

CONCLUSION GENERALE 137

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 141

ABREVIATIONS

AA	:	acide aminé
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ADP	:	adénosine bis phosphate
ARN	:	acide ribonucléique
ARNm	:	acide ribonucléique messager
ARNt	:	ARN de transfert
ATP	:	adénosine triphospate
Bg	:	*Biomphalaria glabrata*
Bge	:	lignée de cellules embryonnaires de Bg
BSA	:	sérum albumine bovine
Ct	:	carboxy terminal
DAG	:	diacylglycerol
DOTAP	:	*N*-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate
DMSO	:	diméthylsulfoxyde
DTT	:	dithiothreitol
EDTA	:	acide ethylene phenyl diamine tretaacétique
GFP	:	green fluorescent protein
hAT	:	hobo, Ac,Tam3
HBSS	:	Hanks balanced saline solution
HIV	:	human immunodeficiency virus
IP3	:	inositol tri-phosphate
IPTG	:	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
IR	:	répétition inversée
kb	:	kilobase
kDa	:	kilodalton
kV	:	kilovolt
LINE	:	long interspersed nuclear element
LTR	:	répétition terminale longue
MOI	:	multiplicité d'infection
µF	:	micro Farad
mOsm	:	milliosmol
Nt	:	amino terminal
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	:	cadre ouvert de lecture
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
pb	:	paire de base
PBS	:	phosphate buffered saline
PCR	:	polymerase chain reaction
PEG	:	polyethyleneglycol
pfu	:	unité formant plaque
PKC	:	protéine kinase C
PLC	:	phospholipase C
PMSF	:	fluorure de methyl phenyl sulfonyle
PS	:	phosphatidylserine
PMA	:	phorbol myristate acetate
RACK	:	récepteur pour les protéines kinases C activées
rpm	:	rotation par minute
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
SINE	:	short interspersed nuclear element
Sm28GST	:	glutathion S-transferase de 28 kDa de *Schistosoma mansoni*
SSC	:	sodium citrate
TNFα	:	tumor necrosis factor alpha
VSV	:	virus de la stomatite vésiculaire

RESUME

Dans le cadre de la schistosomiase à *Schistosoma mansoni*, une meilleure compréhension des mécanismes de l'interaction entre le parasite et son hôte intermédiaire invertébré, *Biomphalaria glabrata*, devrait permettre d'intervenir sur la transmission du parasite.

Le laboratoire dispose actuellement d'un système de coculture des parasites avec des cellules d'embryons de mollusques (la lignée cellulaire Bge). Ces cellules présentent un intérêt particulier car elles ressemblent aux hémocytes (les cellules de défense du mollusque responsables de la destruction du parasite dans les associations incompatibles) et sont capables d'assurer *in vitro* le développement du parasite du stade miracidium au stade sporocyste secondaire. La possibilité de moduler l'expression de certains facteurs ou l'expression de facteurs hétérologues par les cellules Bge dans le modèle de coculture apporte un outil fondamental pour la compréhension des mécanismes moléculaires de l'interaction et de la compatibilité.

Dans ce but, nous nous sommes intéressés à la manipulation génétique des cellules de la lignée Bge. Dans un premier temps, la transfection des cellules par le DOTAP a permis de montrer que 2 promoteurs hétérologues, le promoteur inductible de la protéine Hsp70 de *Drosophila melanogaster* et le promoteur constitutif des gènes précoces du CMV sont fonctionnels dans les cellules de mollusque. Parmi les différents gènes rapporteurs testés (β-galactosidase, β-glucuronidase et luciférase), seul le gène codant pour la luciférase semble utilisable dans les cellules Bge.

La recherche d'un promoteur homologue plus efficace a été entreprise. L'ADNc de l'actine non musculaire de *B. glabrata* a été cloné et utilisé comme sonde pour isoler son promoteur dont le clonage est en cours.

Aucun élément transposable n'ayant à l'heure actuelle été identifié dans le génome du gastéropode, nous avons testé, sans succès, la mobilité de 2 transposons d'insectes (hobo de *D. melanogaster* et Hermes de *Musca domestica*) dans les cellules Bge. Par une stratégie PCR et à l'aide d'amorces dérivées du transposon mariner, une séquence présentant une faible homologie avec les séquences de mariner de *Dugesia tigrina* (planaire) et *Caenorhabditis elegans* (nématodes) a été isolée qui correspond probablement à un vestige de transposase. Sur la base de ces résultats, la caractérisation d'un élément transposable chez *B. glabrata* est envisageable.

L'utilisation de particules virales pseudotypées a également été envisagée. Ce système rétroviral permet une intégration de l'ADN proviral portant le gène d'intérêt dans le génome de la cellule infectée. Les premières tentatives n'ont pas permis d'obtenir d'évidence de l'intégration du provirus, cependant les conditions d'infection des cellules Bge restent à être optimisées.

CHAPITRE I : LA BILHARZIOSE

IMPORTANCE DE L'HOTE INTERMEDIAIRE

Plusieurs maladies parasitaires transmises par des vecteurs invertébrés constituent un problème de santé majeur pour les populations humaines et le bétail. En dépit des progrès réalisés en prophylaxie et en thérapie, les maladies parasitaires restent aujourd'hui encore un fléau mondial.

I. LA BILHARZIOSE : Généralités

La bilharziose, schistosomose ou schistosomiase est, après le paludisme, la seconde plus importante endémie parasitaire. Elle touche approximativement 200 millions de personnes sur un total de 600 millions vivant en zone d'endémie et susceptibles d'être infectés. Elle est responsable d'un demi million de décès par an.

La bilharziose fut sélectionnée comme l'une des 6 principales maladies prioritaires du «Programme Spécial de Recherche et de Formation pour les Maladies Tropicales» de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

A. Les parasites :

Les agents responsables de la maladie sont des trématodes hématophages, appartenant au phylum des Plathelminthes (vers plats non-segmentés) : les schistosomes. Dix neuf espèces différentes de schistosomes sont recensées à l'heure actuelle et cinq d'entre elles infectent l'homme ; il s'agit de *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* et *S. mekongi*. D'autres espèces sont zoophiles notamment *S. matthei* et *S. bovis* qui infectent le bétail.

Les manifestations pathologiques de la maladie chez l'homme sont caractéristiques des différentes espèces de schistosomes. Ainsi, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* et *S. intercalatum* sont responsables de la schistosomiase intestinale, *S. haematobium* provoque la forme urogénitale de la maladie.

B. Cycle de vie du parasite

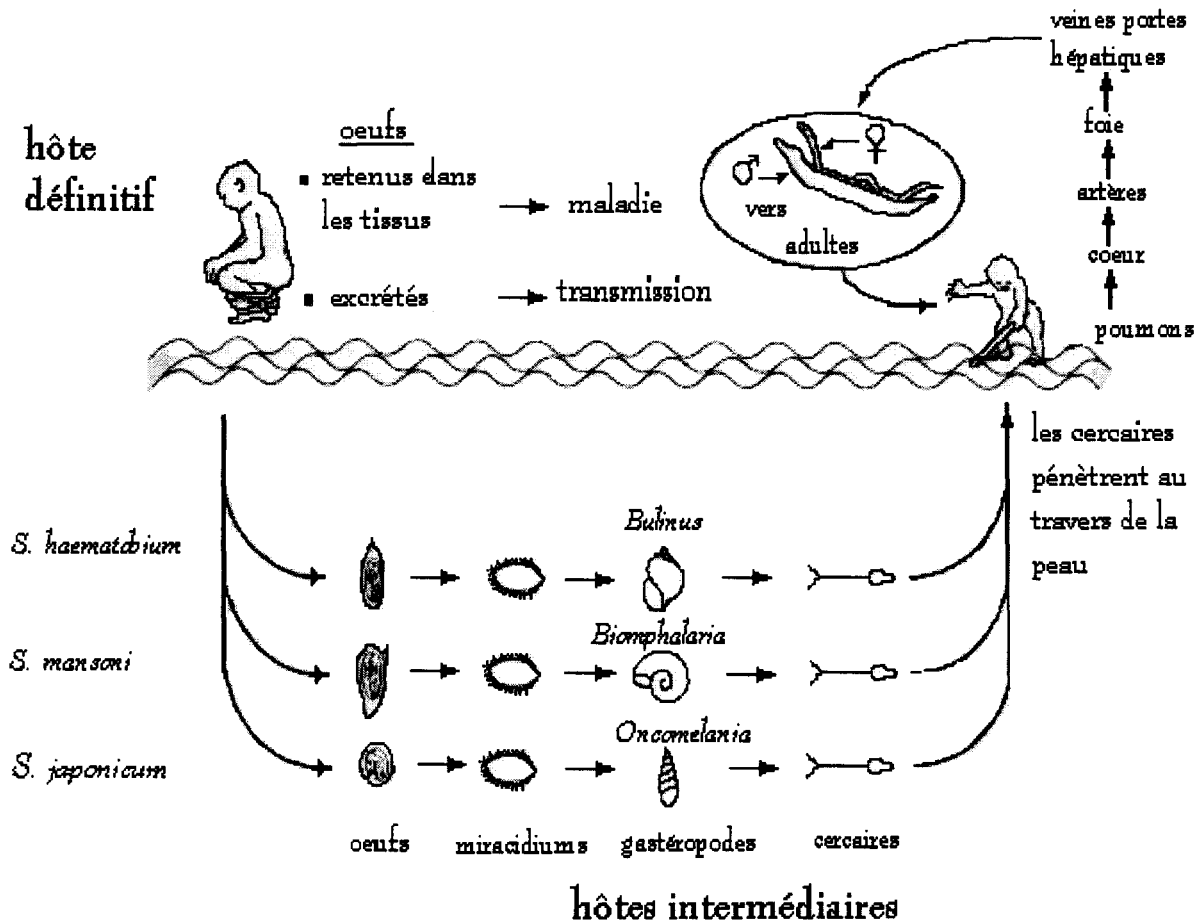
Ces trématodes sont digènes et accomplissent leur cycle de vie successivement dans deux hôtes distincts : un hôte définitif vertébré et un hôte intermédiaire invertébré.

L'hôte vertébré est infecté au contact de l'eau douce contaminée.

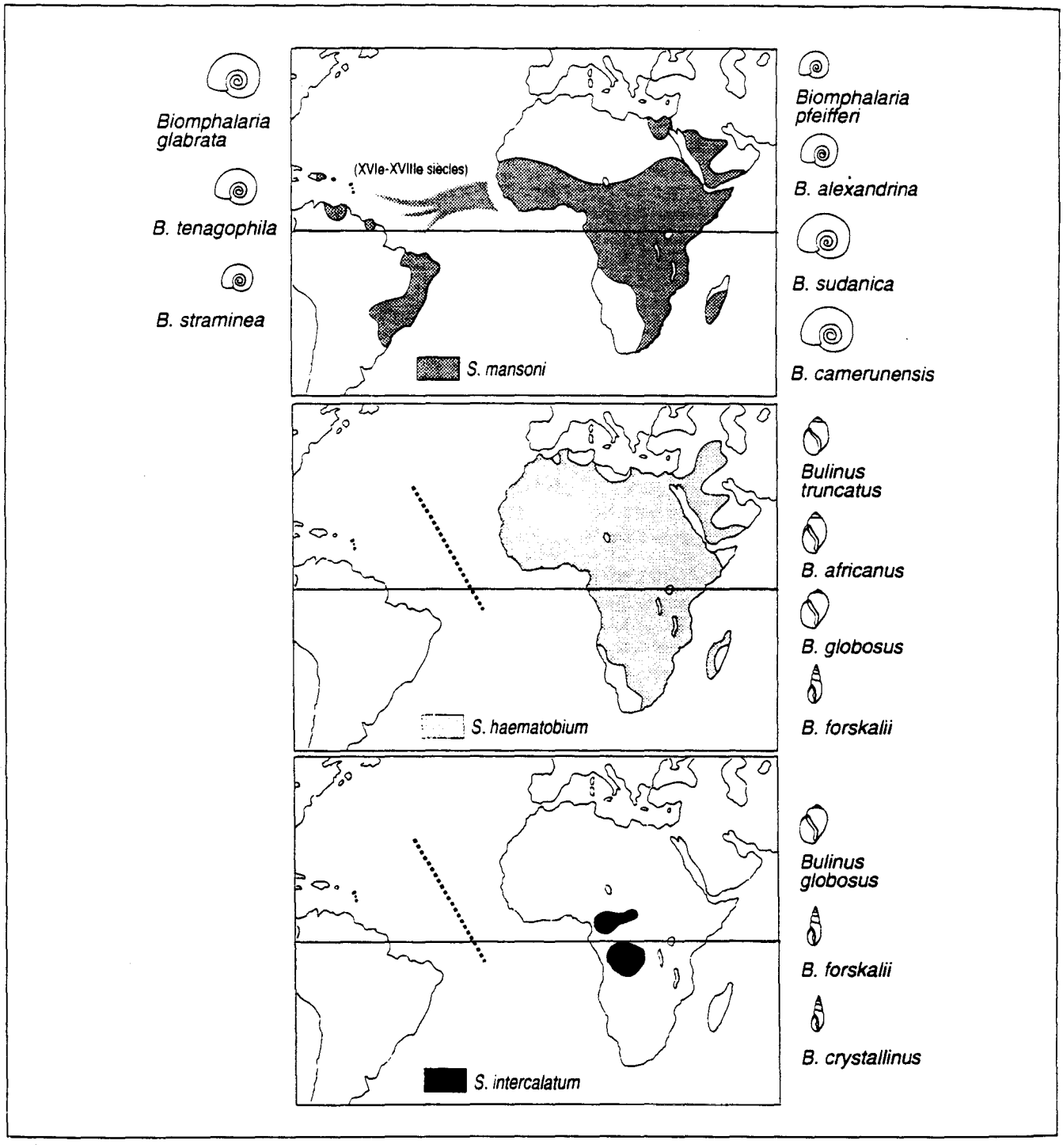
Les cercaires, formes libres aquatiques, traversent la peau de l'hôte vertébré en perdant leur appendice caudal. Après transformation en schistosomule, le parasite migre dans les systèmes sanguin et lymphatique de l'hôte et termine sa course au niveau de la veine porte hépatique où il achève sa maturation et où les partenaires sexuels s'associent.

Les vers adultes vivent en copulation permanente dans le système circulatoire veineux de leur hôte vertébré, le mâle se replie sur la femelle, l'enfermant dans son canal gynécophore. Les couples peuvent vivre ainsi de 3 à 30 ans (Vermund *et al.*, 1983). La femelle est très féconde produisant de 20 jusqu'à 2000 oeufs par jour ; ces chiffres varient selon les espèces de schistosomes avec de 500 à 2200 oeufs pour *S. japonicum*, 60 à 500 pour *S. mansoni*, 20 à 200 pour *S. haematobium* et 50 à 100 pour *S. bovis* (Loker, 1983). Les oeufs sont relargués dans les fécès et l'urine vont éclore au contact de l'eau pour libérer la deuxième forme libre du parasite : le miracidium.

Le miracidium nage alors vers son hôte intermédiaire spécifique : un gastéropode d'eau douce. Après pénétration à travers la peau, le miracidium se transforme en sporocyste primaire qui donne naissance à des sporocystes secondaires donnent naissance à leurs tours à des milliers de cercaires. Les cercaires s'échappent des tissus du mollusque et sont relâchées dans l'eau où elles nagent à la recherche de leur hôte définitif vertébré.



Cycle de vie des principaux schistosomes infectant l'homme (d'après G. Barnish).



Distribution comparée des 3 principaux schistosomes africano-américains de l'homme (d'après Combes, 1993).

C. *Localisation géographique*

Les 74 pays touchés sont situés dans la ceinture équatoriale et subéquatoriale, ce qui revient à dire que ce sont majoritairement les pays du Tiers Monde qui sont atteints.

S. mansoni et S. haematobium sont endémiques en Afrique, dans les Caraïbes et en Amérique du Sud touchant ainsi 53 pays. *S. intercalatum* est trouvé uniquement en Afrique. *S. haematobium* est de plus localisé à Madagascar, en Inde et sur l'Ile Maurice.

L'espèce *S. japonicum* est présente en Chine, aux Philippines au Japon et en Indonésie. *S. mekongi* a été localisé au Cambodge et au Laos.

D. *Pathologie*

Les oeufs sont associés à la pathologie de la maladie. Le ver femelle dépose ses oeufs dans les tissus de l'hôte vertébré. En effet, bien que la majeure partie des oeufs soit relarguée dans les excréments, une partie d'entre eux est retenue. Les oeufs induisent une réaction granulomateuse qui entraîne éventuellement le développement d'une fibrose.

Les vers adultes de *S. mansoni* et *S. japonicum* vivent dans la veine porte et les oeufs sont déposés principalement au niveau de l'intestin et du foie. La schistosomiase intestinale se caractérise par la formation de polypes intestinaux. Au niveau du foie, il se produit une réaction inflammatoire avec formation d'un granulome dû à l'afflux des cellules immunitaires (éosinophiles, macrophages, lymphocytes, granulocytes) autour de l'oeuf. Le granulome va évoluer en fibrose hépatique ; les veinules irrigant le foie sont obstruées. L'hypersplénomégalie et la fibrose généralisée du foie provoquent une hypertension artérielle aboutissant à la formation de varices intestinales et oesophagiennes et à l'apparition d'ascite. La rupture de ces varices peut entraîner des hémorragies fatales.

Les oeufs de *S. haematobium* sont pondus dans le tractus urinaire, et dans une moindre mesure dans le tractus gastrointestinal. Les oeufs induisent des lésions de la vessie et de l'uretère qui résultent dans une hématurie, une obstruction du flux urinaire, de l'insuffisance rénale et l'apparition de cancers de la vessie.

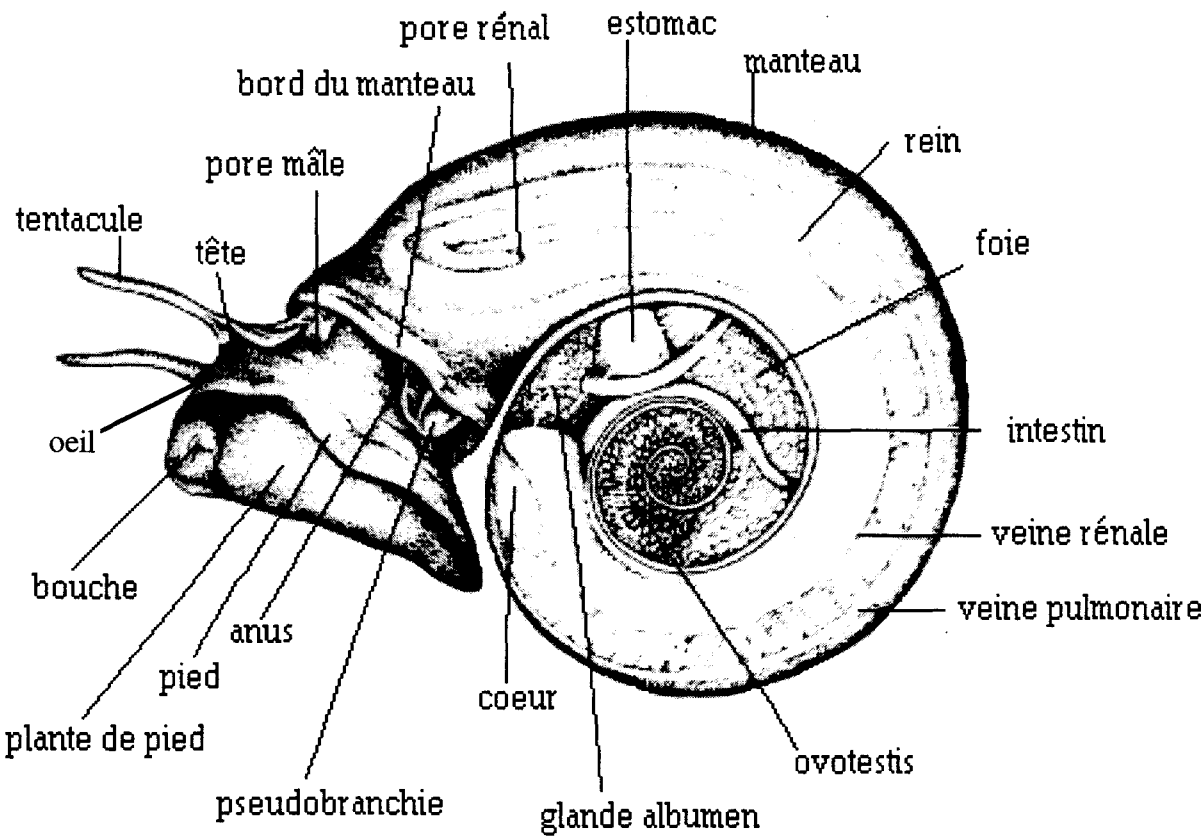
Au cours des 20 dernières années, la biologie moléculaire a permis de caractériser différents antigènes du parasite dont certains ont été sélectionnés comme candidats vaccinaux contre la schistosomiase. Il s'agit de la paramyosine (Sm97) (Pearce *et al.*, 1988), de l'IrV5 une protéine musculaire (Amory-Soisson *et al.*, 1992), de la triose-phosphate isomérase (TPI) (Shoemaker *et al.*, 1992 ; Reynolds *et al.*, 1994), de la Sm23 : un antigène membranaire (Reynolds *et al.*, 1992 ; Köster *et al.*, 1993), de la Sm 14 : une protéine fixant les acides gras (Tendler *et al.*, 1996) et de la

Sm28GST, la glutathion S-transférase de 28 kDa (Balloul *et al.*, 1987 ; Boulanger *et al.*, 1991).

La Sm28GST a été plus particulièrement étudiée au laboratoire ; elle a un effet protecteur dans l'infection par les schistosomes qui se manifeste par la réduction de la pathologie hépatique (Boulanger *et al.*, 1991). La Sm28GST pourrait jouer un rôle dans la détoxification des drogues schistosomicides , elle est abondamment exprimée dans tous les stades du parasite mais présente une expression spécifique de certains tissus comme le tégument et les organes reproducteurs du parasite (Liu, 1996). La mise en évidence de cette enzyme dans les gonades peut-être corrélée à l'action des anticorps anti-Sm28GST sur la fécondité des vers femelles (réduction de la ponte) et la fertilité des oeufs (réduction de leur viabilité) (Xu *et al.*, 1991 ; Xu *et al.*, 1993).

II. CYCLE PARASITAIRE DANS LE MOLLUSQUE

A. *Biologie générale du mollusque Biomphalaria glabrata*



Morphologie générale du gastéropode Biomphalaria vue du coté gauche, après élimination de la coquille (d'après Malek, 1985).

Les gastéropodes constituent la plus grande classe des mollusques mais également la plus variée. De nombreux synonymes du genre *Biomphalaria* sont rencontrés dans la bibliographie : *Planorbina, Taphius, Armigerus,Tropicorbis, Australorbis*. L'utilisation unanime de *Biomphalaria* s'est faite vers les années 80 (Vianey-Liaud, 1990).

Biomphalaria glabrata est un gastéropode pulmoné de l'ordre des Basommatophores. Il vit principalement dans l'eau douce. Sa coquille est plate et discoïde.

Il possède une paire de tentacules contractiles à la base desquelles se trouvent les yeux.

Le corps de l'animal est divisé en tête, pied, manteau et masse viscérale. Le pied et la tête sont unis pour former la région céphalo-pédiale qui porte les tentacules, les yeux, la bouche et les appareils génitaux. Le manteau entoure le « cou » du gastéropode et recouvre toute la masse viscérale. *B. glabrata* est hermaphrodite. Les pores génitaux mâle et femelle sont séparés.

L'ovotestis (gonade) de *B. glabrata* est situé à l'extrémité de la masse viscérale, partiellement accolé à la glande digestive (également appelée hépatopancréas) et totalement libre dans sa partie distale. C'est dans l'ovotestis que le sperme et les oeufs sont formés. Le canal hermaphrodite issu de l'ovotestis se différencie en tractus génitaux male et femelle au niveau de l'estomac.

B. glabrata possède un système circulatoire ouvert constitué de sinus et de lacunes, d'un coeur, de quelques artères et d'un petit nombre de veines. Le coeur possède une oreillette et un ventricule. L'hémolymphe (sang) est envoyée dans les sinus par les artères, après avoir baigné les différents organes et tissus, elle retourne à l'oreillette par les veines rénales et pulmonaires. Ces veines longent le rein et se rejoignent dans le « cul-de-sac » formé par l'extrémité du rein où se trouve l'oreillette.

B. glabrata possède des poumons et une structure appelée pseudobranchie qui remplit également un rôle respiratoire.

B. Spécificité mollusque-trématode

Contrairement à la capacité de certaines espèces de schistosomes à se développer chez une grande variété d'hôtes définitifs, le spectre d'hôte invertébré des parasites est plus limité. L'exemple de *S. japonicum* illustre bien ce phénomène : *S. japonicum* infecte exclusivement *O. hupensis* mais il est capable d'effectuer son cycle sexué chez 40 espèces de mammifères domestiques et sauvages (Bash, 1976 ; Combes, 1993).

Il convient donc de distinguer les hôtes invertébrés permissifs des hôtes invertébrés non permissifs. Les premières études de compatibilité ont été effectuées en 1947. Vingt sept espèces et

sous-espèces de mollusques ont été exposées à *S. mansoni* ; seuls *Tropicorbis* s'est révélé sensible en plus de l'hôte habituel *Biomphalaria* (Cram *et al.*, 1947).

Schistosomes	Mollusques	
Espèces	Genres	Espèces
Groupe S. haematobium		
S. haematobium	*Bulinus*	*B. truncatus*
		B. africanus
		B. forskalii
		B. reticulatus
	Ferrissia	*F. tenuis*
S. intercalatum	*Bulinus*	*B. africanus*
		B. forskalii
S. matthei	*Bulinus*	*B. africanus*
S. bovis	*Bulinus*	*B. truncatus*
		B. africanus
		B. forskalii
Groupe S. mansoni		
S.mansoni	*Biomphalaria*	*B. glabrata*
		B. straminea
		B. tenagophila
		B. amazonica
		B. peregrina
		B. pfeifferi
		B. alexandrina
Groupe S. japonicum		
S. japonicum	*Oncomelania*	*O. hupensis*
S. mekongi	*Tricula*	*T. aperta*

Tableau non-exhaustif de spécificité mollusques/trématodes de quelques espèces de schistosomes (d'après Rollinson et Southgate, 1987).

L'infection par *S. mansoni* (Porto Rico) de souches de *B.glabrata* sensible (de Porto Rico) et résistante (du Brésil) montre que le parasite se développe activement dans le mollusque

sensible. Par contre, dans la souche brésilienne, le parasite est détruit et éliminé en 24 à 48 h après la pénétration. Une infiltration cellulaire (hémocytes) autour du parasite peut être observée ainsi qu'une fibrose (Newton, 1952). De même, des expériences en laboratoire ont permis de montrer qu'une même souche de mollusques infectée par des miracidiums provenant de différentes localités géographiques va présenter des pourcentages d'infection variant de 0 à 100 % (Basch, 1976).

Les études réalisées ces 50 dernières années, bien que corroborant l'existence de la spécificité n'ont pas réussi à mettre en évidence un mécanisme spécifique de compatibilité ou de résistance.

C. Les stades parasitaires intramollusque

1. Le miracidium

a) L'éclosion

Les conditions optimales d'éclosion sont un bon éclairement, une température généralement comprise entre 25 et 30°C et une pression osmotique proche de celle de l'eau (Smyth, 1966 ; Eramus, 1972). L'éclosion se produit cependant tout à fait correctement dans une fourchette de température comprise entre 26 à 39°C. L'hypotonicité de l'eau (proche de 12 mOsm) semble être un facteur déterminant.

b) Le comportement du miracidium

Le miracidium assure la transmission du parasite entre l'hôte vertébré et l'hôte invertébré. Les mécanismes par lesquels le miracidium va localiser son hôte intermédiaire ont été le sujet d'un nombre considérable d'études ; cependant, les résultats obtenus n'ont pas toujours été concordants. Il apparaît néanmoins que les miracidiums se localisent dans l'environnement de leur hôte intermédiaire par deux types de réponses :

- ils répondent aux stimuli externes physiques de l'environnement
- ils répondent à des stimuli chimiques originaires du mollusque hôte.

(1) Recherche du biotope de l'hôte intermédiaire :

Le miracidium est couvert de plaques ciliées qui lui permettent de se mouvoir dans l'eau. Généralement à une température comprise entre 24 et 28 °C, le miracidium de *S. mansoni* reste vivant pendant 8 à 12 h (Prah et James, 1977). Sa vitesse de déplacement dans l'eau peut atteindre 2 mm/s (Samuelson *et al.*, 1984). Il a été montré que les miracidiums peuvent infecter des mollusques situés 86 cm plus loin et 33 cm plus en profondeur que leur site d'émission (Chernin et Dunavan 1962). Des cas d'infections ont pu être relevés à des distances atteignant 5 m *pour S.*

mansoni et *S. haematobium* (James et Prah, 1978). La vitesse du courant a également une influence sur l'infectivité ; les miracidiums restent infectieux à des vitesses inférieures à 13 cm/s (Upatham, 1973).

Un certain nombre de facteurs interviennent pour permettre aux miracidiums d'atteindre la partie du biotope où se situe leur hôte intermédiaire. Il semble que la réponse des miracidiums aux stimuli physiques externes favorise leur orientation vers les niches écologiques de leur hôte intermédiaire (Haas *et al.*, 1995). Par exemple, *B. glabrata,* un des hôtes de *S. mansoni* est le plus souvent localisé à la proximité de la surface de l'eau, accroché à des végétaux flottants ou à la partie supérieure des rives des canaux ou des lacs. Le comportement des miracidiums de *S. mansoni* en réponse aux stimuli physiques comme la lumière et la gravité guide la larve nageuse vers son hôte intermédiaire. En effet, les larves de *S. mansoni* présentent un géotactisme négatif et un phototactisme positif qui les attirent à la surface de l'eau où ils sont susceptibles de rencontrer leur hôte intermédiaire spécifique. Les miracidiums de *S. japonicum* présentent les mêmes réponses à la lumière et à la gravité que *S. mansoni* et leur hôte intermédiaire *Oncomelania* est situé à l'interface de l'eau et de l'air où les larves de parasite se concentrent (Takahaschi *et al.*, 1961). Les miracidiums de *S. haematobium* exhibent un tactisme tout-à-fait inverse : un fort géotactisme positif et un phototactisme négatif ; parallèlement, leur hôte intermédiaire du genre *Bulinus* se localise plutôt au niveau des fonds et des endroits ombragés (Shiff, 1968 ; Prah et James 1977).

(2) Reconnaissance de l'hôte intermédiaire par le miracidium :

Lorsque le miracidium a atteint la niche écologique du mollusque, il doit entrer en contact avec lui. Sur le terrain, le biotope du mollusque spécifique peut être occupé simultanément par plusieurs autres espèces de mollusques et le miracidium doit reconnaître son hôte spécifique. De nombreuses études ont été développées afin d'identifier les stimuli intervenant dans la reconnaissance d'un hôte intermédiaire spécifique par le miracidium.

La diversité des systèmes expérimentaux mis en oeuvre à ce propos n'a absolument pas permis de tirer des conclusions définitives. La question reste aujourd'hui encore très controversée de savoir si effectivement des facteurs chimiotactiques spécifiques interviennent dans l'interaction des deux partenaires.

En 1979, Saladin a publié une revue de 176 travaux concernant les combinaisons miracidium-mollusque mais aussi des combinaisons hétéroclites miracidium-plante, objet ou autres invertébrés sans toutefois pouvoir démontrer clairement que les miracidiums sont capables d'identifier leur hôte avant de tenter de les infecter. Par exemple, lors d'essais en laboratoire, il a été montré que *S. mansoni* est incapable de discriminer entre 7 mollusques différents alors qu'un seul d'entre eux est son hôte spécifique.

Plus de 60 composés organiques ainsi que des acides aminés et des ions (Ca^{++} et Mg^{++}) se sont révélés chimioattractifs pour les miracidiums de *S. mansoni* et d'autres espèces en laboratoire.

Il a été suggéré que le mollusque émettait un complexe indéfini de substances solubles dans l'eau capable de stimuler l'activité des miracidiums et appélé « miraxone » (Chernin, 1970). La miraxone contient en fait de nombreux composés qui attirent les miracidiums comme les acides aminés, les acides gras (MacInnis *et al.*, 1974), l'ammoniaque (Mason et Fripp, 1977) et les amines (sérotonine et dopamine) (Etges *et al.*, 1975) qui sont sécrétées par le pied du mollusque. En 1984, Samuelson a montré que de l'eau conditionnée par *B.glabrata* attirait les miracidiums.

Globalement, compte tenu de la non spécificité des stimuli émis par les mollusques et de la présence de plusieurs espèces de mollusques dans une même niche écologique, on peut supposer que la plupart des miracidiums interagissent avec les hôtes de manière non spécifique (Chernin, 1968 ; Moné et Combes 1986).

(3) Pénétration du miracidium dans le mollusque :

Après fixation du miracidium au mollusque, la pénétration est immédiate. Elle a lieu par le pied dans 70 % des cas, les autres points de pénétration étant le bord du manteau ou les tentacules. La pénétration est précédée par une phase de fixation du miracidium au mollusque. La papille apicale du parasite est considérée comme l'organe de l'attachement et de pénétration (Kinoti, 1971). Elle se produit vraisemblablement par l'association de mouvements mécaniques et par la sécrétion d'enzymes histolytiques par les glandes adhésives. Après pénétration, les plaques ciliées sont éliminées et un nouveau tégument est formé autour du sporocyste. C'est certainement ce tégument qui détermine si le sporocyste nouvellement transformé va survivre ou périr dans l'hôte intermédiaire.

Tous les miracidiums d'une même génération ne sont pas capables de procéder à une infection. L'échec d'une infection réside soit dans l'incapacité du miracidium à pénétrer les téguments du mollusque soit dans son incapacité à se développer ensuite. Pour l'association *S. mansoni* et *B. glabrata* originaire du Brésil, 65 % des miracidiums peuvent pénétrer dans le mollusque mais 15 % d'entre eux vont dégénérer en l'absence de toute réaction hémocytaire (Jourdane et Théron, 1987).

2. Les sporocystes .

Le mollusque est le site d'une intense multiplication asexuée du parasite.

a) Le sporocyste mère

Chez *S. mansoni*, le miracidium se développe en sporocyste primaire ou sporocyste mère à proximité de son point de pénétration dans le tissu conjonctif subépithélial de la zone céphalopodale (Jourdane, 1982). Le même phénomène est observé chez *S. haematobium* (Capron *et al.*, 1965) alors que dans le cas de *S. japonicum*, il a été observé un envahissement de tous les

tissus du mollusque et en particulier des organes cavitaires comme les cavités générales, les cavités viscérales et le coeur (Jourdane et Xia, 1987).

Le nombre de sporocystes mère qui se développent simultanément dans le mollusque est limité dans le couple *B. glabrata/S. mansoni*. Il a été montré que le nombre de sporocystes mère n'excède pas 8 ; si un plus grand nombre de miracidiums infectent le mollusque, ils seront encapsulés (Richards, 1975 ; Kassim et Richards, 1979). Pour l'association *S.haematobium/Bulinus*, les mêmes observations ont été rapportées avec un nombre de sporocystes mère par individu allant de 2 à 8 (Capron *et al.*, 1965). Chez *O. hupensis*, le nombre de sporocyste mère de *S. japonicum* peut atteindre 32 par mollusque (Jourdane et Xia, 1987).

La différentiation des sporocystes fille au sein des sporocystes mère peut être divisée en deux étapes :

- lors d'une première phase, les cellules germinales du sporocyste mère augmentent de taille puis se multiplient abondamment
- lors de la seconde phase, les sporocystes fille s'individualisent à partir de « clusters » embryonnaires sphériques constitués de cellules germinales et somatiques (Schutte, 1974).

Un sporocyste mère est capable de produire de 30 à 630 sporocystes fille selon l'association mollusque-parasite.

b) Le sporocyste fille

Le sporocyste fille ou sporocyste secondaire quitte le sporocyste mère en passant au travers de son tégument. C'est généralement entre le dixième et le 17ième jour que la migration des sporocystes secondaires vers la glande digestive du mollusque se produit. La migration semble faire intervenir un phénomène passif d'utilisation du système circulatoire du mollusque (Meuleman, 1972 ; Becker, 1970 ; Schutte, 1974) ainsi qu'un phénomène actif de migration du sporocyste secondaire au travers des tissus conjonctifs lâches de l'hôte (Pan, 1965 ; Cheng et Bier, 1972). Une fois qu'il a atteint l'hépatopancréas, le sporocyste secondaire se développe et sa taille augmente et simultanément, la différenciation des cercaires débute. Cependant, il a été montré que quelques sporocystes secondaires vont produire des sporocystes fille appelés sporocytes de rang III ou sporocystes tertiaires (Hansen, 1973).

A ce stade, il convient de distinguer la cercariogénèse (production de cercaires, forme infestante pour l'hôte vertébré) de la sporocystogénèse (production de sporocystes).

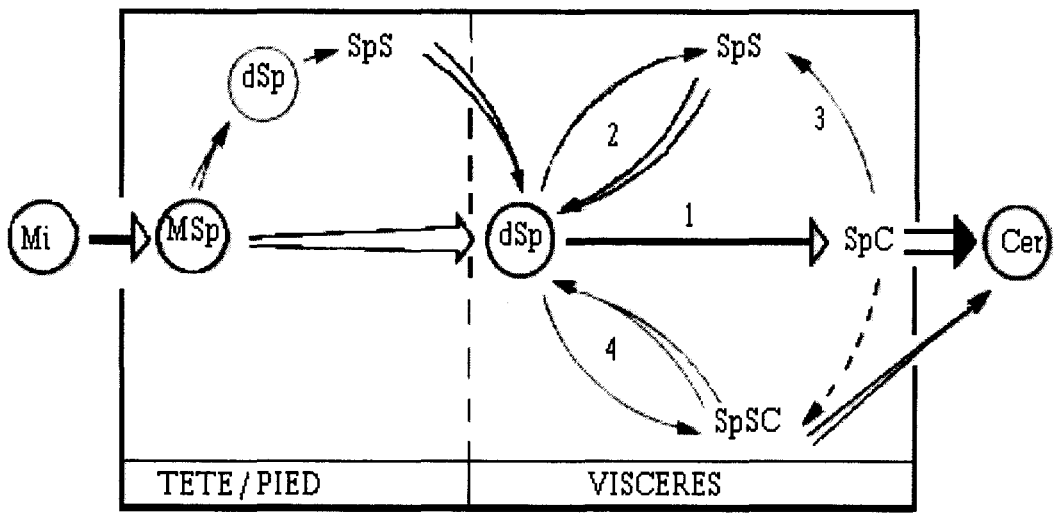
La sporocystogénèse peut être directe ou se produire après la cercariogénèse.

La sporocystogénèse directe : les sporocystes secondaires vont produire de nouveaux sporocystes directement ; ces derniers sont de plus petite taille avec peu de sporocystes dans leur cavité et leur localisation est plutôt céphalo-pédiale (Jourdane et Théron, 1987).

La sporocystogénèse intervenant après la cercariogénèse nécessite un arrêt de la production de cercaires dû à la dégénérescence des embryons cercariens dans le sporocyste. Le sporocyste

fille commence alors à produire une nouvelle génération de sporocystes (Jourdane et Théron, 1987). Dans ce cas, les sporocystes sont totalement développés et se situent généralement dans la glande digestive du mollusque. Les mécanismes par lesquels les sporocystes cercariogènes régressent en sporocystes sporocystogènes sont inconnus et restent à l'heure actuelle inexpliqués (Fournier et Théron, 1985).

La sporocystogénèse et la cercariogénèse simultanées représentent le cas de figure le plus rare où le sporocyste fille produit à la fois des cercaires et une nouvelle génération de sporocystes fille.



Interprétation du développement larvaire des schistosomes dans le mollusque (d'après Jourdane et Théron, 1987) : Mi (miracidium), Msp (sporocyste mère), dSp (sporocyste fille) pour lequel plusieurs voies de développement sont possibles : sporocystes cercariogènes (SpC) produisant uniquement des cercaires (1) ; sprocystes sporocystogènes (SpS) produisant une nouvelle génération de sporocystes fille soit par sporocystogénèse directe (2) soit après cercariogénèse (3) ; sporocysto-cercariogénèse (4).

3. Les cercaires

La cercaire est la seconde forme libre du parasite, qui comme le miracidium est adaptée à un passage en eau douce. Les cercaires s'échappent du sporocyste puis du gastéropode en migrant à travers ses tissus pour atteindre l'eau. La production de cercaires a lieu quotidiennement sur des périodes pouvant atteindre 8 mois. Généralement, elle cesse avec la mort du mollusque, cependant, des cas de cure ont été observés (Pan, 1965).

La durée nécessaire pour obtenir une production de cercaires à partir du moment de la pénétration du miracidium est variable en fonction de la température ambiante : entre 30 et 35°C, le

cycle peut être effectué en 18 jours alors qu'à des températures plus basses plusieurs mois peuvent être nécessaires.

a) La productivité des cercaires

La production de cercaires dépend de facteurs biotiques et abiotiques (Webbe, 1965). La productivité est majoritairement déterminée par l'espèce : ainsi, celle de *S. japonicum* est toujours plus faible que celle des autres espèces de *Schistosoma* (Loker, 1983). Certains *B. glabrata* infectés par *S. mansoni* sont capables de produire une moyenne de 4600 cercaires par jour avec des maxima journaliers pouvant atteindre 17600 (Barbosa *et al.*, 1954). De façon plus générale, l'émission quotidienne de cercaires est de 2000 pour *S. haematobium* et de 1500 *pour S. japonicum* (Webbe, 1965). La productivité dépend en grande partie de la compatibilité hôte-parasite (Barbosa, 1975).

Parmis les facteurs abiotiques, il est à noter que la température de l'eau et l'éclairement ont une grande influence sur les pics d'émission des cercaires.

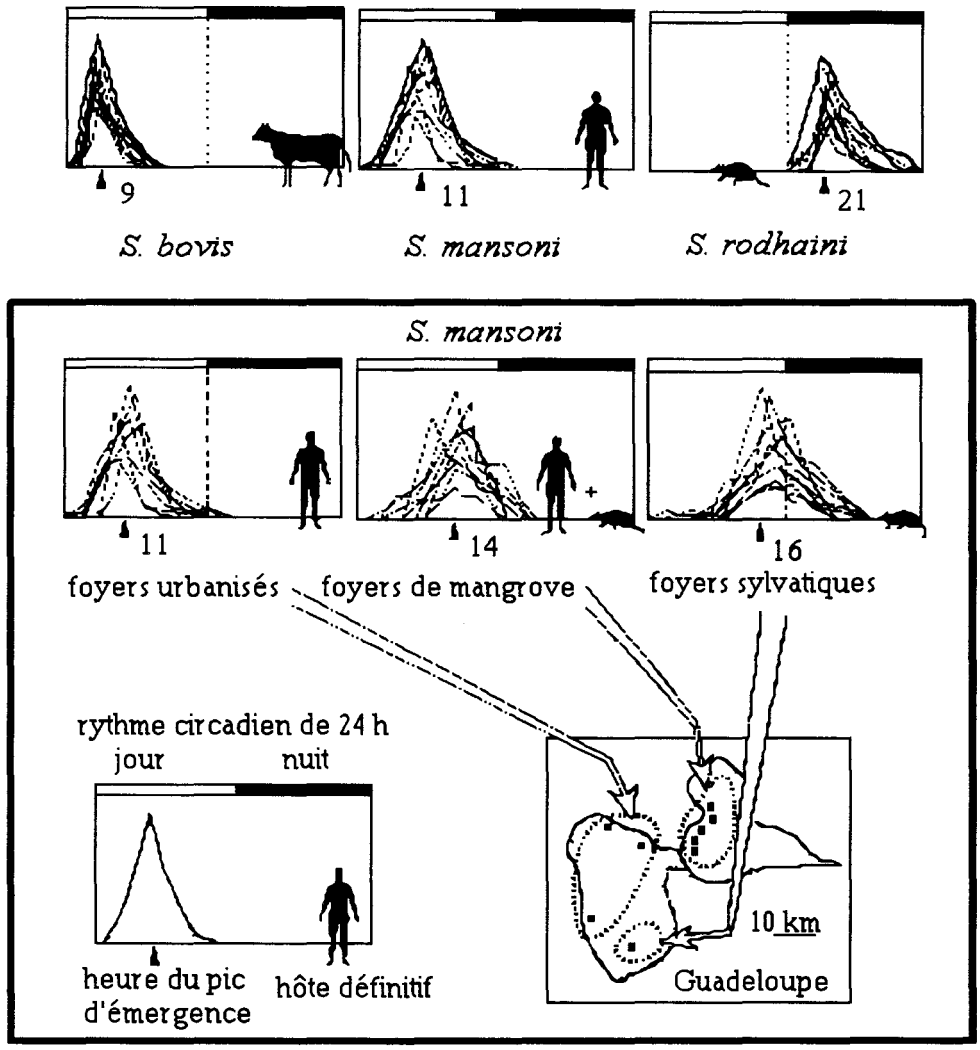
b) Facteurs influençant l'émission des cercaires :

Les cercaires quittent leur hôte intermédiaire suivant un rythme journalier spécifique à chaque espèce de schistosome. Généralement, le relargage des cercaires a lieu à une température de l'eau comprise entre 10 et 30°C et la lumière reste le stimulus inducteur principal. L'étude des « profils d'émergence » des cercaires de schistosomes démontre que les cercaires quittent le mollusque à une heure de la journée qui coïncide le mieux possible avec le moment où l'hôte vertébré fréquente le milieu aquatique.

D'un point de vue chronobiologique, les rythmes d'émission sont généralement circadiens (une seule émission par 24 h).

Seul *S. margrebowiei* a un rythme caractérisé par deux pics d'émission quotidiens, le premier se produisant tôt le matin et le second tard dans l'après-midi. Ces deux pics d'émission sont parfaitement adaptés aux moments de la journée où les antilopes viennent s'abreuver (Pitchford et Du Toit, 1976). En règle générale, dans le cas des schistosomes humains, la sortie commence vers 10 h le matin, est maximale entre midi et 14 h et s'achève vers 16 h. Elle a lieu au moment où l'activité humaine est maximale.

En Guadeloupe, on note une corrélation des pics d'émission avec le type de localisation des foyers d'infection. Pour un foyer urbain, où la prévalence de l'infection est élevée chez l'homme, l'émission des cercaires suit le rythme des schistosomes humains. Dans les foyers sylvatiques, où c'est principalement le rat qui est infecté, le relargage des cercaires est maximum en fin d'après midi. Dans un foyer mixte (mangrove) où les deux hôtes sont présents, le profil d'émission des cercaires est intermédiaire (Théron, 1985). *S. rhodaini* qui infecte les rongeurs sauvages a un pic d'émission nocturne correspondant aux moeurs crépusculaires de l'hôte (Combes, 1996).



Chronobiologie des émissions cercariennes chez les schistosomes (d'après Combes, 1993) : les différents graphiques présentent le pourcentage horaire de cercaires émises en fonction du temps en heure, chaque courbe d'émergence est individuelle (un mollusque, un jour).

En haut : profil d'émergence des cercaires de *S. bovis* (parasite d'ongulés, émergence matinale), de *S. mansoni* (parasite humain, émergence en milieu de journée), *S. rodhaini* (parasite de rongeurs, émergence tardive).

En bas : profils d'émergence des cercaires de *S. mansoni* en Guadeloupe où *S. mansoni* parasite à la fois les hommes, et les rats noirs (*Rattus rattus*). Là où les hommes sont les hôtes vertébrés principaux , l'émission est matinale (à gauche) ; pour les rats, elle est nocturne (à droite). Sur les sites où les deux hôtes sont ciblés, l'émission est intermédiaire (au centre).

Le rythme d'émergence est déterminé génétiquement et ne dépend ni de l'activité propre du mollusque, ni de la présence effective de l'homme. En effet, *S. bovis* est émis au même rythme, que les cercaires proviennent de mollusques du genre *Bulinus* ou du genre *Planorbarius* (Mouahid et Théron, 1986 ; Théron, 1989).

De plus, *S. bovis et S. haematobium*, qui se développent dans la même espèce de mollusque et dans les mêmes régions d'Afrique se différencient par des pics d'émergence des cercaires différents (respectivement 9 h et midi) (Mouchet *et al.*, 1992).

III. L'INTERACTION *B. GLABRATA / S. MANSONI*

A. Les facteurs génétiques

Le terrain génétique de l'hôte invertébré a une influence non négligeable sur le succès d'invasion et de développement du parasite. Ainsi, comme il était évoqué dans le paragraphe concernant la spécificité, une même souche de *S. mansoni* aura un profil d'infection différent chez les souches de *B. glabrata.* De plus, il semble que la sensibilité soit influencée par l'âge du mollusque. Quatre groupes de mollusques ont été distingués par Richards en fonction de leur sensibilité :

I : les mollusques juvéniles et adultes sont résistants

II : les individus juvéniles sont sensibles, les adultes sont résistants

III : les individus juvéniles et les adultes sont sensibles

IV : les mollusques juvéniles sont sensibles et les individus adultes présentent des fréquences d'infection variables et un développement du parasite retardé (Richards, 1970 ; Richards, 1973).

	Biomphalaria glabrata		
	juvénile	adulte	souche
Type I	R	R	10-R2, 13-16-R1
Type II	S	R	442132, 24243432
Type III	S	S	M-line, NMRI, 13141, PR-77
Type IV	S	variable	13152, PR-78, 93375

Types de relation entre *S. mansoni* (souche PR-1) et *B. glabrata* (d'après Richards *et al.*, 1992) : S (sensible) indique une infection avec développement de sporocystes primaires et secondaires ou une production de cercaires ; R (résistant) aucune évidence d'infection après exposition des mollusques aux miracidiums.

La sensibilité des individus juvéniles semble être gouvernée par plusieurs gènes alors que chez les individus matures, la résistance apparaît être le résultat d'un seul gène dominant (Richards, 1973). Cependant ces résultats sont à considérer avec beaucoup de précaution. En effet, les expériences de Richards ont été réalisées avec une souche unique de *S. mansoni* (souche PR-1) et ne sont donc pas généralisables aux autres souches de *S. mansoni*.

De plus, l'infection d'une même souche de *B. glabrata* par des souches de *S. mansoni* issues de différentes régions géographiques montre l'influence génétique du parasite sur le processus infectieux.

Après pénétration du miracidium, il peut se produire plusieurs cas de figure déterminant le développement ou non du parasite :

1) le parasite se développe normalement sans réaction de l'hôte sensible ou compatible

2) le parasite échoue à se développer et ne provoque pas de réaction de l'hôte incompatible

3) le parasite est reconnu, encapsulé et détruit chez l'hôte résistant

4) le développement du parasite aura lieu (généralement après une phase de latence) car les larves sont reconnues, encapsulées mais pas détruites.

Les mécanismes physiologiques de l'interaction mollusque-trématode ont fait l'objet de nombreux travaux qui suggèrent fortement le rôle de certaines protéines. Ces dernières restent cependant à caractériser.

A ce jour, aucun gène impliqué dans les mécanismes de résistance et sensibilité n'a été identifié. Compte tenu de la complexité de l'interaction, il serait raisonnable d'envisager l'existence d'un système similaire à celui rencontré entre les plantes et leurs pathogènes avec une réponse gène pour gène faisant intervenir des gènes de virulence et d'avirulence.

B. Effets physiologiques de l'interaction S. mansoni / B. glabrata

Les mollusques parasités présentent des altérations de la croissance et de la reproduction (Bayne et Loker, 1987 ; Hurd, 1990).

La croissance de *Biomphalaria* est réduite pendant l'infection par *S. mansoni* (Pan, 1965). Dans certaines conditions, la fécondité peut être initialement stimulée puis réduite ou stoppée (Pan, 1965 ; Minchella et Loverde 1981 ; Thornhill *et al.*, 1986). Dans les deux semaines qui suivent l'infection, il a été constaté une augmentation de 1,7 fois du volume de la glande digestive des mollusques parasités (Théron *et al.*, 1992b). Elle est corrélée à une augmentation des réserves de glycogène de la glande digestive qui pourront être utilisées dans les quinze jours suivants lors de la production des cercaires. De plus, le volume occupé par la population de sporocystes est directement fonction du volume de la glande digestive (Théron *et al.*, 1992a). Entre la troisième et la quatrième semaine post-infection, une diminution de 50 % du volume de la glande digestive peut être enregistrée s'expliquant par une diminution des stocks de glycogène (Carter et Bogitsh, 1975).

Au jour 35 post-infection, une diminution de 65 % du taux de glucose dans l'hémolymphe a été enregistrée (Cheng et Lee, 1971 ; Becker, 1980).

L'inhibition de la fécondité des mollusques infectés par des parasites a été interprétée de plusieurs façons, selon les auteurs. Cette diminution de la fécondité peut être interprétée comme la conséquence de l'appauvrissement en nutriments par les parasites alors que d'autres pensent qu'il se produit une inhibiton de la reproduction imposée par le parasite afin que ce dernier dispose de suffisamment de nutriments pour son développement et sa multiplication (Crews et Yoshino, 1989). Le deuxième point de vue peut être privilégié car il a été montré que l'inhibition de la reproduction résulte de la synthèse par *B. glabrata* parasité d'un neuropeptide : la schistosomine qui inhibe l'action ses propres hormones gonadotropes (De Jonk-Brink *et al.*, 1991).

C. Le système interne de défense de Biomphalaria glabrata

Les mollusques possèdent un système de défense interne efficace qui diffère du système immunitaire des vertébrés dans la mesure où il n'y a pas de lymphocytes, ni de production d'immunoglobulines. Le non-soi est reconnu et confronté aux cellules sanguines phagocytaires, les hémocytes et aux facteurs humoraux présents dans l'hémolymphe.

Les mollusques sont capables de reconnaître et de rejeter des allogreffes par encapsulation et également de discriminer entre une iso- et une allo-greffe (Jourdane et Cheng, 1987).

1. Les facteurs cellulaires : les hémocytes

Les hémocytes possèdent des caractéristiques fonctionnelles et morphologiques des monocytes et des macrophages de mammifères. Ils forment une population hétérogène allant de cellules rondes à des cellules adhérentes qui émettent des pseudopodes.

Les cellules rondes ont peu de granules et portent le nom de hyalinocytes. Les cellules adhérentes contiennent de nombreux granules et sont phagocytaires ; elles sont souvent nommées granulocytes. Certains auteurs considèrent les hyalinocytes et les granulocytes comme deux catégories distinctes de cellules (Cheng, 1975 chez *B. glabrata*), d'autres pensent qu'il s'agit des mêmes cellules à des stades distincts de différenciation (van der Knaap *et al.*, 1993 chez *Lymnaea stagnalis*).

Le nombre d'hémocytes semble liée à l'âge du mollusque. Ainsi, les individus juvéniles ont une plus forte densité hémocytaire que les adultes (Stump et Gilbertson, 1980).

Sur la base de critères morphologiques, les hémocytes granuleux des mollusques caractérisés par leur capacité d'adhésion et d'étalement sur le verre ou le plastique ont été considérés comme une population cellulaire homogène. La technologie des anticorps monoclonaux

a permis de démontrer que les hémocytes circulants et adhérents de *B. glabrata* constituent une population antigénique hétérogène confirmant ainsi l'existence de plusieurs sous-populations cellulaires exprimant différents épitopes de surface (Yoshino et Granath, 1983). De plus, ces anticorps monoclonaux ont permis de noter que ces sous-populations d'hémocytes sont présentes à différents taux chez les souches de mollusques résistantes et sensibles au parasite (Yoshino et Granath, 1985).

2. Les facteurs humoraux :

Les lectines ont une fonction essentielle dans la reconnaissance. Elles se trouvent libres dans l'hémolymphe où elles ont un rôle d'agglutinines ou d'opsonines (Boswell et Bayne, 1984 ; Couch *et al.*, 1990).

Au laboratoire, P. Duclermortier procède actuellement à la caractérisation chez *B. glabrata* d'une protéine de type lectine-C qui présente une homologie avec les sélectines de vertébrés. L'existence d'un ligand potentiel (Lewis X) pour cette protéine a été décrite chez divers stades des parasites (Ko *et al.*, 1990 ; Köster et Strand, 1994).

Les lectines se trouvent également à la surface des hémocytes pouvant assurer la fonction de récepteurs pour les corps étrangers. Des études ont permis de montrer la présence de composés solubles dans l'hémolymphe ainsi que de récepteurs à la surface des hémocytes liant des glucides et capables d'assurer la reconnaissance par exemple de levures (Fryer et Bayne, 1989 ; Fryer *et al.*, 1989 ; Bayne, 1990). La diversité de reconnaissance peut être assurée par l'existence de différentes lectines ayant des affinités variées pour divers glucides. Les glycoprotéines et les glycolipides exprimés à la surface du tégument des schistosomes sont autant de ligands potentiels pour les lectines de l'hôte.

La présence de plusieurs molécules de type lectine a été démontrée dans l'hémolymphe de *B. glabrata* (Monroy *et al.*, 1992). Trois lectines de l'hémolymphe de *B. alexandrina* ont été isolées qui présentent une affinité pour des épitopes de *S. mansoni* (Mansour *et al.*, 1995).

Les mollusques sont capables de reconnaître et de rejeter des allogreffes par encapsulation (Jourdane et Cheng, 1987). *A fortiori*, la mobilisation des hémocytes au moment d'une infection parasitaire constitue une réaction normale puisque le trématode est reconnu comme non-soi.

Chez les *B. glabrata* 10-R2 juvéniles, dès 3 h post-infection, les hémocytes entrent en contact avec la surface des sporocystes de la souche PR1 de *S. mansoni*. 8 h après l'infection, le tégument est attaqué et après 48 h, quelques restes des sporocystes encapsulés peuvent être visualisés. Les hémocytes forment des pseudopodes et contiennent dans ce cas de nombreux granules ressemblant à des lysosomes. Quatre jours post-infection, toutes les traces de capsules

ont disparu (Loker *et al.*, 1982). L'étude des enzymes lysosomiales des hémocytes a permis de constater que l'une d'entre elles, la phosphatase acide était absente des hyalinocytes. Elle a ensuite été utilisée comme marqueur des hémocytes. Il a ainsi été montré que les cellules qui encapsulent le parasite sont les granulocytes (Cheng et Garrabant, 1977).

Les études concernant les interactions entre les hémocytes et les larves de trématodes ont établi l'importance des composants du plasma dans les réactions qui suivent l'infestation.

Les facteurs plasmatiques des *B. glabrata* résistants aux schistosomes sont capables de rendre cytotoxiques vis-à-vis du parasite les hémocytes des individus sensibles qui dans leur plasma homologue ne le sont pas (Bayne *et al.*, 1980 ; Loker et Bayne, 1982 ; Granath et Yoshino, 1984).

3. L'immunomodulation : le modèle compatible

Cependant, plusieurs résultats suggèrent fortement un effet modulateur du parasite sur le système de défense interne du mollusque (Fryer et Bayne, 1990). L'infection entraîne la formation de radicaux superoxydes (Connors et Yoshino, 1990 ; Connors *et al.*, 1991) et une augmentation de l'activité des enzymes lysosomiales (Kassim et Richards, 1978 ; Granath et Yoshino, 1983) dans les hémocytes.

Les produits d'excrétion-sécrétion (ES) du schistosome stimulent une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des protéines hémocytaires (Yoshino et Lodes, 1988 ; Lodes et al., 1991). Les ES de *S. mansoni* sont capables d'inhiber la mobilité des hémocytes de *B. glabrata* (souche sensible) alors qu'ils ont peu d'effet sur ceux de la souche résistante (Lodes et Yoshino, 1990). D'autres études ont permis de montrer qu'un certain nombre d'autres fonctions des hémocytes étaient altérées au contact des parasites ou des ES, par exemple la phagocytose (Connors et Yoshino, 1990 ; Fryer et Bayne, 1990) et la cytotoxicité (Loker *et al.*, 1986).

Il a également été montré une diminution du nombre d'hémocytes circulants et il est généralement admis que le parasite provoque une immunosuppression. Cependant, il convient de noter que les hémocytes peuvent être recrutés au niveau des parasites ainsi qu'au niveau des tissus pour assurer leurs réparations.

Le mimétisme moléculaire a été considéré comme l'une des stratégies du parasite pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Le sporocyste primaire de *S. mansoni* acquiert rapidement et sélectivement des composants de son hôte invertébré (Loker *et al.*, 1984 ; Yoshino et Boswell, 1986). Une communauté antigénique entre la surface des miracidiums et des macromolécules de l'hémolymphe a été démontrée dans l'association *B. glabrata/S. mansoni* (Yoshino et Cheng, 1978). Il existe également une réactivité croisée entre les antigènes de sporocystes et les hémocytes (Granath et Aspevig, 1993).

Les recherches menées dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence un épitope glucidique porté par une glycoprotéine de 38 kDa à la surface des stades larvaires du schistosome et qui est commun à *B. glabrata* (Dissous *et al.*, 1986a). Des homologies structurales ont aussi été mises en évidence entre la tropomyosine exprimée à la surface des miracidiums et la tropomyosine musculaire de *B. glabrata* (Dissous *et al.*, 1990).

Le parasite peut également utiliser à son profit des molécules de l'hôte. Une glycoprotéine de 80 kDa identifiée et purifiée chez *B. glabrata* stimule la synthèse protéique des miracidiums et joue probablement un rôle dans le développement du miracidium en sporocyste (Dissous *et al.*, 1986b).

La caractérisation des molécules impliquées dans l'interférence des fonctions de défense de *B. glabrata* par *S. mansoni* n'est pas encore très avancée. Divers neuropeptides tels que l'ACTH, l'α-MSH et la β-endorphine ont été trouvés chez les *B. glabrata* infectés (Duvaux-Miret *et al.*, 1992). Ces peptides peuvent être évidemment libérés par le parasite ou par le mollusque mais ils ne sont pas détectables chez les mollusques sains. Ces trois neuropeptides ont été retrouvés à différents stades du parasite (cercaire, schistosomule, vers adulte et miracidium) (Duvaux-Miret et Capron, 1992). Il a aussi été suggéré que les parasites pouvaient produire de la morphine ; cet opioïde est connu pour provoquer une immunosuppression par inhibition des propriétés d'adhérence des cellules immunitaires (Leung *et al.*, 1995).

IV. LA LUTTE ANTI VECTORIELLE.

A. Historique

La contraction de la bilharziose requiert à la fois un contact avec de l'eau contenant des hôtes intermédiaires du parasite, un équipement sanitaire faible et une fréquentation du point d'eau par des individus infectés.

Prévenir la transmission implique donc des mesures ayant pour but à la fois de réduire ou de stopper le contact avec les eaux polluées et de réduire la contamination de l'eau par les oeufs du parasite. Des mesures ont été mises en oeuvre pour combattre la transmission de la maladie. Des mesures spécifiques ont été développées comme la chimiothérapie et le contrôle des populations de vecteurs ainsi que des mesures non spécifiques qui visent à améliorer globalement le niveau de vie dans les pays en voie de développement et qui constitue un objectif à long terme. C'est en 1942 au Venezuela qu'a démarré un programme de contrôle de santé publique avec des modifications de l'environnement, l'application de molluscicides et la chimiothérapie, ainsi que la mise en place d'unités d'éducation sanitaire. Entre 1943 et 1970, la prévalence de la maladie a chuté de 14,2 % à 2,8 % dans ce pays. En 1950, le Japon a lancé un programme de contrôle national avec autant de

mesures dirigées contre autant de points stratégiques du cycle de vie du parasite. La prévalence a chuté rapidement et le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé de 1993 constate un arrêt de la transmission de la maladie.

La concentration des efforts s'est principalement portée sur le contrôle des populations de mollusques vecteurs puisqu'il était admis à l'époque que cette voie offrait le moyen le plus efficace et le plus rapide pour réduire la transmission (Farooq *et al.*, 1966). Cependant, à cette époque, cette idée était plutôt basée sur des considérations théoriques et sur l'inefficacité des autres méthodes de contrôle des populations de mollusques vecteurs.

Ce n'est qu'en 1973 que l'OMS a mis en évidence l'effet de la lutte antivectorielle sur la transmission. En 1980, l'OMS préconisait l'utilisation de molluscicides, seuls ou en association avec d'autres moyens, comme méthode rapide et efficace de réduction ou d'arrêt de la transmission. Les méthodes de contrôle de populations des mollusques vecteurs restaient alors une priorité pour le contrôle de la bilharziose. Cinq ans plus tard, l'OMS change de stratégie en particulier à cause des progrès réalisés dans les techniques de diagnostic et de chimiothérapie (alors que le contrôle des mollusques sur le terrain semble difficilement applicable dans les pays de forte endémie) l'objectif étant davantage de contrôler la morbidité plutôt que la transmission. Cependant, dans son rapport de 1993, l'OMS tire un signal d'alarme. Un retour aux stratégies de contrôle des populations de mollusques vecteurs est nécessaire. En effet, la chimiothérapie seule ne pourra pas entraîner de réduction significative de la transmission. De plus, il a été rapporté des cas de résistance ou de tolérance au Praziquantel dans deux foyers humains endémiques (Fallon *et al.*, 1996). 82 % de patients sénégalais auxquels il avait été administré une dose de Praziquantel excrétaient toujours des oeufs après le traitement ; une autre étude de la région du delta du Nil a révélé que 79 % des patients traités avec une dose unique étaient guéris alors que 1,8 % des 2565 patients traités par 3 doses séparées excrétaient encore des oeufs viables (Schistosomiasis Research Project, Vol 6, n°1, 1996). Ces observations et l'absence d'un vaccin efficace contre la bilharziose suggèrent que la stratégie à adopter désormais doit à nouveau inclure les programmes de lutte antivectorielle qui reste finalement une méthode de choix pour le contrôle de la transmission.

Parmi les moyens chimiques, le B-2 (sodium -2,5 dichloro -4 bromophénol) a été utilisé de façon extensive au Japon contre *Oncomelania*. Il tue les poissons qui constituent souvent une source de nourriture importante dans les zones d'endémie (Perrett et Whitfield, 1996). Le sulfate de cuivre est absorbé par le sol et les composés organiques, il est inefficace à certains pH et toxique pour de nombreux organismes (Kajihara *et al.*, 1979). Le NaPCP (pentachlorophenate de sodium) est potentiellement dangereux pour les populations et pollue l'environnement. Dans les dix dernières années, aucun nouveau molluscicide n'a été développé. Parmi les molluscicides disponibles, la niclosamide a été de loin la plus utilisée dans les programmes de contrôle des mollusques vecteurs (Anon, 1993). Elle est active à tous les stades du cycle de vie du mollusque et

aussi, sur les larves du parasite (Webbe *et al.*, 1987). Elle possède cependant certains désavantages tels que son prix élévé, son effet délétère sur les plantes aquatiques ; elle provoque également une forte mortalité des poissons (Andrews *et al.*, 1983). Aussi, l'utilisation des molluscicides chimiques a posé finalement deux problèmes l'un de type écologique, l'autre économique. Il faut noter aussi que globalement les traitements chimiques ne préviennent pas la recolonisation du site par des mollusques restants et peuvent entraîner l'apparition de mollusques résistants ou tolérants comme cela a été rapporté pour *Bulinus truncatus* dans la nature et *Biomphalaria glabrata* au laboratoire (McCullough *et al.*, 1980).

Des substances naturelles extraites de plantes ont également été utilisées comme agents molluscicides mais leur utilisation pour la lutte anti vectorielle n'est restée que très limitée. En effet, parmi les 1100 espèces de plantes testées, un grand nombre d'entre elles se sont révélées posséder une activité molluscicide (Kloos et McCullough, 1987). Seules certaines d'entre elles ont pu être étudiées d'une manière approfondie. Par ailleurs, la probabilité de trouver une plante sans effet secondaire écologique et utilisable dans toutes les régions d'endémie était très faible. De plus, la raison principale de l'abandon de cette stratégie pour certaines plantes était aussi liée à la trop grande quantité de plantes nécessaire pour extraire les composants actifs indispensables à une réduction significative de la population de mollusques (Belot, 1993 ; Marston et Hostettmann, 1991).

Les procédés physiques comme la modification de l'environnement (assèchement des marigots, canalisation des cours d'eau), la surveillance des biotopes occupés par les mollusques vecteurs ont prouvé leur efficacité (Butterworth, 1988). Paradoxalement, l'aménagement du territoire a aussi donné naissance à de nouveaux foyers d'infections. Les cas les plus connus sont ceux des programmes d'irrigation du territoire sur les rives du fleuve Sénégal ; le barrage de Diama construit à l'embouchure du fleuve a permis de limiter l'entrée des eaux saumâtres la rendant utilisable pour l'agriculture mais également propice au développement du mollusque vecteur. Ainsi, les population des rives du fleuve présentent souvent des taux d'infection de 98 %. La construction du barrage d'Assouan sur le Nil a eu les mêmes conséquences catastrophiques sur la population. En Chine, la construction du barrage des Trois Gorges sur le Yangtzé prévu pour 1998, va provoquer une augmentation de la surface du lac dans deux régions déjà endémiques (Ross *et al.*, 1997).

Les moyens biologiques ont prouvé leur efficacité ponctuellement :

- les prédateurs des mollusques : comme les poissons qui ont eu parfois aussi des effets dévastateurs sur d'autres espèces et aucun effet sur l'espèce ciblée (Combes, 1992)

- les mollusques compétiteurs : *Marisa cornuarietis* (Ruiz-Tiben *et al.*, 1969) ; *Melanoides tuberculata* (Prentice, 1983 ; Pointier et Guyard, 1992), *Ampullaria glauca* (Pointier *et al.*, 1991).

B. Perspectives :

Ce bilan de la lutte antivectorielle mollusque permet facilement de constater qu'aucune solution satisfaisante n'existe et que les foyers de développement du mollusque vecteur vont certainement s'étendre davantage dans les années à venir. L'idée de la mise en place d'une stratégie alternative est très certainement venue du constat similaire réalisé au sujet du paludisme. Les recherches de certaines équipes se portent actuellement sur la transformation génétique des moustiques vecteurs afin de les rendre réfractaires aux *Plasmodiums*. Pour *B. glabrata*, une stratégie similaire est en train de se mettre en place mais tout reste à faire. Afin de le manipuler, une meilleure connaissance du génome du mollusque est nécessaire. Les moyens de manipuler le génome sont également à mettre en place et d'autre part, il faut connaître des gènes de résistance. Ces gènes peuvent être identifiés, soit grâce à l'expression différentielle de protéines chez les mollusques sensibles et résistants (caractérisation de protéines spécifiques ou « RNA Differential Display » (Miller *et al.*, 1996), soit par l'analyse de leurs polymorphismes génétiques (RAPD) (Larson *et al.*, 1996).

L'avantage du modèle *B. glabrata/S. mansoni* est que nous possédons une lignée cellulaire dérivée d'embryons du mollusque et qui a été établie en 1976 par Hansen. Cette lignée cellulaire est hétérogène et les cellules ont des caractéristiques morphologiques des hémocytes ; en effet, elles émettent des pseudopodes, elles adhèrent au plastique et surtout elles sont capables d'encapsuler *in vitro* les sporocystes de *S. mansoni*. Elles fournissent alors au parasite un environnement favorable à son développement puisque des sporocystes secondaires ont pu être obtenus *in vitro* grâce à ces cocultures (Yoshino et Laursen, 1995).

La génétique de *B. glabrata* est mieux caractérisée que celle de n'importe quel autre mollusque vecteur de la schistosomiase. La disponibilité de souches de gastéropodes présentant des phénotypes de résistance/sensibilité au parasite en fait un modèle très attractif pour l'identification des déterminants génétiques de cette compatibilité. Les difficultés plus ou moins grandes de l'entretien des cycles des schistosomes ont eu une grande influence sur le développement des recherches. La seule espèce dont le cycle est assez aisément maintenu en laboratoire est *S. mansoni* puisqu'il effectue son cycle sexué également chez divers rongeurs et que son hôte intermédiaire *B. glabrata* se maintient facilement en aquariums (Combes, 1993). L'objectif évident des équipes de recherche étudiant l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni* est d'avoir accès dans un futur plus ou moins proche aux gènes impliqués dans les mécanismes empêchant le développement intra-mollusque du parasite tels que les mécanismes de défense associés aux phénotypes de sensibilité et de résistance.

L'avantage du modèle de coculture *in vitro* devrait permettre de pouvoir tester des gènes hétérologues ou des gènes de résistance pour leur influence sur le développement du parasite. Dans cette optique, nous avons décidé de développer des outils afin de transformer les cellules de la lignée Bge.

CHAPITRE II :

OUTILS DE TRANSFORMATION GENETIQUE APPLICABLES A *BIOMPHALARIA GLABRATA*

Dans une première partie, les différents outils de la transformation génétique applicables aux cellules Bge sont décrits : il s'agit des méthodes physiques, des méthodes chimiques, des éléments transposables et de la vectorisation rétrovirale.

Dans une deuxième partie, les résultats obtenus pour chaque technique utilisée sont présentés.

A. LES OUTILS DE TRANSFORMATION

I. TECHNIQUES DE TRANSFECTION

A. *Méthodes physiques*

1. L'électroporation ou électroperméabilisation

L'application d'un champ électrique de forte intensité sur des cellules pendant un temps donné entraîne une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique à diverses substances comme les ions ou les composants de faible et de haut poids moléculaires. L'action de ce champ électrique provoque la formation dans la membrane de structures hydrophiles perméables : les électropores, encore appelés pores. Le traitement de cellules par un champ électrique en présence d'ADN dans le milieu extracellulaire, induit la translocation de l'ADN à l'intérieur des cellules (Zimmerman, 1986).

La première démonstration de cette technique a été obtenue en 1982 pour des cellules murines (Neumann *et al.*, 1982). Depuis l'électroporation a été appliquée notamment aux bactéries (Mack et Titball, 1996 ; Okamoto *et al.*, 1997), aux levures (Neumann *et al.*, 1996), aux protoplastes (Hoffman et Evans, 1986) ainsi qu'à toutes sortes de cellules de mammifères (Heltianu *et al.*, 1997 ; Arthur *et al.*, 1997) et de lignées cellulaires (Rols et Teissié, 1989). Elle a également permis d'introduire de l'ADN dans des mitochondries (Collombet *et al.*, 1997) et des chloroplastes (To *et al.*, 1996). L'électroporation a été appliquée aux oeufs d'oursin (Swezey et Epel, 1989), de poissons (Inoue, 1991 ; Powers *et al.*, 1992 ; Muller, 1993) et d'ormeau (Powers *et al.*, 1995) ainsi qu'à des spermatozoïdes de différentes espèces comme les poissons (Khoo *et al.*, 1992 ; Muller *et al.*, 1992 ; Sin *et al.*, 1993), les bovins (Gagne *et al.*, 1991) et l'ormeau japonais (Tsai *et al.*, 1997). Des particules virales pseudotypées ont pu être introduites par cette technique dans des oeufs du mollusque *Mulinia littoralis* (Lu *et al.*, 1996). La transfection d'ADN dans des parasites (*Plasmodium falciparum*) intra-érythrocytaires (Wu *et al.*, 1995) après électroporation a récemment été montrée. A l'heure actuelle, plus de 1400 articles relatent l'utilisation de cette technique. Cependant, il est à noter qu'une optimisation des paramètres de la technique en fonction du type cellulaire est systématiquement nécessaire et notamment à l'aide de fluorochrome (Djuzenova *et al.*, 1996).

2. La microinjection

La microinjection consisteà manipuler l'échantillon à transfecter avec des micro-instruments, en particulier d'une microseringue qui permettra d'introduire dans la cellule ou l'embryon, une solution contenant la molécule souhaitée. Elle requiert de traiter chaque embryon ou cellule individuellement pointant par là même les limitations de la technique.

Cependant, elle a permis d'obtenir des fréquences élevées de transformation génétique dans des cellules totipotentes ou différenciées ou de réaliser des études d'épissage *in vivo* (Etkin et Pearman, 1987) par exemple du génome HIV dans des oocytes de xénopes (L. Damier, communication personnelle). Chez les mammifères, la microinjection est une technique classique et le transgène est introduit directement dans le pronucleus mâle, en contact direct avec les chromosomes avant la fusion des pronuclei. Les embryons ainsi traités sont ensuite réimplantés dans une femelle pseudo-gestante (Brinster and Palmiter, 1986). Les applications se trouvent majoritairement dans le domaine de l'étude du développement, de l'expression tissu spécifique ou de l'étude du contrôle d'unités de transcription (Etkin et Pearman, 1987 ; Schedl *et al.*, 1993 ; Asante *et al.*, 1994). Cette technique a permis également d'obtenir des transformants chez des espèces invertébrés telles que les nématodes (Hashmi *et al.*, 1995 ; Mello *et al.*, 1991), les arthropodes : acariens (Presnail et Hoy, 1994) et moustiques (Morris *et al.*, 1989 ; Crampton et Eggleston, 1994) et également chez les paramécies (Harumoto et Hiwatashi, 1992). La microinjection a été utilisée avec succés pour la transfection d'embryons et d'ovocytes de crustacés (Gendreau S., 1992) et de mollusques marins (Cadoret J.-P., 1992).

3. La biolistique

Cette technique repose sur le bombardement de l'échantillon, sous vide partiel, avec des microprojectiles recouverts d'ADN qui peuvent directement atteindre les noyaux des cellules cibles, la vélocité des projectiles pouvant être suffisante pour assurer leur passage au travers de structures complexes et rigides telles que le chorion. Cette technique à l'origine, a été mise au point pour transférer des gènes dans des cellules de plantes réfractaires aux autres techniques de transformation utilisant en particulier comme vecteur, la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Son utilisation s'est étendue à d'autres organismes : les bactéries (Shark *et al.*, 1991 ; Toffaletti *et al.*, 1993), les levures (Johnston *et al.*, 1988 ; Armaleo *et al.*, 1990 ; Johnston *et al.*, 1996), les algues (Newman *et al.*, 1990), les champignons (Christiansen *et al.*, 1995 ; Armaleo *et al.*, 1990), les plantes (Godon *et al.*, 1993 ; Aragao *et al.*, 1992, Wan *et al.*, 1995) ainsi que chez les invertébrés : les moustiques (Mialhe et Miller, 1994), l'artémie (Gendreau *et al.*, 1995), la moule (Cadoret *et al.*, 1996) et la crevette (Rousseau, 1995) et chez les vertébrés : les souris (Ausenda *et al.*, 1996), le crapaud (Cheng et Ke, 1994) et).

La première technique de biolistique reposait sur l'utilisation de microparticules séchées sur un disque de Kapton projeté contre une grille par une forte explosion d'hélium. La grille stoppait le disque de Kapton alors que les particules étaient propulsées à grande vitesse sur l'échantillon dans une atmosphère de vide partiel. Une nouvelle technique de biolistique appelée biolistique aqueuse a été élaborée par modification de l'appareil classique et utilisée avec succès sur les embryons d'*Anopheles gambiae*. Le principe est le même que pour la

biolistique traditionnelle mais les microprojectiles sont propulsés avec la goutte de solution aqueuse contenant l'ADN ou les molécules à introduire. Cette modification du système classique a entraîné une nette amélioration des taux d'expression de gènes rapporteurs (100 fois plus environ pour les embryons de moustiques) ainsi qu'une survie comparable des embryons après transfection (Mialhe et Miller, 1994). Les avantages de la biolistique aqueuse ont également été constatés lors de son utilisation chez le vers à soie (Horard et al., 1994).

B. Méthodes chimiques

1. Précipitation au phosphate de calcium :

La transfection par l'intermédiaire du phosphate de calcium repose sur le mélange de l'ADN directement avec une solution de $CaCl_2$ et du tampon phosphate pour former un fin précipité qui est réparti à la surface des cellules en culture. Cette méthode a été décrite pour la première fois en 1973 sur des cellules humaines pour augmenter l'infectivité d'ADN adénoviral (Graham et van der Eb, 1973). Cette technique a été popularisée et continue aujourd'hui d'être une des techniques les plus employées pour transfecter les cellules en culture. Elle a en effet l'avantage d'être peu onéreuse. Les efficacités de transfection peuvent être augmentées dans de nombreux types cellulaires grâce à des traitements additionnels réalisés successivement à l'étape de transfection. Les agents les plus couramment utilisés sont le glycérol, le DMSO, la chloroquine et le butyrate de sodium. Cependant, du fait de leur toxicité vis-à-vis des cellules, les conditions de transfection de chaque type de cellules doivent être optimisées du point de vue de la concentration et du temps de contact du réactif.

2. Lipofection :

La transfection des cellules par l'intermédiaire de liposomes cationiques, appelée lipofection, est une autre méthode chimique utilisée pour le transfert de gènes et décrite pour la première fois en 1987 par Felgner *et al.* Les têtes cationiques des lipides s'associent avec les charges négatives portées par les groupement phosphates des acides nucléiques. Le complexe formé de l'association d'acides nucléiques et de lipides entre en contact avec la membrane cellulaire et il se produit alors soit la fusion des deux membranes lipidiques (Felgner *et al.*, 1987) soit l'endocytose du liposome (Watanabe *et al.*, 1994) qui provoque l'internalisation de l'ADN dans la cellule cible. La transfection par les liposomes offre plusieurs avantages :

- les liposomes peuvent permettre la transfection d'ADN dans les cellules de façon plus efficace que le phosphate de calcium.

- les liposomes sont très simples d'utilisation et ont pu être utilisés avec succés pour des applications *in vivo*.

Les liposomes ont permis d'introduire des substances variées dans des cellules comme des drogues (Son et Huang, 1994), des protéines (Sells *et al.*, 1995), de l'ARNm, des virus, et des effecteurs allostériques. La lipofection a pu être appliquée à des cellules de toutes sortes d'organismes comme les bactéries ou les cellules végétales. Elle permet également d'étudier *in vitro* à partir de primo-cultures, l'activité de régions régulatrices de gènes (Jacquemin *et al.*, 1993).

II. LES ELEMENTS TRANSPOSABLES :

Les transposons sont des éléments génétiques mobiles, très répandus dans la nature. La caractéristique commune de ces éléments est en leur capacité à s'exciser de leurs sites d'origine et à se transposer vers de nouveaux sites chromosomiques.

Les éléments transposables ont été divisés en deux classes majeures sur la base de leur mode de transposition et en sous-classes sur la base de critères structuraux. Ainsi, les éléments qui transposent via un intermédiaire ARN sont de classe I alors que les éléments qui transposent par un intermédiaire ADN sont de classe II.

A. Classe I : les éléments à intermédiaire ARN

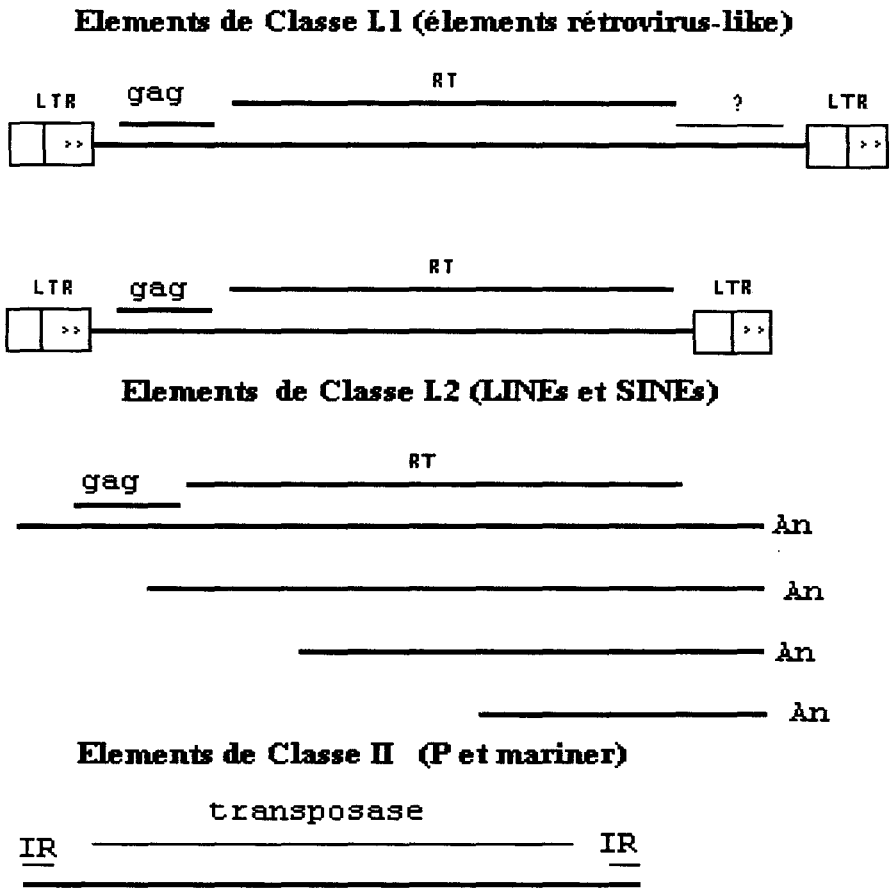
Les éléments de classe I transposent par la transcription réverse d'un intermédiaire ARN. La transposition par transcription réverse est un évènement réplicatif puisque l'élément d'origine n'a pas besoin de s'exciser du génome et il aboutit donc à une augmentation du nombre de copies de l'élément par génome.

Ces éléments peuvent être séparés en deux sous-classes :

La classe I.1 rassemble les éléments qui ont des longues répétitions terminales (LTRs) et des cadres ouverts de lecture (ORFs) qui codent pour des polypeptides dont l'un est une transcriptase réverse (Xiong et Eickbush, 1990). Ils portent le nom de rétrotransposons. Cette classe d'éléments regroupe les éléments copia de *Drosophila melanogaster*, Ty de *Saccharomyces cerevisiae*, IAP et VL30 des rongeurs, les éléments THE de l'homme et BS1 de *Zea mays* et bien d'autres (Finnegan, 1989).

La classe I.2 regroupe des éléments qui ne possèdent pas de LTRs mais ont une queue poly(A) en 3'. Ils contiennent généralement une ou deux ORFs codant pour une transcriptase réverse et sont appelés rétroposons. Cette famille inclut les éléments LINE (long interspersed nuclear element) des mammifères, I, F, G et jockey de *D. melanogaster*, ingi/TRS1 de *Trypanosoma brucei*, Cin4 de maïs. Les SINEs (short interspersced sequences) bien qu'ils se mobilisent par une transcriptase réverse ne possèdent pas d'ORF codant pour cette enzyme

(Okada, 1991) et sont retrouvés chez les mammifères (éléments Alu chez l'homme) et chez les arthropodes (Bm-1 de *Bombyx mori*) (Herrera et Wang, 1991).



Classification des éléments transposables eucaryotes et représentation schématique de leur structure :
LTR (long terminal repeat), RT (transcriptase réverse), IR (répétition inversée), An séquence poly(A).

B. Classe II : les éléments à intermédiaire ADN, les transposons proprement dit

Ils sont constitués d'une courte séquence d'ADN. Ils se caractérisent par la présence à leurs extrémités de courtes séquences identiques disposées en orientation inversée et appelées séquences inversées répétées (IRs).

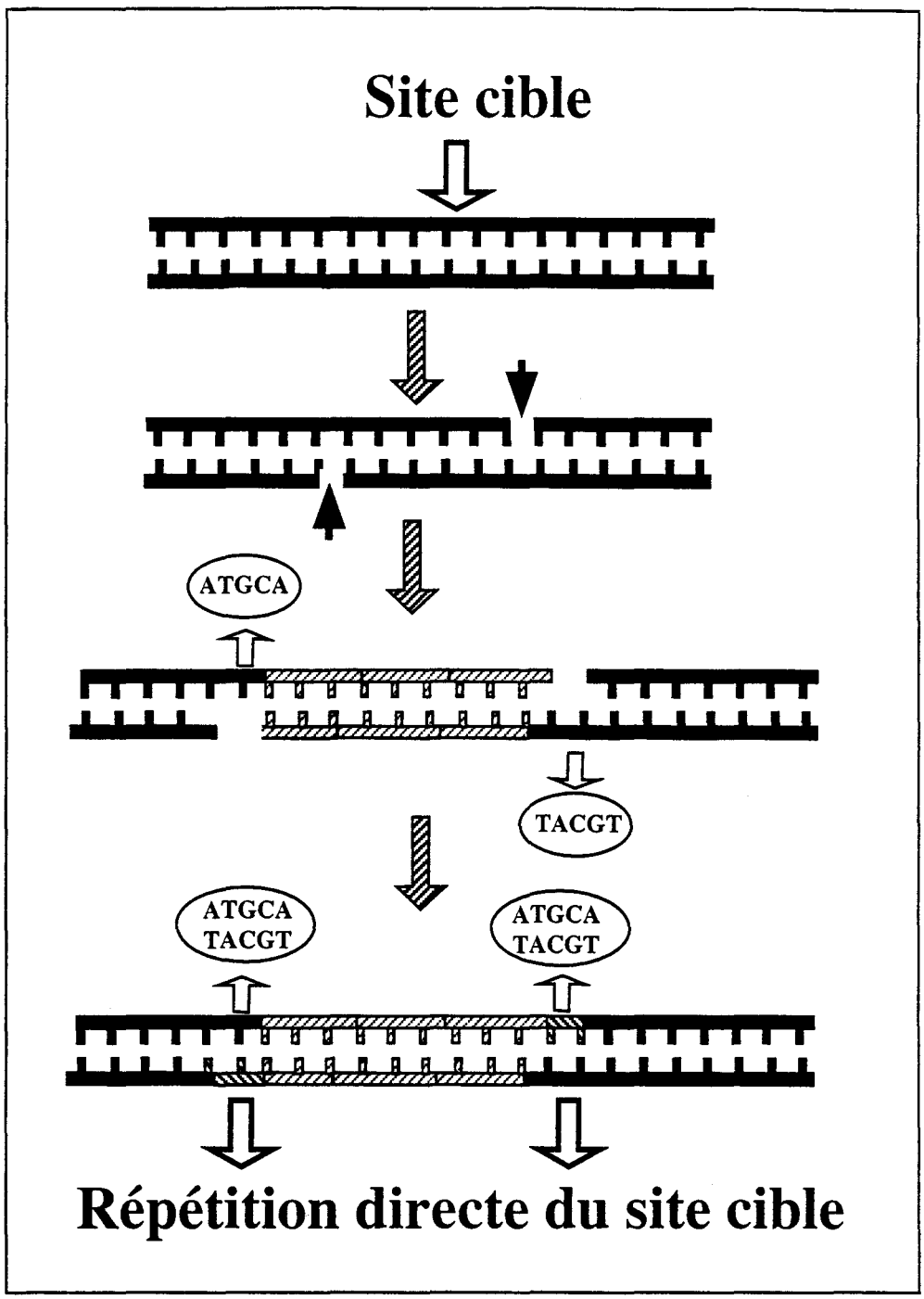


Schéma du mécanisme « cut and paste »

La transposition semble s'opérer selon un mécanisme appelé "cut and paste" (Kaufman et Rio, 1992). Elle débute par une cassure décalée dans l'ADN double brin receveur. Le transposon s'insère au niveau des extrémités simple brin libre. Ce mécanisme explique la présence d'une duplication du site cible d'insertion (séquences répétées directes) de part et d'autre du transposon.

Différents modes de transposition existent. Si la cassure double brin générée par l'excision de l'élément est réparée par les systèmes de réparation de l'ADN de la cellule en utilisant des séquences homologues comme matrices (Gloor *et al.*, 1991), il s'agit alors d'une transposition non réplicative car il n'y a pas augmentation du nombre de copies de l'élément. Si l'excision de l'élément a lieu après la réplication, la réparation peut se faire à partir de la chromatide soeur. Il en résulte une conservation du transposon et donc une augmentation du nombre de copies dans le génome, on parle alors de transposition réplicative.

L'instabilité génétique du maïs due à l'action d'un élément transposable activateur (Ac) a été décrite pour la première fois par Barbara McClintock (1948), il y a presque 50 ans. Depuis, les transposons ont été trouvés dans de nombreux organismes étudiés. Les transposons ont été classés en plusieurs familles. La reconnaissance d'une famille de transposons est basée sur des critères de séquences primaires.

1) La famille des éléments Tc regroupe les transposons de *Caenorhabditis elegans*.

2) La famille de l'élément P :

L'élément P est un transposon très mobile, isolé à l'origine de *D. melanogaster*. Sa grande mobilité a permis son utilisation comme vecteur génique dans l'étude de la biologie fondamentale des drosophiles. L'élément P est mobilisable dans toutes les Drosophilidae y compris des espèces n'appartenant pas au genre *Drosophila*. Cependant, l'élément P n'est pas mobilisable chez d'autres insectes (O'Brochta et Handler, 1988) suggérant que des facteurs de l'hôte, actuellement définis (IRBP) sont très spécifiques et non conservés participant à sa transposition (Rio *et al.*, 1988).

3) Les transposons de la famille MARINER :

Ils sont de petite taille (1286 bp) ; les IRs font 30 pb approximativement, l'insertion se manifeste par la duplication du dinucléotide TA. Mariner possède un seul cadre ouvert de lecture qui code pour la transposase (Hartl, 1989). Le premier élément a été identifié chez *D. mauritiana* comme responsable de l'instabilité génétique somatique des mutants peach du locus white. Mariner est présent au nombre de 20 copies dans le génome de *D. mauritiana* et dans les espèces voisines, de 0 à 7 copies peuvent être dénombrées (Jacobson *et al.*, 1986). L'élément inseré dans le locus white est inactif et il a été nommé "peach", il peut être excisé à haute

fréquence en présence de copies actives de mariner situées ailleurs dans le génome. L'excision de l'élément peach est caractérisée par l'apparition d'un mosaïscisme de la couleur de l'oeil. Les éléments mariner actifs identifiés par leur capacité à induire le mosaïscisme white-peach sont les facteurs Mos (Medhora *et al.*, 1991). Mos1 diffère de mariner (inactif) au niveau de 11 nucléotides correspondant au remplacement de 4 acides aminés. Depuis, mariner a été identifié chez de nombreuses espèces d'insectes non-drosophiles dont le bourdon, la fourmi, la mite, la mouche tsé-tsé, l'abeille, le moustique et le ver à soie (Robertson 1993 ; Bigot *et al.*, 1994 ; Jeyaprakash et Hoy, 1995 ; Blanchetot et Gooding, 1995 ; Ebert *et al.*, 1995 ; Mukabayire et Besansky, 1996 ; Robertson et Asplund, 1996) ainsi que chez l'humain (Auge-Gouillou *et al.*, 1995 ; Oosumi *et al.*, 1995), chez un plathelminthe : la planaire (Garcia-Fernandez *et al.*, 1995), chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Sedensky *et al.*, 1994 ; Oosumi *et al.*, 1996) et chez les champignons (Glayzer *et al.*, 1995 ; Langin *et al.*, 1995). *D. mauritiana* possède plusieurs copies de l'élément mariner qui diffèrent uniquement par quelques nucléotides (99% d'identité) (Maruyama et Hartl, 1991). Contrairement à l'élément P qui est mobile dans les cellules de la lignée germinale (Rubin et Spradling, 1982), mariner est fonctionnel à la fois dans les lignées cellulaires germinales et somatiques (Bryan *et al.*, 1987 ; Lidholm *et al.*, 1993).

Le transfert horizontal de mariner, c'est-à-dire, la transmission de matériel génétique par des moyens autres que les gamètes, a été avancée suite à l'observation de la présence variable d'éléments mariner chez différents arthropodes (Robertson et Lampe, 1995). Le haut dégré d'identité entre toutes les séquences d'éléments mariner (99 % d'identité chez *D. mauritiana*) n'est pas en accord avec les distances phylogéniques existant entre les organismes qui les contiennent (Maruyama et Hartl, 1991 ; Capy *et al.*, 1994). En effet, à l'intérieur du groupe qui inclut *D. melanogaster*, on remarque la présence ou l'absence d'éléments mariner qui n'est pas corrélée à la distance phylogénétique entre les individus.

Lampe *et al.* (1996) ont montré que la transposase mariner purifiée est suffisante pour provoquer la transposition *in vitro* dans un système interplasmide de réaction de transposition. La transposase se lie aux IRs et clive les extrémités du transposon. Mariner a été utilisée pour transformer *D. melanogaster* ; les auteurs ont réussi à intégrer un fragment de 13,2 kb (Lidholm *et al.*, 1993). Mariner pourraît constituer un excellent candidat pour la transformation génétique des insectes non drosophilidae (Robertson, 1993 ; Coates *et al.*, 1995). L'utilisation de mariner comme outil d'étude du génome semble envisageable, d'autant que O'Brochta *et al.* ont pu montré le rôle fonctionnel de mariner chez les tephritides. L'indépendance de spécificité d'espèces permet d'expliquer que les éléments mariner ont une distribution si large qu'ils sont capables de transferts horizontaux. La présence de mariner dans des espèces très diverses appartenant à différents phyla suggère une utilisation préférentielle de cet élément comme vecteur d'intégration génomique (Warren et Crampton, 1994).

4) La catégorie des éléments hAT

La famille hAT : hobo de *D. melanogaster* (h), les éléments de Ac de maïs (A) et les éléments Tam3 (T) *d'Antirrhinum majus* (muflier) a été décrite en 1993 par Atkinson *et al.*, elle regroupe ces transposons sur la base de critères d'excision, de structure, de séquences nucléiques et protéiques et de mobilité.

L'élément hobo (de la famille hAT) a été caractérisé, cloné et séquencé chez *D. melanogaster* (Streck *et al.*, 1986). Hobo peut provoquer l'instabilité chromosomique par des réarrangements chromosomiques et des délétions (Blackman *et al.*, 1987 ; Yannopoulos *et al.*, 1987 ; Lim, 1988 ; Eggleston *et al.*, 1996). Hobo108 possède 3016 pb et des IRs de 12 pb. Hobo produit une duplication du site cible de 8 bp. Il possède un cadre de lecture ouvert principal de 2 kb et plusieurs ORFs de petites tailles. Dans le génome, le nombre de copies complètes de l'élément hobo varie entre 2 et 10 alors que celui des éléments défectifs est largement supérieur (30 à 75). Hobo présente, comme l'élément P, une spécificité pour les cellules de la lignée germinale (Blackman *et al.*, 1989) mais, plus récemment, la transposition de hobo a été observée dans des cellules somatiques de *D. melanogaster* (Kim et Beliaeva, 1991). L'élémént hobo, issu de *D. melanogaster*, est également mobilisable chez d'autres espèces de Drosophilidae (Handler et Gomez, 1995) et de non Drosophilidae (Atkinson *et al.*, 1993 ; O'Brochta *et al.*, 1994 ; Pinkerton *et al.*, 1996 ; Handler et Gomez, 1996 ; DeVault *et al.*, 1996) en présence comme en absence de transposase hétérologue. Ces observations suggérant l'existence de l'élément hobo chez différentes espèces d'insectes ont été suivies de l'identification de transposons appartenant à la famille hAT dans le génome de ces différentes espèces. C'est le cas d'Hermes chez *Musca domestica* (Warren *et al.*, 1994 ; O'Brochta *et al.*, 1996) et de l'élément hermit de *Lucilia cuprina* (Coates *et al.*, 1996). Des éléments hobo-like ont aussi été caractérisés chez *Helicoverpa zea* (De Vault et Narang, 1994), chez *Musca vetustissima* (Warren *et al.*, 1995) et chez les tephritides (Handler et Gomez, 1996). Des éléments apparentés à hobo ont aussi été clonés chez le tabac (Grappin *et al.*, 1996) et chez *Caenorhabditis elegans* (Bigot *et al.*, 1996).

La régulation de synthèse de la transposase s'effectue au niveau transcriptionnel (Calvi et Gelbart, 1994). Il a été montré que la mobilisation de l'élément hobo dépend de facteurs de la cellule hôte non codés par le transposon qui influencent le taux de transposition (Sheen *et al.*, 1993 ; Yannopoulos *et al.*, 1994). L'élément hobo de *D. melanogaster* a été utilisé comme vecteur de transformation chez *D. melanogaster* (Blackman *et al.*, 1989) et chez *D. virilis* (Lozovskaya *et al.*, 1996) et contrairement à l'élément P dont l'efficacité est restreinte aux Drosophilidae, hobo représente un vecteur de transformation potentiel pour le lépidoptère *Helicoverpa zea* (DeVault *et al.*, 1996). Comme pour l'élément mariner, l'analyse des éléments hobo de différentes espèces de drosophiles a permis de mettre en évidence une transmission horizontale de ce transposon (Simmons, 1992).

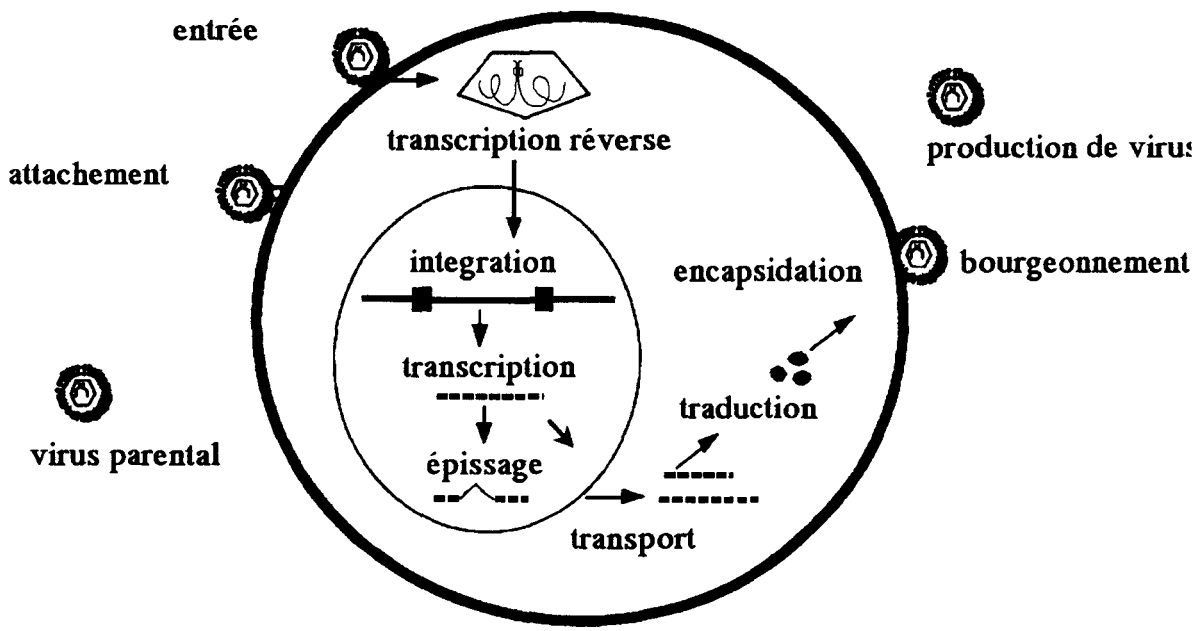
III. LA VECTORISATION RETROVIRALE

A. *Les rétrovirus*

La famille des rétrovirus regroupe une variété de virus de différentes espèces qui sont généralement classés en trois groupes : les spumavirus comme le virus humain HFV (human foamy virus), les lentivirus comme les virus HIV 1 et 2 humains et le virus visna de chèvre et enfin les oncovirus.

1. Le cycle des rétrovirus :

Le cycle du rétrovirus possède des caractéristiques bien particulières. D'une part, l'ARN viral se réplique par un intermédiaire ADN double brin (ADN proviral). D'autre part, le cycle du rétrovirus requiert une étape obligatoire d'intégration dans le génome de l'hôte par un mécanisme qui s'apparente fortement aux mécanismes de transposition de transposons (avec une courte répétition directe à chacune des extrémités provenant de la duplication du site cible). Par le fait même de cette intégration dans le génome cellulaire, le provirus va avoir des conséquences sur la plasticité du génome de la cellule hôte.

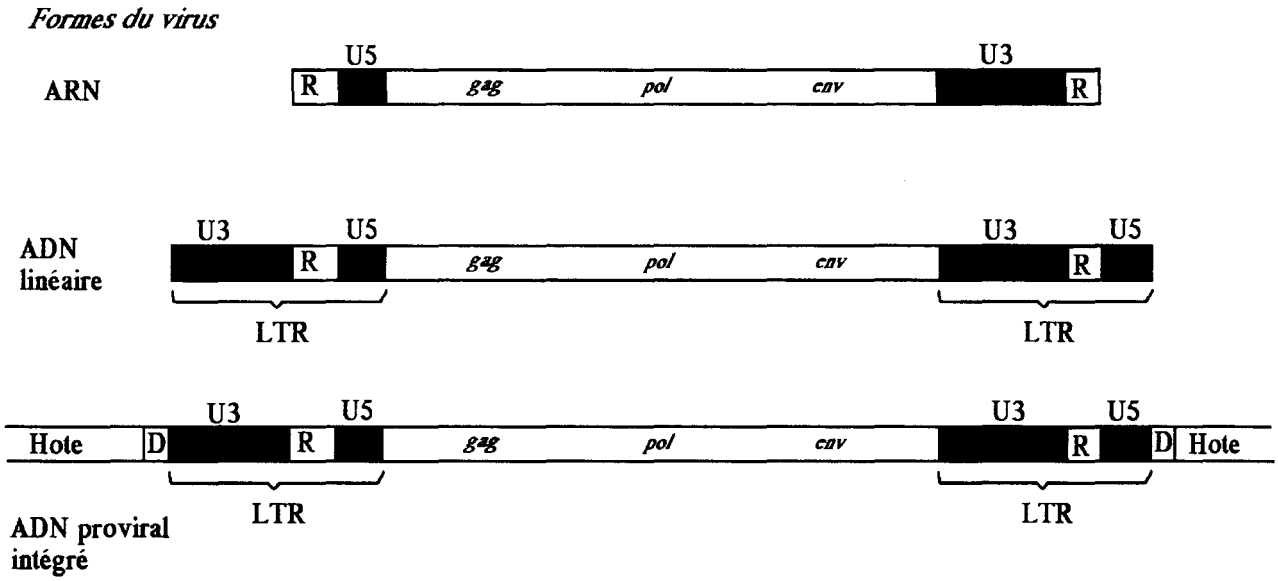


Cycle du rétrovirus (d'après Boris-Lawrie et Temin, 1994)

Les rétrovirus se lient à la surface de leur cellule hôte par un système ligand-récepteur : la glycoprotéine d'enveloppe virale interagit avec un récepteur membranaire spécifique. La fusion

des membranes ou l'endocytose de la particule virale permet la translocation de la capside dans le cytoplasme (voir schéma page précédente).

L'enzyme responsable de la production de l'ADN viral à partir de l'ARN est la réverse transcriptase. Elle convertit l'ARN en un duplex d'ADN linéaire dans le cytoplasme de la cellule infectée.

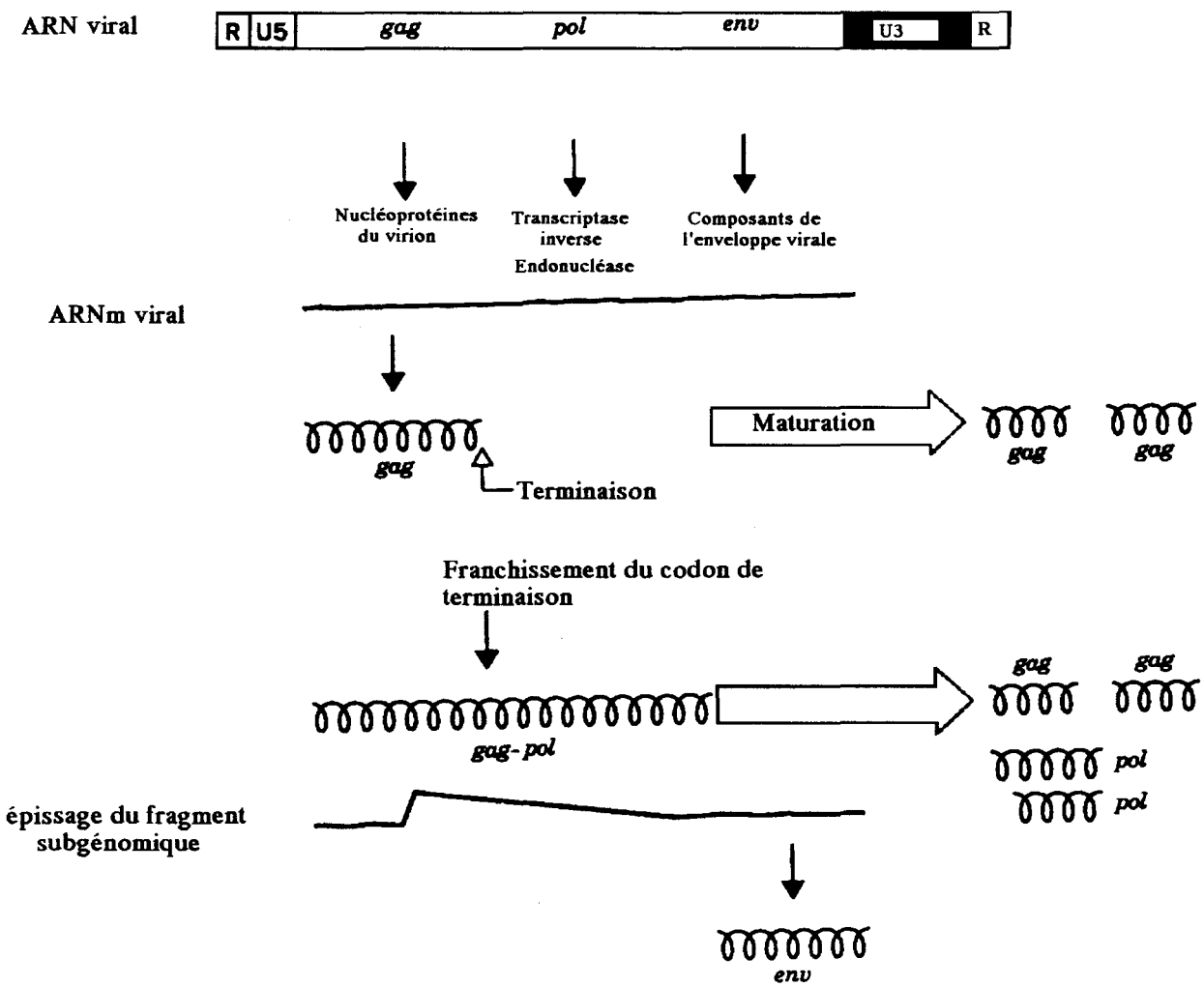


Structure des formes ARN et ADN du rétrovirus : L'ARN rétroviral se termine dans les répétitions directes (R), l'ADN linéaire libre s'étend jusqu'aux LTRs (U3-R-U5) et la séquence provirale est flanquée de courtes séquences directement répétées dans l'ADN de l'hôte (D).

L'ADN viral est alors acheminé dans un complexe nucléoprotéique de grande taille vers le noyau de la cellule. Une ou plusieurs copies de l'ADN viral peuvent alors être intégrées au génome de la cellule hôte. Une seule enzyme semble responsable de l'intégration du provirus, il s'agit de l'intégrase. L'intégration du provirus est une étape normale du déroulement du cycle du rétrovirus et elle est nécessaire pour sa transcription. Le provirus intégré est transcrit par la machinerie de la cellule pour produire des ARNs viraux qui servent à la fois d'ARNm et de génomes viraux (Morgan *et al.*, 1993 ; Marin *et al.*, 1994). Les deux copies de l'ARN viral sont empaquetées dans la nucléocapside en compagnie de la réverse transcriptase, de l'intégrase et de l'ARN de transfert (nécessaire à l'initiation de la réverse transcription) pour former une particule virale qui en bourgeonnant va s'entourer d'une bicouche lipidique provenant de la membrane de la cellule hôte et portant la protéine virale d'enveloppe.

2. Organisation du génome rétroviral :

Le génome des rétrovirus est un ARN simple brin non segmenté, présent au nombre de deux copies dans les particules virales. Typiquement, les séquences rétrovirales possèdent 3 ou 4 gènes qui offrent des cadres ouverts de lecture (ORFs) capables de produire plusieurs protéines par réaction de maturation.



Les gènes rétroviraux : Ils sont agencés sous forme chevauchante et les protéines sont maturées en produits individuels.

Le génome est généralement organisé de la façon suivante : l'ARNm du génome proviral est traduit pour donner les polyprotéines *gag* et *pol*.

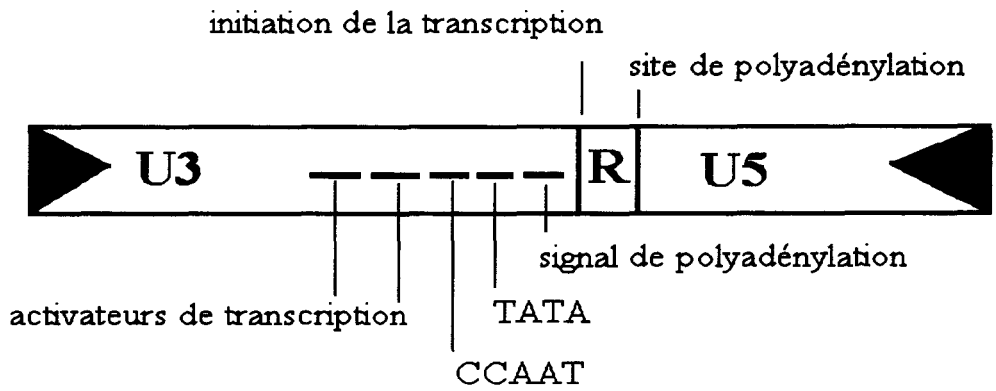
1) L'expression de *pol* implique le « by pass » du codon stop présent à la fin de l'ORF *gag*. *Pol* génère la réverse transcriptase, l'endonucléase et la protéase.

2) Les protéines *gag* sont les nucléoprotéines constituant le « core » du virion.

3) Les composants de l'enveloppe (*env*) sont obtenus par un épissage alternatif de l'ARNm .

L'encapsidation requiert la présence d'un signal spécifique sur l'ARN, il s'agit de la séquence Psi (ψ) qui se situe en 3' du LTR 5', juste en aval du site donneur d'épissage. Ceci assure que tous les messagers épissés qui n'ont pas la séquence Psi ne seront pas intégrés dans les virions.

A l'extrémité 5' de l'ARN viral, se trouve la région R qui est dupliquée à l'extrémité 3'. La région U5 en 5' contient les signaux de polyadénylation ; en aval de celle ci, se situe la séquence PBS qui correspond au site de liaison de l'ARNt. La région U3 située à l'extrémité 3' contient les séquences qui vont agir comme promoteur de la transcription du génome proviral. Après la réverse transcription, l'ADN proviral possède à ses deux extrémités la succession des séquences U3-R-U5. Cet enchaînement porte le nom de LTR pour « long terminal repeat ». Chaque LTR possède à son extrémité une séquence IR (inverted repeat) qui est absolument nécessaire au processus d'intégration. Les séquences promotrices de l'ARN polymérase II ainsi que de



Structure d'une LTR : les IRs sont colorés en noir, toutes les informations nécessaires à l'initiation de de la transcription et à la polyadénylation des ARN viraux sont contenues dans U3 (d'après Marin *et al.*, 1994).

L'intégration du Moloney-Murine leukemia virus (Mo-MuLV) dans le génome de la cellule hôte requiert que les cellules se divisent. Il semble que la destruction de l'enveloppe nucléaire soit nécessaire. En effet, pendant ce laps de temps, l'ADN proviral peut avoir accès au génome de la cellule hôte (Roe *et al.*, 1993). L'intégration du provirus ne semble toutefois pas se produire totalement au hasard. Bien qu'il n'y ait pas eu à ce jour de démonstration de spécificité au niveau de la séquence cible d'intégration, il semble que ce soit la facilité d'accessibilité de l'ADN cellulaire qui gouverne l'insertion de l'ADN proviral (Sandmeyer *et al.*, 1990). De ce fait, la majorité des intégrations ont été décelées dans des régions transcrites correspondant à des zones de faible condensation de la chromatine (Marin *et al.*, 1994).

B. Les vecteurs rétroviraux

Les vecteurs disponibles aujourd'hui dérivent de rétrovirus pour la plupart et exploitent leurs propriétés. En effet, les rétrovirus sont apparus très attractifs comme système de vectorisation car ils possèdent plusieurs avantages :

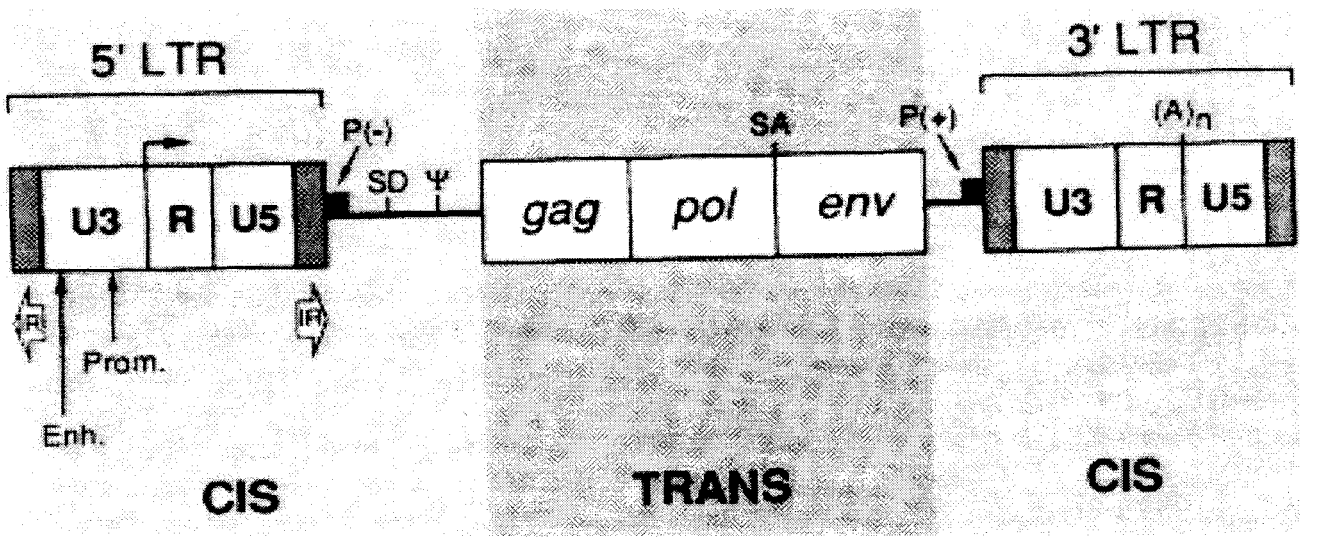
1) ils sont capables d'infecter une grande variété de cellules avec une grande efficacité,

2) un grand nombre de cellules peuvent être infectées simultanément,

3) l'ADN proviral se trouve intégré dans le génome de la cellule hôte,

4) après son intégration dans le génome cellulaire, l'ADN proviral est maintenu de manière stable et transmis de façon mendélienne,

5) les séquences requises pour la réplication virale peuvent être séparées en éléments trans et en éléments cis ce qui permet de générer des stocks de rétrovirus recombinants défectifs pour la réplication et exempts de virus sauvages (Valério, 1992).



Génome viral du MuLV et sa séparation en séquences requises en CIS et en TRANS pour sa réplication : Les séquences requises en CIS sont 1) les 2 LTRs portant les séquences inversées répétées (IRs), les signaux de polyadénylation (A)n,

d'activation de la transcription et le promoteur, 2) les sites de liaison des amorces P(-) et P(+) ; le signal d'encapsidation (ψ). Les séquences requises en TRANS sont les régions codantes pour les gènes viraux *gag*, *pol* et *env*. Sont également figurés : le site donneur (SD) et accepteur (SA) d'épissage de l'ARNm d'*env*. L'initiation de la transcription est indiquée par une flèche horizontale (d'après Valério, 1992).

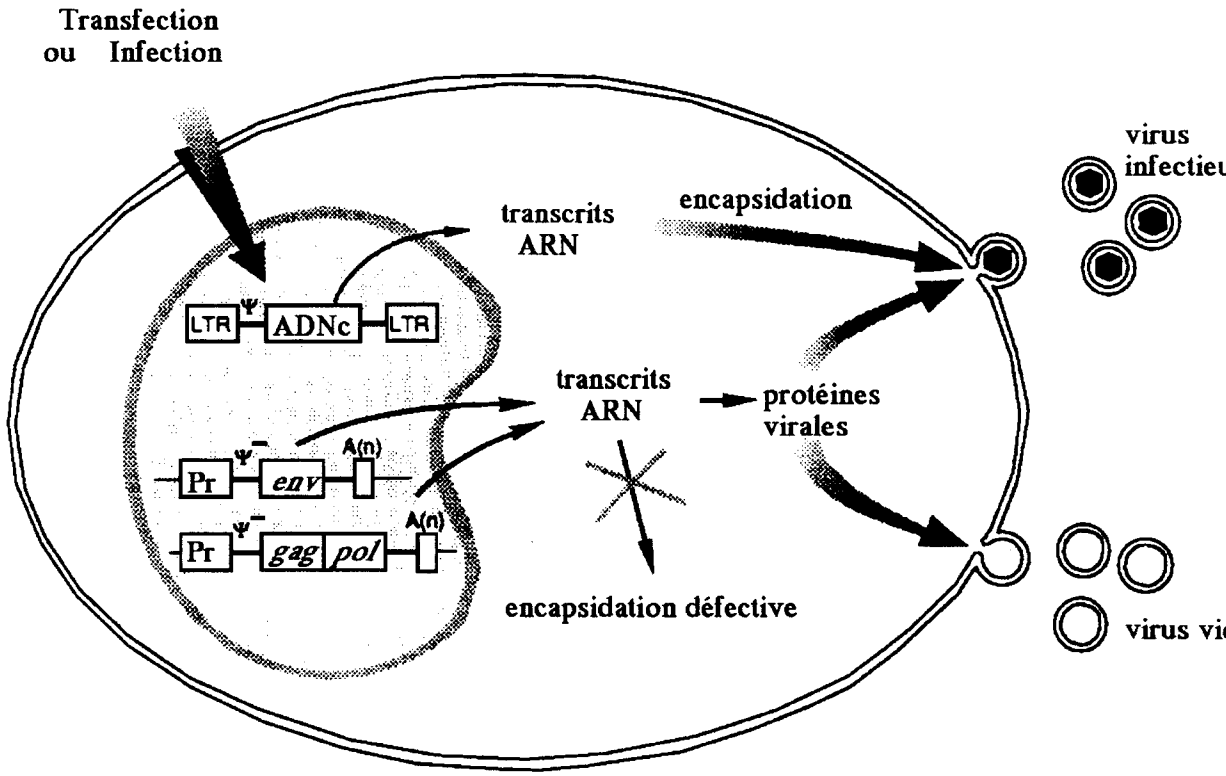
Les vecteurs sont principalement dérivés des rétrovirus leucémogènes murins (MLV) et en particulier du virus Moloney (Mo-MLV) ou d'oncorétrovirus.

1. Principe de la construction des vecteurs rétroviraux

Sur la base de la séparation des fonctions cis et trans de la réplication des rétrovirus, les vecteurs rétroviraux ont pu être dérivés. Ils ont conservé du génome rétroviral uniquement les séquences LTRs 5' et 3' et la séquence Psi. Les séquences codant pour les protéines virales sont délétées et remplacées par le gène à véhiculer. La taille maximale d'une séquence pouvant être introduite est de 8 à 10 kb. Il s'agit généralement d'un ADN complémentaire dont l'expression est contrôlée soit par le promoteur du LTR soit par un promoteur interne choisi (Miller, 1992). La production de particules virales possédant un génome défectif nécessite que les composants viraux indispensables soient apportés en trans.

2. Les lignées d'encapsidation

Dans cette optique, des lignées cellulaires dites d'encapsidation, ont été élaborées de manière à exprimer de façon constitutive les produits des gènes gag-pol et env. La première lignée d'encapsidation a été réalisée en transfectant des cellules NIH3T3 avec le Mo-MuLV dont la séquence Psi avait été délétée (Mann *et al.*, 1983). L'introduction du vecteur rétroviral dans la lignée trans-complémentante résulte dans la production de génome rétroviral recombinant qui est subséquemment encapsidé dans des particules infectieuses mais défectives pour la réplication. Cependant, l'élaboration de telles lignées d'encapsidation a souvent montré la production de virus infectieux réplicatifs. Ce phénomène provient de la recombinaison entre les séquences LTRs du provirus intégré dans le génome de la cellule hôte et de la construction rétrovirale. Les lignées ont donc été améliorées ; d'une part, les LTRs ont été partiellement délétées au niveau du provirus transcomplémentant et d'autre part, les ORFs *gag-pol* ont été séparés physiquement du gène *env*. La production de virus réplicatifs impliquerait alors plusieurs recombinaisons successives et à ce jour, un tel phénomène n'a jamais été observé (Danos et Mulligan, 1988 ; Markowitz *et al.*, 1988).



Une cellule d'empaquetage : Le vecteur rétroviral contient tous les éléments cis nécessaires ainsi que le gène d'intérêt. Il est introduit dans la cellule d'encapsidation soit par transfection soit par infection. La cellule d'encapsidation produit toutes les protéines virales mais ne peut pas générer de particules virales fonctionnelles (ψ-) sauf en présence de vecteur (ψ+). Lors de l'infection, le transcrit du vecteur sera empaqueté avec les protéines virales mais le virus sera défectif pour sa propre réplication (d'après Valério, 1992).

3. Le spectre d'hôte des rétrovirus recombinants :

La capacité des rétrovirus à infecter spécifiquement des cellules de certaines espèces est appelée « spectre d'hôte » et la classification par sous-groupes de spectre d'hôte est connue sous le nom de « tropisme ». Quatre classes principales de tropismes des virus ont été exploitées. Les virus écotropiques sont capables d'infecter uniquement les cellules murines. Les virus xénotropiques sont incapables d'infecter les cellules murines mais peuvent infecter les cellules d'une grande variété d'autres espèces mammifères dont l'humain. Les virus amphotropiques sont capables d'infecter à la fois les cellules murines et mammifères en général, y compris les cellules humaines. Les virus polytropiques ont le même spectre d'hôte que les virus amphotropiques cependant ils appartiennent à une classe distincte puisque l'enveloppe du virus polytropique est reconnue par des sérums dirigés contre les enveloppes des virus écotropiques et xénotropiques.

L'utilisation de vecteurs rétroviraux nécessitait également de pouvoir modifier leurs spectres d'hôte. Le spectre d'hôte d'un virus est déterminé par la protéine d'enveloppe du virus. La séparation des fonctions cis et trans des rétrovirus permet facilement d'interchanger le gène *env* et de générer ainsi des particules de différents tropismes infectieux (Miller, 1992). Cette technique est connue sous le nom de pseudotypage (Landau *et al.*, 1991). Le gène *env* couramment employé est celui du rétrovirus amphotrope 4070A qui confère aux vecteurs rétroviraux la capacité d'infecter un vaste choix de cellules humaines.

Récemment, la protéine G d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) a également été utilisée (Burns *et al.*, 1993). Ce rétrovirus pseudotypé présente certains avantages :

1) la nature transmembranaire de la protéine G lui assure une association forte à l'enveloppe virale et permet de concentrer les particules virales par ultracentrifugation,

2) la protéine G interagit directement et d'une manière peu spécifique avec les phospholipides membranaires, conférant aux particules un large spectre d'hôte contrairement aux systèmes antérieurs qui faisaient intervenir une liaison récepteur-ligand spécifique,

3) le virus a de plus la capacité d'infecter des types cellulaires qui jusqu'à présent n'étaient pas infectés par des vecteurs dérivés du Mo-MLV (cellules de poisson (Burns *et al.*, 1993) de triton (Burns *et al.*, 1994) et d'insectes (Yee *et al.*, 1994).

4) plusieurs copies de l'ADN proviral ont pu être détectées par génome hôte (Yee *et al.*, 1994).

4. Les étapes de la vectorisation rétrovirale

Pour réaliser la transfection, un stock de rétrovirus recombinants doit être ajouté aux cellules. L'utilisation de polycations tels que le polybrène et la protamine ont montré une augmentation de 10 voire 100 fois de l'adsorption du virus (Miller et Rosman, 1989 ; Burns *et al.*, 1993). Les rétrovirus recombinants ne peuvent infecter que les cellules qui se répliquent. Les tentatives pour transfecter des cellules en phase stationnaire se sont révélées infructueuses même si leur multiplication est stimulée 6 h après l'infection. Il est donc possible d'augmenter la fréquence de transfection en stimulant la division des cellules cibles par des facteurs de croissance par exemple juste avant l'infection (Bodine *et al.*, 1990).

B. APPLICATIONS AUX CELLULES Bge

I. LES METHODES PHYSIQUES

A. *Application de l'électroporation aux cellules de la lignée Bge*

L'application de l'électroperméabilisation aux cellules de la lignée Bge présentait plusieurs avantages : elle permet de traiter un grand nombre de cellules tout en les maintenant en condition stérile ; cette technique est très rapide et peu onéreuse.

Une première série d'électroporations a été réalisée en maintenant les cellules Bge (ATCC CRL 1494, Rockville, Maryland) dans leur milieu de culture (220 ml/l de milieu de Schneider ; 1,3 g/l de galactose ; 4,5 g/l d'hydrolysat de lactalbumine ; pH7,2 ; 15 % de sérum de veau foetal) pendant le choc électrique. Les électroporations ont été réalisées sur 10^6 cellules dans un volume de 400 µl. Les cellules ont été mises en contact avec 10 µg d'ADN plasmidique (CMV-luc , Gibbs *et al.*, 1994) dans les cuvettes stériles, 10 min sur la glace avant application du champ électrique (Cell Ject, Cell Electroporation System, Sedd, USA). Les pulses ont été réalisés à 250 V, pour une valeur de la résistance de 192 ohms et à différentes valeurs de capacitance (de 40 à 600 µF). Les cuvettes ont été placées dans la glace aussitôt après le choc électrique puis les cellules sont mises en culture dans du milieu Bge en plaques de 6 puits. 24 h après l'électroporation , les cellules sont reprises et lavées 2 fois dans du PBS 1/3. Elles sont lysées par congélations, décongélations successives dans du PBS 1/3, 1 mM DTT. Après centrifugation (5 min à 10 000 rpm), l'émission de lumière est mesurée de la façon suivante : 150 µl d'extrait cellulaire, 4 µl de luciférine 1 mM, 4 µl d'ATP 10 mM sont mélangés dans un tube et introduit dans le luminomètre (Berthold, Biolumat LB9500T).

La valeur de la capacitance est proportionnelle à la durée de décharge du condensateur, à titre d'exemple, pour une valeur de capacitance de 600 µF, le temps de décharge est de 42 ms. Un faible taux de luciférase a pu être détecté et une augmentation de l'expression était corrélée à une augmentation de la capacitance (voir Figure 1, page suivante). Les résultats de cette expérience n'ont malheureusement pas pu être reproduits.

L'obtention d'une faible expression transitoire de luciférase après l'électroporation permettait de supposer que les cellules Bge étaient transfectables par cette technique à condition d'optimiser les conditions d'électroporation. Les cellules électroporées dans le milieu de culture étaient très endommagées et nous avons choisi par la suite d'utiliser un milieu approprié c'est-à-dire un milieu pauvre en ions qui évite l'échauffement lors du pulse et la coagulation des protéines. D'autre part, le faible taux d'expression peut être dû à un faible nombre de cellules électroporées soit à la mort précoce de la majeure partie des cellules ayant subi l'électroporation.

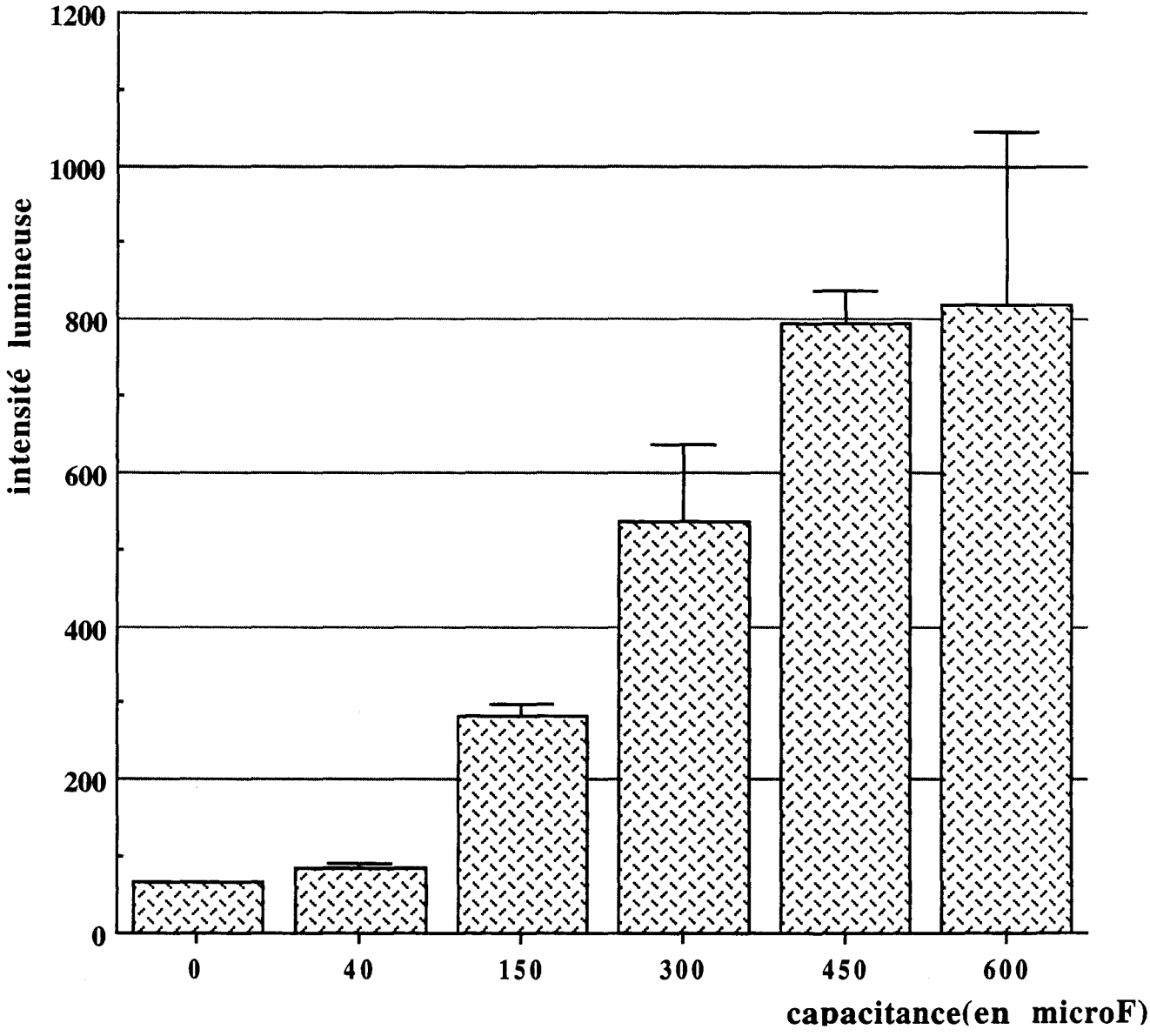


Figure 1 : Expression transistoire de luciférase après électroporation du plasmide CMV-luc dans les cellules Bge en fonction des différentes valeurs de la capacitance.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons électroporé les cellules dans le milieu (1 mM $MgCl_2$, 250 mM sucrose, 10 mM tampon phosphate pH 7,2) dilué au demi dont la composition est proche de celle du milieu utilisé pour les cellules de mammifères et essayé de définir des conditions de pulse optimales pour la transfection en mesurant : le taux de perméabilisation et le taux de mortalité cellulaire à court terme.

Les cellules Bge sont remises en suspension dans leur milieu de culture, et mises au culot par centrifugation 10 min à 1500 rpm. Le culot est lavé deux fois dans du tampon d'électroporation stérile et les cellules remises en suspension dans ce même tampon ont été dénombrées. La concentration a été ajustée à 10^6 cellules/ 300 µl.

Avant électroporation, les cellules ont été déposées dans des cuvettes de spectrophotométrie préalablement stérilisées à l'éthanol et séchées sous hotte à flux laminaire pendant 10 min dans la glace en présence ou non des colorants vitaux. Pour l'évaluation de l'électroperméabilisation des cellules, l'iodure de propidium (Sigma) est ajouté avant le pulse. Pour la mesure de la mortalité à court terme (Gabriel et Teissié, 1995), le colorant vital a été ajouté dans la cuvette une heure aprés le pulse. Aussitôt après application du pulse, 1 ml de milieu Bge complet préchauffé à 25°C est ajouté par cuvette. Pour chaque essai, environ 300 cellules sont dénombrées. L'expérience a été réalisée 4 fois de façon indépendante. Les résultats sont présentés dans la figure 2. Les deux courbes obtenues montrent pour des pulses de 0,2 à 2 kV/cm une parfaite corrélation entre l'électroperméabilisation des cellules et leur mortalité à court terme. Ceci indique qu'une heure après le choc électrique, les cellules n'ont toujours pas retrouvé une structure membranaire imperméable au colorant vital. Il semblerait donc que toutes les cellules soient tuées par l'électroporation. Ceci peut provenir de plusieurs facteurs comme par exemple, la pression osmotique, une durée des impulsions trop élevée, la présence d'agents toxiques hydrophiles dans le milieu. Il a également été observé que l'électroporation pouvait entraîner un stress oxydatif important très nocif pour les cellules (J. Teissié, communication personnelle).

A 2kV/cm, nous avons noté que seulement 70 % des cellules étaient électroperméabilisées. Ce phénomène peut avoir deux explications : soit une partie des cellules n'est pas soumise au champ électrique, soit la population de cellules est hétérogène (J. Teissié, communication personnelle). En effet, avec le système des électrodes parallèles, il est raisonnable de penser que les cellules sédimentées au fond de la cuvette d'électroporation ne vont peut être pas subir le champ électrique et d'autre part, la lignée Bge est effectivement une lignée hétérogène puisqu'elle n'a pas été clonée (Hansen, 1976) et des cellules de morphologie différente peuvent être observées.

En conclusion, il semble que l'électroporation soit une technique peu adaptée aux cellules Bge (peut-être trop fragiles) tout au moins dans les conditions que nous avons utilisées.

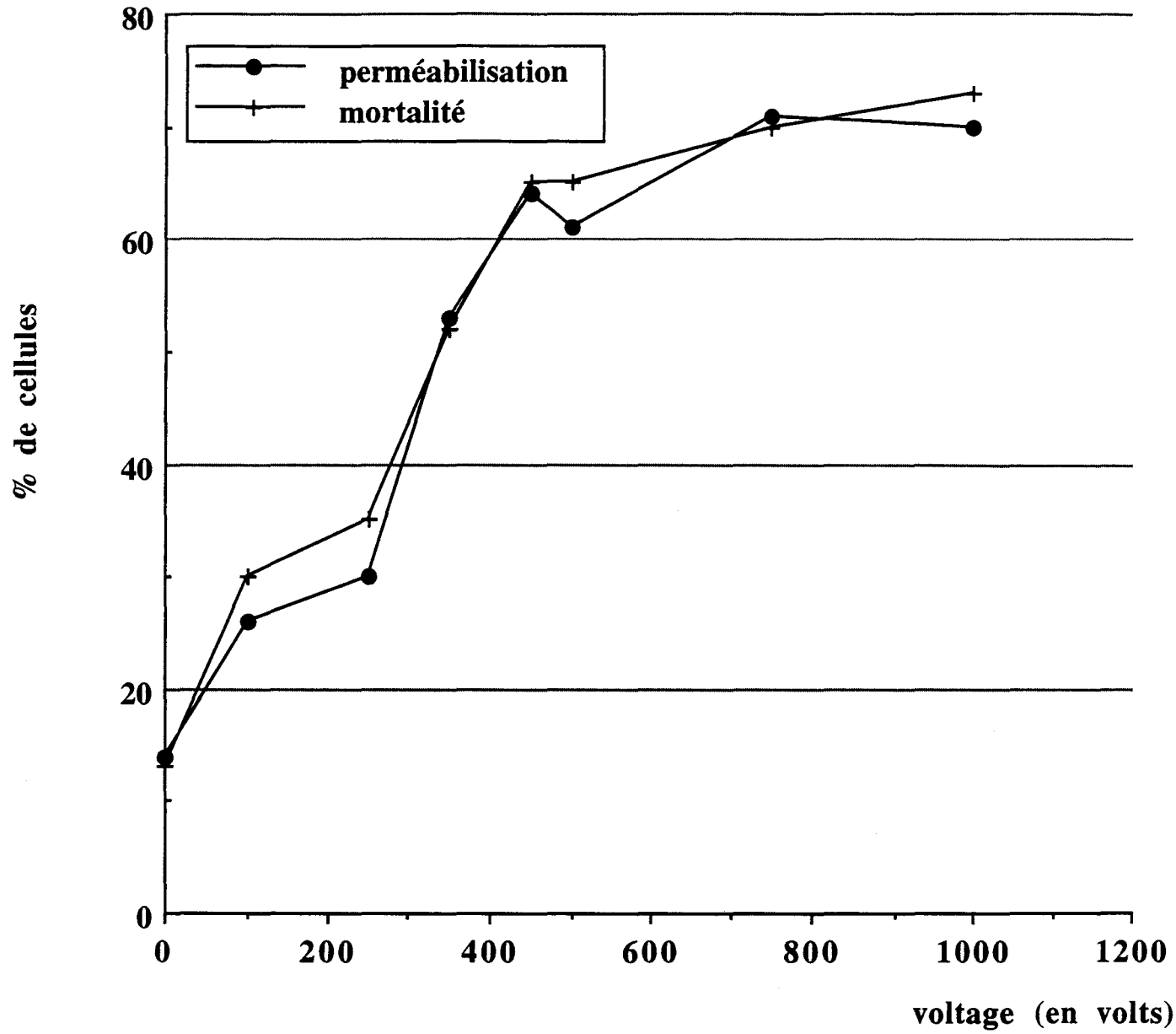


Figure 2 : Courbes d'électroperméabilisation/ mortalité des cellules Bge : les cellules subissent l'électroporation dans des cuvettes de 0,5 cm de largeur correspondant à l'espace compris entre les deux électrodes parallèles. Le pulse est délivré sous forme d'un signal carré par l'intermédiaire d'un oscilloscope.

B. Application de la microinjection aux embryons de Biomphalaria glabrata :

Les embryons de *B. glabrata* ont été prélevés à partir de pontes et traités individuellement. La microinjection a été testée avec du rouge de phénol filtré sur 0,22 µm et débarrassé de toutes particules sédimentables par centrigugation 15 min à vitesse. Plusieurs problèmes techniques ont été rencontrés lors de ces essais. Tout d'abord, la coque de l'oeuf est à la fois élastique et résistante et il est très difficile de faire pénétrer l'aiguille à l'intérieur de l'oeuf sans la casser. De plus, la pénétration de l'aiguille provoque le plus souvent son obturation par des fragments de coque rendant une injection impossible. Il aurait été possible d'envisager l'utilisation d'une aiguille de tungstène uniquement pour perforer la coque et permettre ensuite l'introduction de l'aiguille d'injection. Cependant, nous avons pu observer que déjà le retrait de l'aiguille d'injection provoque une issue dans la coque par laquelle le mollusque s'échappe. De plus, atteindre le mollusque dans la coque est d'autant plus difficile que l'embryon est mobile dans l'espace en trois dimensions constitué par l'oeuf. Les injections de colorants ne nous ont pas permis d'envisager une application potentielle de la microinjection au niveau des embryons du mollusque.

La production de mollusques génétiquement transformés nécessiterait par ailleurs la microinjection non pas d'embryons déjà formés mais de stades très précoces de division de l'oeuf (déjà dépassés au moment de la ponte) ou encore la microinjection au niveau des glandes reproductrices du mollusque adulte. Cependant, l'introduction d'ADN exogène ne peut pas être envisagée car l'ovotestis entouré d'un épithélium est situé sous la coquille. La rupture de la coquille et la perforation de l'épithélium sont léthales pour les mollusques qui ne possèdent pas de système de coagulation et un système circulatoire ouvert.

C. Application de la biolistique aux embryons de Biomphalaria glabrata

Les pontes ont été déposées dans une boîte de pétri recouverte par une voilette pour les maintenir en place. Les tirs ont été réalisés avec des disques de rupture de résistance différente en biolistique liquide. Les billes d'or ont été préparées de la façon suivante : 30 mg de billes sont lavées à l'éthanol à 100 %, puis dans de l'eau et reprises dans 500 µl d'eau. Sous agitation constante, 30 µg d'ADN sont ajoutés ainsi que 30 µl de $CaCl_2$ 2,5 M et 12 µl de spermidine 0,1 M. Quarante µl de suspension de particules d'or sont utilisées pour chaque tir. Les billes d'or baignent donc dans une solution aqueuse contenant l'ADN plasmidique à introduire. Les expériences ont été réalisées avec le pCMV-luc. Même en diminuant au maximum la résistance du disque de rupture et en limitant le vide dans la chambre de bombardement, les pontes ont été très altérées par les tirs. L'observation microscopique des pontes bombardées a permis de visualiser un tapis de billes d'or à la surface de la coque de l'embryon laissant supposer qu'aucune bille n'avait franchi cette barrière naturelle. Les embryons ont tout de même été conservés pendant 24 h puis broyés en

tampon de lyse (Promega) avant comptage de l'activité luciférase. Aucune activité luciférase n'a pu être détectée.

La biolistique, cependant pourrait être envisagée pour le traitement de mollusques entiers. En effet, les mollusques peuvent être anesthésiés au pentobarbital. Sous l'effet de l'anesthésiant, le mollusque se décontracte totalement et ainsi, pied et phallus se trouvent hors de la coquille, accessibles au bombardement.

II. LES METHODES CHIMIQUES :

Des expériences de transfection par le phosphate de calcium ont été réalisées sans cependant permettre d'obtenir une expression transitoire de gène rapporteur. Par contre, la technique de la lipofection a permis d'obtenir des résultats performants.

Les résultats ont montré que le N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate ou DOTAP (Boehringer) est un réactif efficace pour introduire de l'ADN étranger dans les cellules Bge permettant la détection de taux élevés de luciférase 48 h après la lipofection.

Une quantité de 20 µg de DOTAP et un rapport ADN/DOTAP de 0,2 sont suffisants pour une transfection optimale (Fig. 1, Lardans *et al.*, 1996). L'activité enzymatique est maximale à 96 h après la lipofection et reste relativement importante jusqu'à 5 jours, suggérant que les constructions persistent dans les cellules durant cette période.

Nous avons donc montré que le gène rapporteur luciférase est fonctionnel dans les cellules Bge, il n'y a pas d'activité luciférase endogène et la détection de son expression est très simple. Cependant, l'expression mesurée correspond toujours au lysat d'un pool de cellules dont certaines d'entre elles n'ont pas été transfectées.

Les optimisations de la lipofection nécessiteraient donc de posséder un gène rapporteur comme la β-galactosidase ou la β-glucuronidase permettant une visualisation du nombre de cellules transfectées. Malgré de nombreux essais, les gènes rapporteurs β-galactosidase et β-glucuronidase n'ont jamais permis de visualiser de cellules colorées. L'analyse quantitative du nombre de cellules Bge pourrait être réalisée à l'aide du gène rapporteur de la « green fluorescent protein » (GFP). Cependant, une simple observation des cellules Bge sous UV a permis de constater que ces cellules possèdent une fluorescence naturelle verte. L'existence de cette fluorescence naturelle est évidemment génante. Cependant, il semblerait que l'expression de la GFP dans des cellules possédant une fluorescence naturelle permette tout de même de distinguer dans une population de cellules présentant une fluorescence naturelle les cellules qui expriment la GFP (Nigel Preston, communication personnelle).

Nos résultats montrent par ailleurs que parmi les méthodes chimiques (lipofection et phosphate de calcium) et physique (électroporation), la lipofection est la plus adaptée aux cellules Bge.

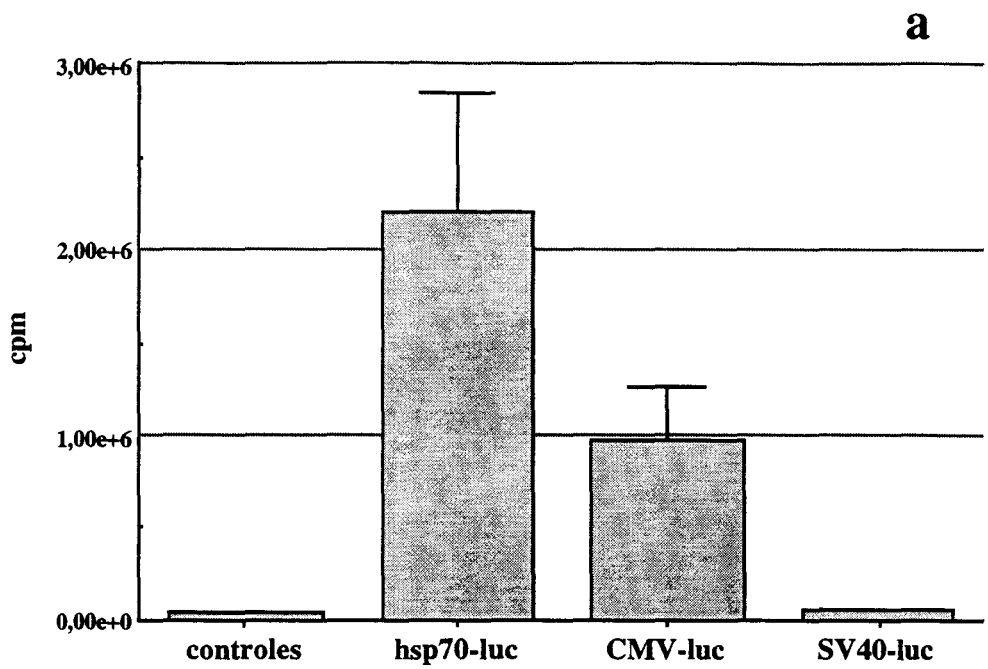
La comparaison de ces trois techniques de transfection a été testée sur des fibroblastes immortalisés de rat et des primocultures de fibroblastes de peau de rat et dans ces cas, la lipofection s'est aussi révélée la meilleure en terme d'efficacité de transfection et de facilité d'exécution (Ray et Gage, 1992).

Il a également été montré sur des hépatocytes quiescents de rat que la lipofection est plus efficace que la précipitation au phosphate de calcium. De plus, les auteurs ont pu montré que la lipofection est plus efficace encore si la prolifération des hépatocytes a été stimulée *in vitro* au préalable par des facteurs de croissance. Dans le cas des cellules Bge, E. Aroca a mis en évidence récemment au laboratoire une activation de la multiplication des cellules Bge par l'insuline bovine. Il serait donc envisageable de stimuler les cellules Bge par cette hormone avant la lipofection afin d'en augmenter l'efficacité.

Nous pouvons peut-être imaginer dans le futur l'utilisation des liposomes pour l'obtention de mollusques résistants. Les complexes ADN/liposomes peuvent être injectés dans le sinus céphalo-pédial du gastéropode et permettre ainsi leur dissémination vers les différents organes. En effet, les complexes ADN/liposomes ont été utilisés *in vivo* par exemple chez le rat où l'injection intraventriculaire a permis de détecter un mois après par PCR et par RT-PCR la présence de l'ADNc et de son messager dans le cerveau.

Parmi les différents promoteurs testés à ce jour, seuls des promoteurs hétérologues ont été utilisés car aucun promoteur de *B. glabrata* n'a été caractérisé. Dans nos expériences, nous avons obtenu l'activité de deux promoteurs dans les cellules Bge : l'un inductible Hsp70 de *D. melanogaster* et l'autre constitutif, le promoteur précoce du CMV. Par contre, le promoteur SV-40 (du virus simien, Stratagène 205) n'est pas actif dans les cellules Bge (Figure 1a, page suivante).

Nous avons parallèlement testé l'activité du promoteur proximal du gène codant pour la glutathion-S-transférase Sm28 de *S. mansoni* (pZS81). Ce promoteur contient 278 pb en amont du site d'initiation de la transcription et renferme entre autre des séquences consensus CCAAT et AP1 dont la fonction a été démontrée dans divers types de cellules mammifères (Hela, Jurkatt et Hepa1.6) (Serra *et al.*, 1996 ; Serra *et al.*, sous presse). D'une manière surprenante, cette séquence promotrice n'a pas été capable d'induire une activité luciférase dans nos conditions de lipofection (Figure 1b).



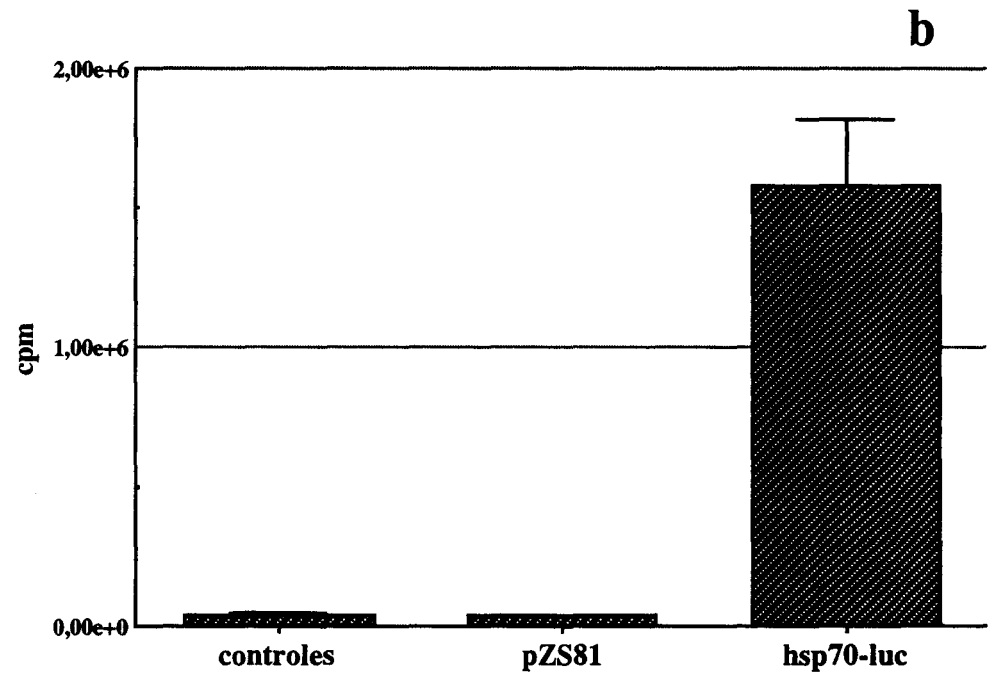


Figure 1 : Expression de la luciférase sous le contrôle de différents promoteurs hétérologues aprés lipofection dans les cellules Bge:

a) hsp 70, promoteur de la protéine de choc thermique de 70 kDa de *D. melanogaster*
CMV, promoteur des gènes très précoces de cytomégalovirus
SV40, promoteur précoce du virus simien (Stratagène)

b) pZS81, promoteur proximal (-278) de la Sm28GST

L'absence de facteurs de transcription (NF-Y et Jun/Fos) se liant respectivement aux séquences CCAAT et AP1 reste possible mais peu envisageable compte-tenu du caractère ubiquitaire de ces facteurs. On peut aussi supposer que ces facteurs soient différents de ceux du parasite et des mammifères et incapables de reconnaître ces séquences dans le promoteur.

Le promoteur hsp70 de *D. melanogaster* est fonctionnel dans les cellules d'un grand nombre d'autres espèces invertébrés dont des mollusques grâce au caractère ubiquitaire de cette protéine. Ainsi, le promoteur hsp70 de *D. melanogaster* a permis d'obtenir une expression significative du gène rapporteur dans les embryons du moustique, *A. gambiae* (Mialhe et Miller, 1994), dans les embryons d'artémie (Gendreau *et al.*, 1995), dans des primocultures de coeur d'huitres (Boulo *et al.*, 1996) et dans les embryons de bivalves (Cadoret *et al.*, 1996). Cependant, l'obtention du promoteur Hsp70 homologue inductible présente un intérêt capital pour la suite des études car il sera vraisemblablement plus actif.

La protéine Hsp70 de *B. glabrata* est actuellement étudiée, la synthèse de cette protéine est induite par un choc thermique chez le mollusque. L'ADNc a été cloné et la caractérisation du promoteur du gène est actuellement en cours (T. P. Yoshino, communication personnelle). En plus de ce promoteur inductible, il serait intéressant de pouvoir disposer d'un promoteur constitutif et nous avons choisi de rechercher le promoteur de l'actine non-musculaire de *B. glabrata* (voir V, chapitre II).

Parasitol Res (1996) 82:574–576 © Springer-Verlag 1996

SHORT COMMUNICATION

Vinca Lardans · Viviane Boulo · Pascal Duclermortier
Esteban Serra · Eric Mialhe · André Capron
Colette Dissous

DNA transfer in a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line by DOTAP lipofection

Received: 3 January, 1996 / Accepted: 15 February, 1996

Schistosomes have a worldwide distribution and represent a major cause of mortality in endemic areas. The transmission of these trematode parasites depends on the presence of snail intermediate hosts that assure intense asexual multiplication of larval forms. Although it is now well accepted that eradication of schistosomiasis could be obtained by the combination of several measures such as sanitary education, chemotherapy, and vaccination, the control of invertebrate vector populations remains a priority. Chemical, physical, and biological tools have been used without achieving the expected success. Very recently, much attention has been given to the characterization of mollusc genes involved in resistance to trematode infection and their possible utilization for the development of resistant snails by transgenesis.

The genetics of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host for the medically important schistosome *Schistosoma mansoni*, is better characterized than that of any other mollusc host of human schistosomes. The availability of snail stocks displaying resistance or susceptible phenotypes is suitable for investigation of the genetic determinants of host-parasite compatibility (Richards et al. 1992). Moreover, efforts actually made to identify hemocyte receptors and/or hemolymph components especially involved in sporocyst-hemocyte interactions would presumably give access in the near future to the genes implicated in mollusc-trematode compatibility.

A cell line has been derived from *B. glabrata* embryos (Bge) by Hansen (1976a). These cells share some features with snail hemocytes in that they emit filopodia and can adhere to and encapsulate *S. mansoni* sporocysts in vitro (Hansen 1976b). Moreover, in vitro coculture experiments have shown that Bge cells can provide good environmental conditions for the development of mother sporocysts to the daughter form (Yoshino and Laursen 1995). For these reasons, by means of their transformation by genes of interest, Bge cells likely constitute a suitable tool for study of the role of mollusc factors involved in parasite amplification and maturation as well as resistance/susceptibility to parasites.

As a preliminary approach to Bge cell transformation, we have explored the possibilities of transiently transfecting the cell line by plasmids containing heterologous promoters and reporter genes. To our knowledge, no homologous promoter has thus far been characterized. Moreover, the quantity of genes cloned from mollusc species remains very limited. Different methods have been developed to transfect DNA into eukaryotic cells, but to our knowledge, none of them has been applied to Bge cells. First attempts using the commonly applied DNA transfer by coprecipitation of DNA with calcium phosphate (Graham and Van der Eb 1973) did not allow us to detect significant levels of reporter-gene expression in Bge cells, probably due to cellular cytotoxicity or inefficiency in DNA delivery. The results presented in this paper indicate that cationic liposome-mediated transfection or lipofection (Felgner et al. 1987) could represent a technique suitable for DNA transfer in Bge cells, and the experiments we performed to define optimal conditions for transfection are described.

N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate, or DOTAP (Boehringer), was used as a transfection reagent in all experiments. Two plasmid constructs were used. pCMV-L (Gibbs et al. 1994) was a pUC19-derived plasmid into which the cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter and the firefly luciferase gene (De Wet et al. 1987) coding region were inserted. The plasmid pDr-luc contained the luciferase gene under the control of the heat-shock-responsive element from the *Drosophila* heat-shock protein (hsp70) gene (Nguyen, Pasteur Institute, Paris, France).

V. Lardans (✉) · P. Duclermortier · E. Serra · C. Dissous
A. Capron
Pasteur Institute CIBP, 1 rue du Pr Calmette B.P. 245,
F-59019 Lille Cedex, France
fax: 20 87 78 88

V. Boulo
IFREMER-CNRS-UM2 UMR9947 DRIM,
2 pl. E.Bataillon C.P.80, F-34095 Montpellier Cedex 5, France

E. Mialhe
CENAIM Campus Politecnico,
P.O.Box 4519, Guayaquil, Ecuador

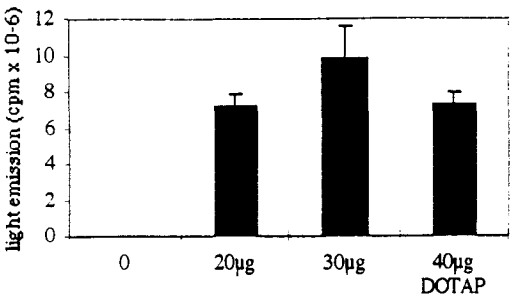


Fig. 1 Transfection effeciency of pCMV-L using increasing amounts of DOTAP and a constant DNA/DOTAP ratio of 0.2. Results express the levels of light emission measured at 48 h after lipofection. Data indicate mean values ± SEM for quadriplicate determinations

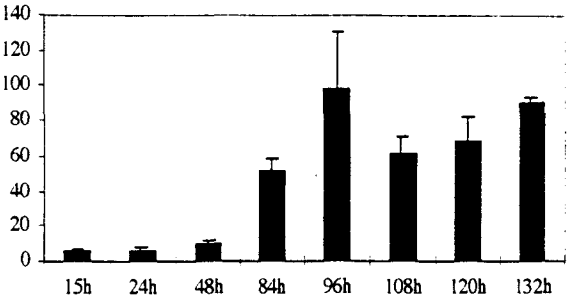


Fig. 2 Time-course analysis of the luciferase expression measured following transfection with pCMV-L with a 4/20 DNA/DOTAP ratio. Results are expressed as mean (± SEM) cpm ratios between assay and control values as determined from quadruplicate determinations

Bge cells were cultured in four-well plates (Nunclon) in the Bge culture medium defined by Hansen (1976a), then transfected according to the following procedure except for control wells, from which DOTAP was omitted. Plasmid DNA was mixed with DOTAP in a final volume of 200 µl of culture medium before being added to Bge cells (10^6 in 300 µl of medium). Cells were incubated for 1 h on a rocking plate at room temperature, then for 5 h in an incubator at 26°C. Then, 800 µl of fresh culture medium containing 10% fetal calf serum was added to each well and cells were further incubated for different periods. Cells were recovered in Eppendorf tubes, washed twice in 0.3 × HBSS (Gibco), and processed for luciferase activity detection using the Promega kit (E1500) according to the manufacturer's procedure. Photon emission was measured using a scintillation counter (Beckman) set on the single-photon "out of coincidence" mode.

The results presented in Fig. 1 show that DOTAP was an efficient reagent for the introduction of foreign DNA into Bge cells, allowing the detection of relatively high levels of light emission at 48 h after lipofection by pCMV-L. They also indicate that the CMV early promoter could drive the expression of genes in Bge cells and that luciferase was a suitable reporter gene for this cell line. In these experiments, increasing amounts of DOTAP (from 20 to 40 µg) were used in a constant DNA/DOTAP ratio of 0.2. The data demonstrated that 20 µg of DOTAP was sufficient under our conditions to obtain optimal transfection, since no significant difference in light emission was observed when higher amounts of DOTAP were used. Several experiments performed with 10 µg of DOTAP did not result in significant reporter-gene expression (data not shown). Such results are in agreement with the supplier's information for HeLa cells and the results obtained by V. Boulo (unpublished observation) for lipofection of primary cultures of oyster-heart cells. Lipofection using 20 µg of DOTAP did not alter significantly the viability of Bge cells, which were shown to retain perfectly their adherence capacities. In these experiments, no indication about the percentage of transfected cells could be obtained since the luciferase activity was not adequate for cytodetection. Additionally, cytodetection attempts using pCMV-β galactosidase constructs under similar lipofection conditions were unsuccessful (data not shown), strongly suggesting that this enzyme could not be actively expressed in the Bge cell background.

A second series of experiments was undertaken to evaluate the time course of luciferase expression in transfected cells. Figure 2 shows that enzyme activity was maximal at 96 h after lipofection and remained relatively high for longer periods. A significant level of luciferase activity was detected in Bge cells transfected for at least 5 days, suggesting that plasmid constructs persisted in Bge cells at this point. These data could be supported by results obtained in independent experiments using the plasmid pHerKS (Sarkar, CAB, College Park, USA), in which the bacteriological titration of plasmid DNA extracted from transfected Bge cells allowed us to show the presence of more than one plasmid copy per cell following at least 48 h of posttransfection culture. The great delay in the time (as compared with commonly used mammalian cells) necessary to obtain maximal luciferase expression was compatible with the period of population doubling reported for the Bge cell line (Hansen 1976a; Bayne et al. 1977). The efficiency of nuclear uptake of exogenous DNA has been correlated with the cell-cycle stage of the target cells (Nicolau and Sene 1982).

In a third part of the study, the efficiency of a temperature-inducible heterologous promoter was tested using pDr-luc. Hsp70 promoters are ubiquitous, and it has been shown that the *Drosophila* hsp70 promoter is functional in *Anopheles gambiae* (Miller et al. 1987), in mouse cells (Corces et al. 1981), in *Xenopus* oocytes (Voellmy and Rungger 1982), in sea urchin (McMahon et al. 1984), in *Artemia* embryos (Gendreau et al. 1995), in oyster-heart primary cell cultures (Boulo et al., submitted for publication) and in bivalve embryos (Cadoret et al., submitted for publication). Figure 3 shows that this promoter was also functional in Bge cells and drove significantly high levels of luciferase expression after a 90-min heat shock at 40°C.

In conclusion, our results indicate that DOTAP-mediated lipofection is a suitable technique for Bge cell trans-

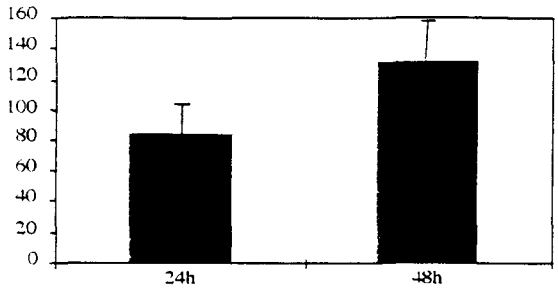


Fig. 3 Luciferase expression under the control of the *Drosophila* hsp 70 promoter. A 90-min heat shock was performed at 40°C and 3 h after lipofection. Luciferase activity was detected at 24 or 48 h following transfection. Data represent mean (± SD) cpm ratios between assay and control values as determined from quadruplicate determinations

formation. The very low level of photon emission seen in control assays demonstrated that endogenous luciferase activity was almost absent from Bge cells, whereas quantification of light emission was rapid and easy to perform in transfected cells, the luciferase activity appearing non-toxic for Bge cells. It could also be demonstrated that both the constitutive CMV and the inducible hsp70 promoters were functional in Bge cells. As our results strongly suggested that transfected cells were capable of retaining plasmid DNA for at least 5 days, such a technique would probably find some applications in the study of in vitro interactions between snail cells and schistosomes, either by modulating in cells the expression of genes known to be involved in host-parasite relationships or by expressing heterologous factors that might influence these interactions. One could as well investigate the in vivo transfer of modified cells that, following injection into the general body cavity, could colonize different organs of the mollusc.

Finally, one could also imagine further in vivo applications of liposomes for the development of resistant strains of molluscs, such as their use as carriers for gene transfer and their specific targeting (Nicolau et al. 1983) to mollusc reproductive organs. Indeed, snail genetic transformation would hardly be managable in terms of the localization of gonads and the real fragility of snail shell. Moreover, some attempts made at transient transfection of snail embryos have been unsuccessful due to the composition of the egg mass, which considerably hampered the use of classic techniques such as biolistic and microinjection.

References

Bayne CJ, Chao F, Salvatore PC (1977) Low temperature preservation of the *Biomphalaria glabrata* cell line. J Invertebr Pathol 29:332–337

Corces V, Pellicier A, Axel R, Meselson M (1981) Integration, transcription and control of a *Drosophila* heat shock gene in mouse cells. Proc Natl Acad Sci USA 78:7038–7042

De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. Mol Cell Biol 2:725–737

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA 84:7413–7417

Gendreau S, Lardans V, Cadoret JP, Mialhe E (1995) Transient expression of a luciferase reporter gene after ballistic introduction into *Artemia franciscana* (Crustacea) embryos. Aquaculture 133: 199–205

Gibbs PDL, Peek A, Thorgaard G (1994) An in vivo screen for the luciferase transgene in zebrafish. Mol Mar Biol Biotech 6: 307–316

Graham FL, Van der Eb AJ (1973) A new technique for assay of infectivity of human adenovirus IV DNA. Virology 52:456

Hansen EL (1976a) A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics. In: Maramorosch K (ed) Invertebrate tissue culture: research applications. Academic Press, New York, pp 75–97

Hansen EL (1976b) Application of tissue culture of pulmonate snail to the culture of larval *Schistosoma mansoni*. In: Kurstak E, Maramorosch K (eds) Invertebrate tissue culture: applications in medicine and biology and agriculture. Academic Press, New York, pp 87–97

McMahon AP, Novack TJ, Britten RJ, Davidson EH (1984) Inducible expression of a cloned heat shock fusion gene in sea urchin embryos. Proc Natl Acad Sci USA 81:7490–7494

Miller LH, Sakai RK, Romans P, Gwadz RW, Kantoff P, Coon G (1987) Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. Science 237:779–781

Nicolau C, Sene C (1982) Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells. Dependence of the transfer efficiency upon the type of liposomes used and the host cell cycle stage. Biochim Biophys Acta 721:185–190

Nicolau C, Soriano P, Le Pape A, Londos-Gagliardi D, Legrand A, Grosse E (1983) Liposomes as carriers for gene transfer in vivo. Biol Cell 47:121–129

Richards CS, Knight M, Lewis FA (1992) Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. Parasitol Today 8:171–174

Voellmy R, Rungger D (1982) Transcription of a *Drosophila* heat shock gene in mouse cells. Proc Natl Acad Sci USA 78: 1776–1780

Yoshino T, Laursen JR (1995) Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. J Parasitol 81:714–722

III. LES TRANSPOSONS

Les propriétés de mobilité des transposons ont été exploitées pour le développement de systèmes efficaces de vectorisation de gènes.

L'élément P de *D. melanogaster* en particulier, a permis d'approfondir l'étude de la biologie de la drosophile (Rubin et Spradling, 1982). Comme il a été présenté précédemment, les éléments P sont mobilisables dans le genre *Drosophila* ainsi que chez d'autres Drosophilidae mais ils ont une restriction fonctionnelle à cette famille (O'Brochta et Handler, 1988).

D'autres éléments transposables présentant un spectre d'hôte moins restrictif ont été identifiés. L'élément transposable hobo de *D. melanogaster* , qui a été utilisé comme vecteur de transformation génétique *de D. melanogaster* (Blackman *et al.*, 1989) est mobilisable chez les non Drosophilidae. Chez *M. domestica* , il est mobilisable en absence d'expression de sa propre transposase et cette observation a ainsi permis d'identifier un élément de la famille hAT chez cet insecte : l'élément Hermes. Hermes est capable de mobiliser hobo (Atkinson *et al.*, 1993).

L'élément mariner quand à lui a été identifié chez un grand nombre d'espèces, et globalement les séquences de transposases présentent des régions suffisamment conservées et largement utilisées pour dériver des oligonucléotides applicables à la recherche par PCR de cet élément dans diverses espèces.

Pourt transformer à l'aide d'un transposon, il est nécessaire d'avoir une transposase active qui peut être homologue ou hétérologue comme dans le cas de hobo et Hermes.

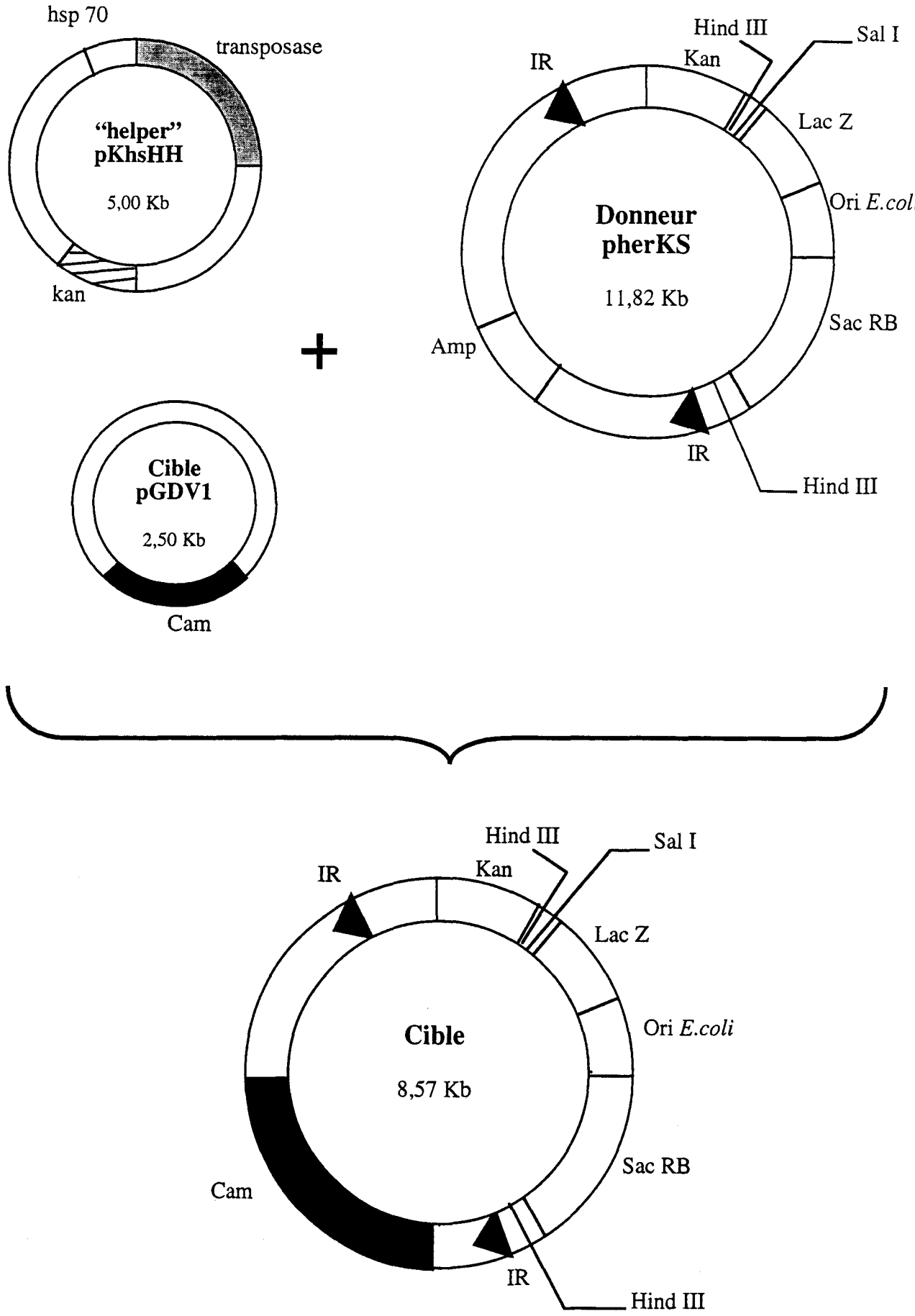
Dans le cas des cellules Bge, aucun transposon n'étant connu, nous avons tout d'abord tenté de rechercher l'activité de 2 transposases hétérologues dans l'environnement cellulaire du mollusque.

Pour cela, nous avons utilisé les tests d'excision -intégration

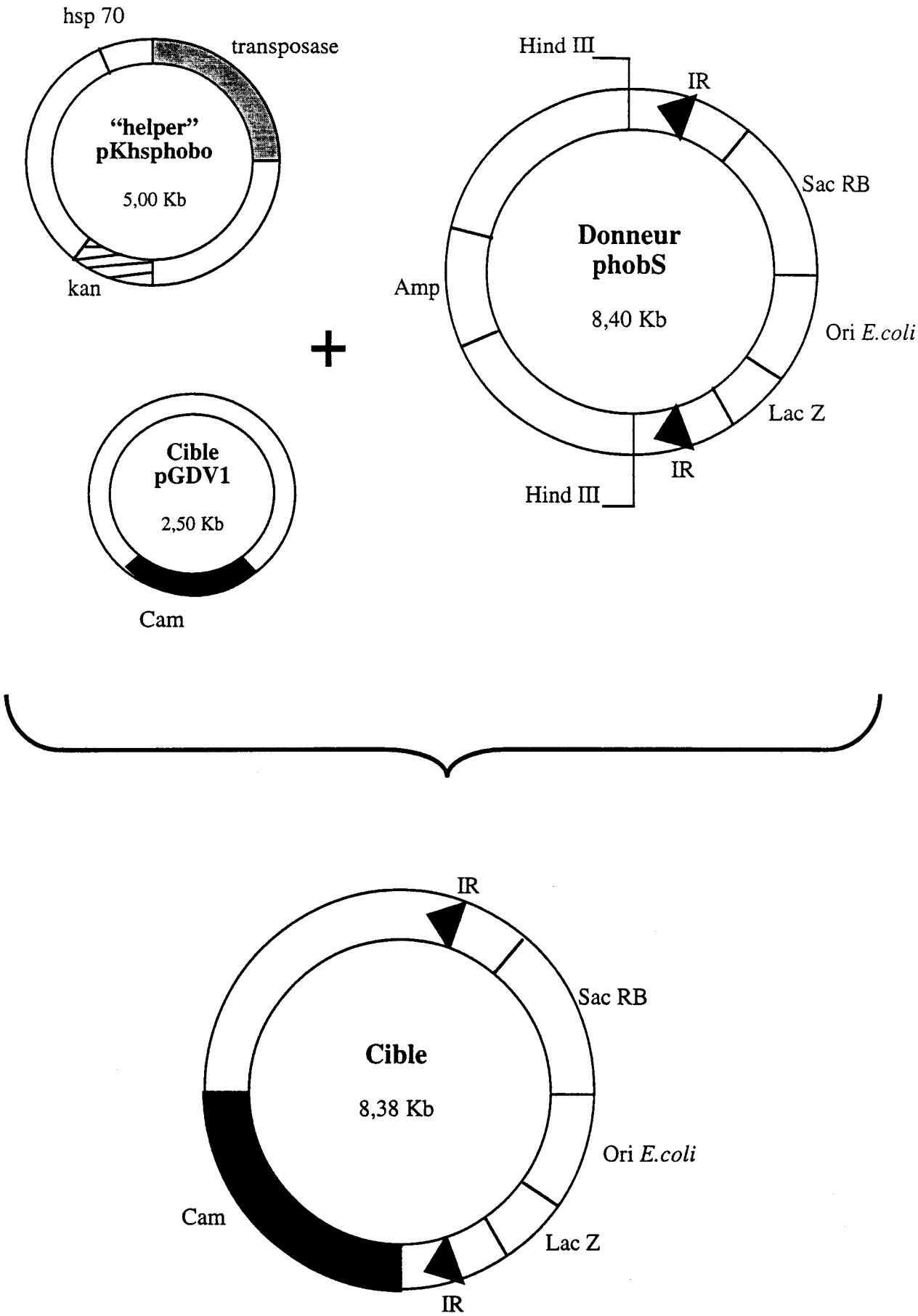
A. Test d'excision-intégration :

1. Principe :

Le test mis au point par O'Brochta et al (1994), permet d'estimer la capacité des transposons homologues ou hétérologues à se mobiliser dans un environnement cellulaire choisi. Le principe est basé sur un système de trois plasmides :



Test d'excision-intégration Hermes : carte des 3 plasmides composant le système d'excision-intégration dérivé de l'élément Hermes.



Test d'excision-intégration hobo : carte des 3 plasmides composant le système d'excision-intégration dérivé de l'élément hobo.

- le plasmide « helper » contient la séquence codante de la transposase sous le contrôle du promoteur hsp 70 de *D. melanogaster*,

- le plasmide cible est un plasmide de *Bacillus subtilis* qui ne possède pas d'origine de réplication bactérienne et qui porte la résistance au chloramphénicol (Cam),

- le plasmide donneur porte, entre les deux IRs de l'élément transposable une séquence rapporteur.

Cette séquence rapporteur contient :

- dans le test de l'élément Hermès : le gène de résistance à la kanamycine (Kan), le gène de la β-galactosidase (lac Z), une origine de réplication bactérienne (Ori *E.coli*) et le gène sac RB. Ce dernier code pour une levansucrase qui lorsqu'elle est exprimée dans *E. coli* en présence de sucrose à 10 %, provoque la lyse cellulaire (Gay, 1985).

- dans le test de l'élément hobo : la séquence rapporteur est la même que pour le test Hermès à l'exception du gène de résistance à la kanamycine qui n'est pas présent.

Si la transposase est exprimée, elle va reconnaître les IRs présentes sur le plasmide donneur, exciser la séquence " rapporteur " et l'intégrer entre autre dans le plasmide cible. Le plasmide cible intégrera ainsi une origine de réplication bactérienne dont il était dépourvu. Après transformation des bactéries, seuls les plasmides portant cette origine de réplication pourront se multiplier dans *E.coli.*

Les trois plasmides sont introduits simultanément dans les cellules et les évènements de transposition sont sélectionnés sur des critères microbiologiques de résistance aux antibiotiques avant d'être finement analysés par séquençage au niveau des duplications du site cible d'intégration.

2. Protocole :

Les cellules Bge, 5. 10^5 par puits, ont été mises en culture dans des plaques de 24 puits (Costar). Le mélange des trois plasmides cible, donneur et helper est introduit dans les cellules par lipofection. Les lipofections sont réalisées avec 5 µg de plasmide cible, 2,5 µg de plasmide helper et 2,5 µg de plasmide donneur par puits dans un rapport ADN/agent lipofectant de 10/50 selon le protocole précédemment établi (Lardans *et al.*, 1996).

A différentes périodes après le choc thermique, les cellules sont reprises, lavées et lysées (Hirt, 1967) afin d'extraire l'ADN plasmidique. L'ADN plasmidique est utilisé pour transformer par électroporation des cellules compétentes (DH10B).

Les bactéries sont ensuite étalées sur milieux sélectifs :

- X-gal (40 µg/ml), Amp (100 µg/ml), Kan (25 µg/ml) pour titrer le plasmide donneur
- X-gal, Kan, Cam (10 µg/ml) pour visualiser les évènements de transposition.

Les colonies bleues sont soumises à un test de contre-sélection approprié, puis les plasmides sont analysés pour leur profil de restriction afin de déterminer si un évènement de transposition a eu lieu.

Deux séries de lipofections ont été réalisées en utilisant le test du transposon Hermes et deux agents lipofectants : la lipofectine™ et le DOTAP. Les transfections ont été réalisées pendant 16 h. Le choc thermique a eu lieu pendant 90 min à 40°C. Les cellules ont été reprises 3, 20 et 24 h après le choc thermique pour la lyse et l'extraction des plasmides.

Après transformation des bactéries compétentes et sélection sur milieu Kan, Cam, X-gal, des colonies bleues ont été obtenues. Elles subissent alors la contre-sélection sur différents milieux :

- milieu Amp, X-gal
- milieu Kan, sucrose, X-gal,
- milieu Kan, X-gal
- milieu Cam, X-gal

Si les colonies possèdent un plasmide qui a subi un évènement précis de transposition, elles meurent en présence de sucrose, sont sensibles à l'ampicilline, résistantes au chloramphénicol et à la kanamycine (sauf pour le test hobo) et sont bleues.

3. Résultats

Sur les 25 colonies bleues obtenues après sélection de 5. 10^7 plasmides donneurs transfectés dans les cellules Bge, aucune colonie bleue n'a donné après contre-sélection les résultats attendus pour une transposition précise. Bien que les colonies étaient tuées en présence de sucrose, résistantes à la kanamycine elles étaient également résistantes à l'ampicilline suggérant plutôt une recombinaison entre plasmide donneur et plasmide cible.

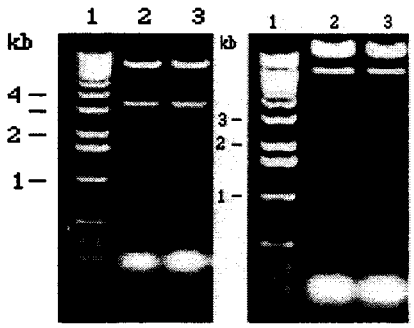
Des digestions ont été réalisées sur les plasmides issus de deux colonies bleues qui ont confirmé que les profils phénotypiquess des colonies correspondaient à des recombinaisons ayant eu lieu entre le plasmide donneur et le plasmide cible.

Les plasmides ont été soumis à des digestions enzymatiques par Sal I ou par Hind III.

Sal I n'a pas digéré les plasmides et Hind III a libéré deux fragments de grande taille. Le fragment Hind III du transposon semble bien présent (fragment de 3,5 kb) Par contre, la taille du second fragment est largement supérieure à la taille attendue (au moins 9 kb au lieu de 5 kb) s'il s'était produit une intégration dans le pGDV1 (voir photos des gels) Il s'agit donc probablement d'évènements de recombinaison entre les plasmides donneur et cible.

Il convient de remarquer à ce niveau la fiabilité du système développé par O'Brochta *et al*, puisque la contre-sélection permet à elle seule d'éliminer tout phénomène de recombinaison non recherchée.

La même série d'expériences a été réalisée en parallèle avec le test de l'élément hobo. Dans ce cas, un nombre équivalent de plasmides transfectés a été analysé (3.10^7) mais sans pouvoir mettre en évidence d'évènement de transposition. Aucune colonie bleue n'a été obtenue.



Profils de restriction des plasmides contenus dans les deux colonies bleues : Dans le gel de gauche figurent les digestions des deux plasmides (2) et (3) par Hind III qui libèrent un fragment de 3,5 kb environ et de 9 kb au moins, dans le gel de droite les plasmides ne sont pas coupés après digestion par Sal I. Le marqueur de poids moléculaire est le 1 kb DNA ladder, piste (1).

Dans ces expériences, la titration du plasmide donneur issu des cellules Bge a permis de déterminer que 48 h après le choc thermique (soit 64 h après la lipofection) le plasmide était toujours présent dans les cellules (au moins une copie par cellule).

Il est possible d'exclure la possibilité que ces plasmides proviennent d'une adsorption à la surface des cellules. Dans les contrôles qui correspondent aux puits où le mélange des trois plasmides ont été ajoutés sans agent lipofectant, la titration du plasmide donneur n'a permis de détecter aucune copie de ce plasmide, indiquant que le plasmide n'a pas pénétré les cellules en absence d'agent lipofectant et que les lavages des cellules ont éliminé toute trace résiduelle de plasmide.

La transposition de l'élément hobo se produit une fois tous les 52 000 plasmides donneurs titrés *chez D. melanogaster*, cette fréquence chute à 1/200 000 chez *M. domestica* et 1/540 000 chez *B. tryoni*. Les variations observées dans les fréquences de transposition sont inexpliquées mais elles peuvent résulter de différences dans la concentration de plasmides introduits dans les embryons. Une autre hypothèse peut venir d'une variabilité d'efficacité du promoteur hsp70 de *D. melanogaster* à induire la production de transposase dans ces insectes. Il faut également envisager la présence de facteurs cellulaires capables d'interagir avec le système de transposition hobo.

Dans la cellule Bge, 3.10^7 plasmides donneurs ont été titrés sans obtenir un seul évènement de transposition. La titration du plasmide donneur autorise à penser que l'introduction de ce plasmide dans les cellules Bge par la lipofection a bien eu lieu. Cependant, elle ne permet pas d'affirmer que les trois plasmides ont pu être introduits dans les cellules. Le plasmide donneur étant celui qui a la plus grande taille (11,8 kb pour Hermes et 8,4 kb pour hobo) on peut supposer

que les deux autres plasmides cible et « helper », de plus petite taille ont pénétré les cellules par l'intermédiaire des liposomes avec une efficacité au moins aussi importante. Les colonies bleues obtenues après sélection, révélaient la présence de tous les marqueurs de résistance aux antibiotiques (Cam, Kan, Amp) du système. Un événement de recombinaison entre plasmide donneur et plasmide cible est plus vraisemblable qu'une double transformation par l'un et l'autre plasmide puisque le plasmide cible ne possède pas d'origine de réplication bactérienne.

De plus, il convient de noter que contrairement à la microinjection dans les embryons d'insectes où 2 μg du mélange des trois plasmides sont introduits par individu, la quantité de plasmides pénétrant dans les cellules Bge est inconnue. Dans toutes les expériences, la quantité de cellules transfectées par lipofection n'a jamais pu être estimée du fait que des gènes rapporteurs comme la β-galactosidase et la β-glucuronidase dont l'expression est visualisable en microscopie ne semblent pas fonctionnels dans les cellules Bge.

Il a été démontré que le promoteur hsp70 de *D. melanogaster* est fonctionnel dans les cellules Bge (Lardans *et al.*, 1996) et induit après choc thermique la production de niveaux significatifs de luciférase.

Le nombre de plasmides donneur titrés et l'absence d'évènements de recombinaison permettent de supposer que même dans un cas optimal (les trois plasmides ont été introduits dans les cellules, la transposase est exprimée) la fréquence de transposition des éléments Hermes et hobo (hétérologue) est tellement faible dans l'environnement cellulaire des Bge qu'ils ne constitueraient pas des candidats potentiels de transformation des cellules Bge.

Il fallait donc procéder à la recherche de transposons homologues.

B. Recherche de transposons chez *B. glabrata*.

La recherche de transposon chez *B. glabrata* a été entreprise à l'aide d'oligonucléotides dégénérés ou non, déduits des régions conservées des transposases de divers invertébrés (*C. elegans, D. mauritiana, Dugesia tigrina*).

Les oligonucléotides nous ont été fournis par Sophie Tarès (INRA, Sofia-Antipolis).

Les oligonucléotides complémentaires de la séquence hobo sont les suivants (DeVault et Narang, 1994) :

Hobo1	5'-GGACNGTIGATATGTGG-3' (sens)	AA 228-234
Hobo2	5'-GGXGTGCTATCCCAIGGIGT-3' (antisens)	AA 368-373

Les oligonucléotides dérivés de mariner sont les suivants :

P5	5'-TGGGTGCCACATGAGTGG-3' (sens)	AA 119-124
P3	5'-TGGGGCCAGGTCTGGTGAGT-3' (antisens)	AA 276-282
168F	5'-TGGCCATCGTTCTCAATGAC-3' (sens)	AA 168-174
276F	5'-GGNGCNARRTCNGGNSWRTA-3' (antisens)	AA 276-282
2F	5'-ACNDNNGAYGARAMRTGG-3' (sens)	AA 170-175

Y = C ou T ; R = A ou G ; N = A, C, G ou T ; M = A ou C ; W = A ou T ; S = G ou C

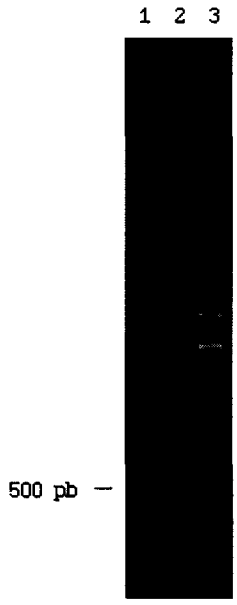
Les PCRs ont été réalisées à partir d'ADN génomique de *B. glabrata*, de cellules Bge ou de *S. mansoni*. Les profils des produits PCR obtenus à partir des matrices d'ADN de *B. glabrata* et de Bge sont semblables quelques soient les amorces utilisées. Chaque amorce a été testée séparément afin de procéder à une première élimination des produits PCR qui correspondraient à une hybridation de l'amorce sur les deux brins de l'ADN.

Parmi les différents produits PCR obtenus puis séquencés, seul le produit d'amplification des amorces P3 et P5 a donné un résultat encourageant.

Les PCRs utilisant les oligonucléotides P3 et P5 ont été réalisées de la façon suivante : les réactions d'amplification ont été effectuées dans un volume total de 50 µl avec 20 pmol de chaque amorce, 0,2 mM de dNTPs, tampon 1X, $MgCl_2$, Taq Goldstar (Promega) 0,5 ml (5U/ml). Trois concentrations de $MgCl_2$ ont été testées (2, 4 et 6 mM) ainsi que 4 températures différentes d'hybridation des amorces (38, 45, 52 et 56 °C). Les PCRs ont été réalisées sur l'ADN génomique de *B. glabrata*.

Parallèlement, les contrôles ont été fait en absence d'ADN génomique.

Le programme PCR est le suivant : après une étape de dénaturation à 94 °C, les 35 cycles sont une dénaturation de 94 °C à 45 s, une hybridation des amorces aux différentes températures pendant 45 s et une élongation de 45 s à 72 °C. L'élongation finale a lieu pendant 2 min à 72 °C.



Gel d'agarose à 1 % des produits PCR P3-P5 : température d'hybridation des amorces = 56°C et en présence de différentes concentrations de $MgCl_2$: 2 mM (1), 4 mM (2), 6 mM (3).

Une bande unique de 500 pb environ a été obtenue aprés amplification avec les amorces P3 et P5 à une température d'hybridation des amorces de 56 °C. Cette température constitute la température maximale d'hybridation de l'oligonucléotide P3 et les deux amorces utilisées n'étant pas dégénérées, ce résultat suggérait une amplification spécifique. Le fragment de 500 pb a été sous-cloné en vecteur pTag et séquencé entièrement dans les deux sens. Plusieurs clones ont été séquencés afin de déterminer la possible amplification par ces amorces d'un fragment de séquence différente mais de même taille.

Les deux amorces ont bien été retrouvées de part et d'autre du fragment. Compte-tenu de la grande dégénérescence des transposons dans les génomes (beaucoup de copies sont en fait inactives et mutées), l'homologie avec les séquences des transposases est très difficile à mettre en évidence (P. Abad, communication personnelle). Il convient lors de l'alignement d'analyser en même temps les trois cadres de lecture afin de considérer des décalages du cadre de lecture, les codons stop et les délétions ou les insertions ayant pu intervenir dans une séquence de transposase inactive (Robertson, 1993).

5' *TGGGTGCCACATGAGTGG*GATAGGGGAAAAATCCTTGGATAAAAGGGTTAGCTGTGAATACCAC

ATAAACAGCTGCGGACCAACTGGTTTGCAGTCTTGGAGGATGAGTATTCCAGTGGTTAGAATATTT

ACTAAAAAACATCTCAGAAATCCAGGAAAATGATTGCAAAAAGCGATTTAGGGCACTCTAACTCTA

AACCCTGGTAGATGAAGCTCACTAGCTATGGATAGCAGTTCATCTAGGAGAGAAAACTCCAAAAAT

AAACAACTGCTGCCTTGCAGATGATCTTGGATGATCAAAGGCTATGGGAGCAAATCCAAAAAGAAA

AGCAGACTGAAGTTGGAGTCAATTATCTCCTGGCATTGACAGGCAACCTCATCCTCAACTGTCACT

TAAATCTTGCCTTTAAAAAAAGTGTATCTGTATAGATAGTTTTGTCTTTTTAAATTTCTGTAAATT

GTTAGTAGGTAATAGACCGGAAAACCTTTTATTATAACATTACTACCATT*TGAGTGGTCTGGACCG*

GGGT 3'

Séquence nucléotidique du fragment PCR provenant de l'amplification de l'ADN génomique de B. glabrata par les deux amorces P3 et P5 : La séquence possède 492 pb, l'analyse des trois cadres de lecture ne révèle pas la présence de cadre ouvert de lecture. Les amorces sont représentées en italique.

```
B.g    IG-EKS-LDKRVSCEIP--HKQLRL-VC-SL-GR-MSIPWV-RIFTSQ-K
       I   K. LDK:V: E:   HKQ RL .C SL :R .: P.: RI T.: K
plan   INKVKK-LDKWVPHELKDEHKQQRLDACLSLLSRNKADPFLHRIVTCDEK
d.ma   MGKIQK-VGRWVPHELNERQMERRKNTCEILLSRYKRKSFLHRIVTGDEK
h.ce   IGKVKK-LE WVPHELSESNLQTRVDCCVTLLNRHNNEGILNRIITCDEK
d.er   AGYKKK-LDVWVPHDLTQKNLLDRINACDMLLKRNELDPFLKRMVTGDEK
c.el   LGFTSK-LGTWVPHELSASQKLTRVNVCTQLLTFRRKFDWLNNLVTGDEK
c.elz  TGKIEK-FGQLVPHKLSDSQKNCFV LSLSLLTRKRTTDWVKDIITGNDK
c.ce                   NDAQKERRLEACLSLLSRNKTEPFLNRIVTCDEK
cons    GK  K-L  WVPHEL   QK  R D C  LL R      L RIVT DEK
```

Alignement manuel d'une partie de la séquence du produit PCR avec les séquences de transposases d'autres espèces : Les tirets correspondent à des espaces insérés dans les séquences pour favoriser l'alignement ; des décalage du cadre de lecture ont également du être introduits. plan : mariner1 de *Dugesia tigrina* (plathelminthe, Garcia-Fernandez, 1995), d.ma : Mos1 de *D. mauritiana* (Medhora et al, 1991), h.ce : mariner-like element de *Hyalophora cecropia* (Lidholm *et al.*, 1991), d.er : *D. erecta* Genbank Accession number U08094, c.el : consensus de séquences de 3 éléments de *C. elegans* d'après Sedensky *et al.*, (1994), c.elz : *C. elegans* ZK370 Genbank Accession number M98552, c.ce : *Chromogaster cerasi* (Robertson et McLeod, 1993), cons : consensus établi selon Robertson (1995).

D'après la faible homologie (41%) qui a cependant peu de chance d'être fortuite, cette séquence pourrait correspondre à un vestige de transposase suggérant que cet élément a existé chez *B. glabrata* et qu'il subsiste peut être dans le génome une ou plusieurs copies actives ou inactives de l'élement. Ceci pourrait être mis en évidence par l'utilisation d'un test d'excision intégration dérivé de l'élément mariner. En effet, ce test a permis la découverte de certains éléments transposables suite à la mobilisation de la séquence rapporteur en absence d'addition du plasmide helper codant pour la transposase. De plus la séquence obtenue de *B. glabrata* présente davantage d'homologie avec la séquence de la planaire. La transmission horizontale des transposons est un phénomène bien connu (Capy *et al.*, 1994). Il est tentant de spéculer sur la présence de cette séquence de plathelminthe chez le mollusque et imaginer qu'elle soit l'objet d'un transfert horizontal entre *B. glabrata* et le parasite *S. mansoni*. En effet, la souche de mollusques élevée au laboratoire fut à l'origine prélevée sur le terrain en zone d'endémie. Une telle séquence chez *S. mansoni* devra être recherchée.

Il pourrait aussi être envisagé d'utiliser cette séquence afin de chercher d'autres copies de l'élément dans la banque génomique par exemple. Des oligonucléotides soit dégénérés soit dérivés des régions les plus conservées par rapport au consensus pourraient également être utilisés.

IV. LA VECTORISATION RETROVIRALE

Les vecteurs rétroviraux constituent également un outil de choix pour la transformation génétique du fait de leur propriété de pénétration dans les cellules et d'intégration dans le génome de la cellule hôte. Cependant, la restriction de leur utilisation vient de la spécificité d'hôte de ces vecteurs. Elle réside dans la caractéristique qu'ont les cellules infectées par les particules de posséder à leur surface le récepteur liant la protéine d'enveloppe.

Il est possible de créer des particules virales exprimant des protéines d'enveloppe permettant un adressage spécifique à certains types cellulaires. Dans le cas de la transformation génétique de cellules ou d'organismes pour lesquels de tels systèmes récepteur-ligand ne sont pas connus, le spectre d'hôte du vecteur doit être le plus large possible.

Le développement récent de particules rétrovirales pseudotypées a permis de contourner cette difficulté. En effet, ces particules rétrovirales portent la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse. Cette protéine interagit de façon non spécifique avec les lipides membranaires et permet l'entrée du virus pseudotypé dans la cellule hôte. Ce système a prouvé son efficacité car *in vitro*, il a permis la transformation de cellules de xénope, de lépidoptère (Yee *et al.*, 1994) et du moustique *A. gambiae* (Matsubara *et al.*, 1996). *In vivo*, il a permis la transgénose des poissons, *Danio rerio* (Lin *et al.*, 1994) et du mollusque bivalve, *Mulinia lateralis* (Lu *et al.*, 1996).

Compte-tenu de sa grande efficacité, ce système a été retenu pour être testé sur les cellules de la lignée Bge.

A. Principe :

La production de particules rétrovirales a été obtenue à partir de cellules 293GPlux3. Les cellules 293 proviennent d'une lignée de cellules de rein d'embryon humain transformées par l'adénovirus de type 5 humain (ATCC CRL 1573). Dans le génome de ces cellules ont été intégrés les gènes gag et pol du rétrovirus murin MoMuLV (Burns *et al.*, 1993). Dans le système développé par J. Burns, les cellules d'empaquetage ne correspondent pas exactement à une lignée d'encapsidation, comme celle décrite précedemment et chez laquelle les cellules possèdent dans leur génome le gène codant pour la protéine d'enveloppe. En effet, avec le gène codant pour la protéine G de l'enveloppe du VSV il n'était pas possible de développer un tel systéme puisque cette protéine est hautement fusogénique. C'est donc l'ADN proviral (lux3) qui a été intégré dans le génome des cellules 293GP. L'ADN proviral contient entre les LTRs : le signal d'encapsidation, le gène de résistance à la néomycine, le promoteur hsp70 de *D. melanogaster* et le gène rapporteur codant pour la luciférase.

B. Production des particules rétrovirales :

Les cellules 293GPlux3 sont maintenues en culture dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO) contenant 10% de sérum de veau foetal (GIBCO) et en présence de pénicilline et de streptomycine (100 UI/ml) et de G418 (400 µg/ml, Sigma) à 37°C sous atmosphère à 5% de CO_2. L'ADN codant pour la glycoprotéine d'enveloppe est transfecté dans les cellules à 80% de confluence par précipitation au phosphate de calcium. Les transfections sont réalisées dans un volume final de 6 ml. Vingt µg d'ADN sont dilués dans du tampon 0,1X TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), le chlorure de calcium est ajouté (0,1 M). Sous agitation constante, 1 volume de 2X HBS1 (50 mM HEPES pH 7,12 ; 280 mM NaCl ; 1,5 mM $Na_2HPO_4.H_2O$). Au bout de 30 min d'incubation, le précipité est ajouté aux cellules pendant 6 h environ, puis le milieu est renouvelé par du milieu neuf. A 48, 72 et 96 heures après la transfection, les surnageants sont récupérés, filtrés sur 0,45 µm et concentrés par centrifugation à 4°C pendant 90 min à 25 000 rpm (Kontron, Centrikon T2060, rotor TST 28.38). Le surnageant est éliminé et chaque culot de particules est repris dans 100 µl de PBS pendant une nuit à 4°C. Les particules remises en suspension sont aliquotées et stockées à - 80°C.

C. Infection des cellules Bge :

Les cellules sont mises en culture dans des plaques de 24 puits (3. 10^5/puits). Dans un volume de 500 µl de milieu Bge, les particules virales sont ajoutées en présence de concentrations variables de polybrène (0, 2 ou 4 µg/ml). Les cellules sont ensuite maintenues en culture et le milieu est renouvelé tous les trois jours. Quand les cellules sont à confluence, elles sont reprises par pipetage et réparties dans deux puits.

Le dosage de la luciférase a été réalisé après un choc thermique de 90 min à 40°C comme décrit précédemment (Lardans *et al.*, 1996).

La présence d'ADN a été recherchée par PCR à partir d'ADN génomique extrait des cellules Bge 15 jours après l'infection. La PCR a été réalisée selon le protocole fourni par J. Burns avec deux amorces déduites des LTRs du provirus :

LTR1 : 5'-AGGACCTGAAATGACCCTGT-3'
LTR2 : 5'- ACGGGTAGTCAATCACTCAG-3'

La réaction PCR est effectuée à partir d'1 mg d'ADN dans les conditions suivantes 1,5 mM $MgCl_2$; 0,5 µM de chaque amorce ; 0,2 mM dNTPs. Le programme est composé de 35 cycles de dénaturation 30 s à 94°C, hybridation des amorces 30 s à 60°C, élongation 60 s 72 °C.

D. Résultats :

Les cellules ont été infectées avec un sotck de particules (7.10^7 pfu/ml) en absence ou en présence de 2 ou 4 mg/ml de polybrène. Deux MOIs (multiplicité d'infection) ont été testées : 0,3 et 1,5. Aucune expression de luciférase n'a pu être obtenue. La recherche d'ADN proviral par PCR n'a pas permis d'obtenir l'amplification d'un produit attendu à la taille de 244 pb. Les MOIs étaient certainement trop faibles et insuffisantes pour obtenir une infection massive des cellules aboutissant à l'expression significative du transgène. Cependant, il faut remarquer qu'à une MOI de 0,5 et 7 jours après l'infection, l'ADN proviral peut être détecté par PCR dans des primo cultures de coeur d'huîtres (Boulo, 1997).

Le polybrène ne peut être mis en cause puisque aux concentrations utilisées, les cellules présentaient un bon aspect général et une multiplication active.

Il est à noter que les cellules Bge sont sensibles au G418. A une concentration de 400 µg/ml de G418 les cellules Bge sont toutes mortes au bout de 96 h.

Il reste à estimer la stabilité des virus pseudotypés dans le milieu de culture Bge. Des infections réalisées avec des MOIs supérieures (de 1 à 5 par exemple) devraient permettre d'obtenir une intégration génomique de l'ADN proviral.

V. STRATEGIE DE RECHERCHE DU PROMOTEUR DE L'ACTINE NON MUSCULAIRE DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*.

Dans le cadre de la recherche de promoteurs homologues utilisables pour la transformation génétique de *B.* glabrata, nous avons choisi de caractériser le promoteur d'un gène de l'actine non musculaire de *B. glabrata.* Dans un premier temps, l'ADNc a été cloné afin de posséder une sonde correspondant précisément à une forme d'actine non musculaire pour cribler la banque génomique de mollusque.

A. Clonage de l'ADNc d'actine :

Deux amorces oligonucléotidiques situés dans la région codante (ACT1 et ACT2) ont été dérivées de deux séquences d'actine provenant de deux autres mollusques et présentant de fortes homologies entre elles : *Aplysia californica* (Desgroseillers *et al.*, 1990) et *Haliotis lamellosa* (M. Gomez-Chiarri, communication personnelle).

La PCR a été réalisée sur l'ADN de la banque d'ADNc *de B. glabrata* (λZAPII). Une bande unique de 565 pb correspondant à la taille attendue a été visualisée et sous-clonée en vecteur pTag. La séquence nucléique de cet insert présente un cadre ouvert de lecture sur toute sa longueur codant pour un polypeptide de 176 acides aminés (Figure 1) dont la séquence est fortement homologue à celles des actines d'*A. californica* et de *H. lamellosa.*

L'alignement des séquences présentées indique que le fragment amplifié par PCR est respectivement identique à 97 et 84 % au niveau protéique aux actines de l'un et l'autre des ces mollusques (pour les séquences partielles considérés). Le fragment amplifié correspond donc bien à une séquence partielle d'actine (Figure 2).

Le fragment PCR a été radiomarqué et utilisé comme sonde pour rechercher dans la banque d'ADNc un clone contenant la séquence complète de l'actine. Compte-tenu de l'importance de la représentation du messager d'actine parmi les messagers totaux, 50 000 clones ont été criblés. Environ 0,4 % des clones se sont révélés positifs. Quelques uns ont été purifiés et après excision *in vivo* du phagemide, un insert de 1391 pb a été séquencé correspondant à la séquence complète de l'actine (figure 1, Lardans *et al.*, 1996). La séquence présente un cadre ouvert de lecture codant pour une protéine de 376 acides aminés et précédée par une séquence 5' non codante de 70 pb. La région 3' non traduite qui se termine par une séquence poly A, contient 193 pb parmi lesquelles deux sites de polyadénylation ont pu être reconnus.

```
CGGAATGTGCAAGGCCGGTTTCGCTGGAGACGATGCTCCCAGGGCCGTTTTCCCATCTAT   60
      ACT1          F  A  G  D  D  A  P  R  A  V  F  P  S  I
TGTTGGCAGACCCAGACATCAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGTCAGAAGGACAGCTATGT  120
 V  G  R  P  R  H  Q  G  V  M  V  G  M  G  Q  K  D  S  Y  V
TGGTGATGAGGCTCAGTCTAAGAGAGGTATCCTCACCTTGAAATACCCCATTGAACATGG  180
 G  D  E  A  Q  S  K  R  G  I  L  T  L  K  Y  P  I  E  H  G
CATTGTCACAAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACTTTCTACAATGAGCT  240
 I  V  T  N  W  D  D  M  E  K  I  W  H  H  T  F  Y  N  E  L
TAGAGTTGCCCCTGAAGAGCACCCAGTACTTCTCACAGAGGCACCTCTAAACCCTAAAGC  300
 R  V  A  P  E  E  H  P  V  L  L  T  E  A  P  L  N  P  K  A
CAACAGAGAAAAGATGACCCAGATCATGTTTGAAACCTTCAACACACCAGCTATGTATGT  360
 N  R  E  K  M  T  Q  I  M  F  E  T  F  N  T  P  A  M  Y  V
AGCCATCCAAGCTGTGCTCTCATTGTACGCATCTGGTCGTACCACAGGTATTGTCATGGA  420
 A  I  Q  A  V  L  S  L  Y  A  S  G  R  T  T  G  I  V  M  D
CTCTGGTGATGGTGTGACCCACACTGTCCCCATCTATGAAGGTTATGCTCTTCCTCATGC  480
 S  G  D  G  V  T  H  T  H  P  I  Y  E  G  Y  A  L  P  H  A
TATTATGAGGTTAGATTTGGCTGGTCGTGACCTCACAGATTACTTGATGAAAATTCTCAC  540
 I  M  R  L  D  L  A  G  R  D  L  T  D  Y  L  M  K  I  L  T
TGAGAGGGGCTACTCTTTCACCACC
 E  R       ACT2
```

Figure 1 : Séquence nucléique et séquence protéique déduite du fragment PCR ACT1-ACT2 : La PCR a été réalisée à partir de 2 µl de la banque λZAPII de *B. glabrata* et des deux amorces ACT1 et ACT2 (soulignées). La réaction de PCR est effectuée dans un volume final de 50 µl de la façon suivante : $MgCl_2$ 2 mM, ACT1 (20 pmol), ACT2 (20 pmol), dNTPs 0,4 mM, Taq polymérase 5U (Promega), tampon 1X (Promega), qsp H_2O. L'amplification a lieu dans un appareil à PCR (Perkin Elmer Cetus : DNA Thermal Cycler) pour 35 cycles des 3 réactions : dénaturation 1 min à 94°C, l'hybridation des amorces 45 s à 45°C, élongation 45 s à 72°C. Le fragment de 565 pb obtenu a été sous-cloné dans le vecteur pTag et séquencé entièrement.

```
FAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYP
--------------------------------------------------

IEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMT
---------------------------P----------------------
                                                - ---
QIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYA
--------A-----------------------L----------------
--------S-------------H----V----F------------DV---

LPHAIMRLDLAGRDLTDYLMKILTER Act-Bg
-----L-------------S------ Act A.californica
-----TS-----CG-----IR----- Act H.lamellosa
```

Figure 2: Alignement des séquences protéiques du produit PCR ACT1-ACT2 avec les séquences d'actine d' Aplysia californica et d'Haliotis lamellosa.
Les tirets représentent les acides aminés identiques, la séquence de l'actine d'*H. lamellosa* est partielle.

Une étude comparative par la « clustal method » sur DNASTAR a permis de confirmer que l'actine de *B. glabrata* ressemble à de nombreuses séquences protéiques d'actines caractérisées chez d'autres espèces animales ou végétales. Les homologies les plus importantes sont trouvées avec l'actine d'échinoderme (oursin) et de mollusque (*A. californica*). Le pourcentage d'identité diminue sensiblement lorsque l'on considère des espèces animales plus évoluées : insectes (Mounier *et al.*, 1987) et vertébrés (Mohun *et al.*, 1988 pour le crapaud ; Hanauer *et al.*, 1983 pour l'α-actine humaine) ou des invertébrés inférieurs : plathelminthes, *E. granulosus* (Da Silva *et al.*, 1993) et les végétaux. Le score le plus bas est obtenu avec l'actine du protozoaire *P. falciparum* (Wesseling *et al.*, 1988).

ACTS-HU (α-actine squelettique humaine)	92,1 %
ACT1-XE (*Xenopus laevis*, crapaud)	92,1 %
ACT1-BO (*Bombyx mori*, papillon)	93,9 %
ACT1-STRFN (*Strongylocentrotus franciscanus*, oursin)	95,7 %
Bg-ACT (*Biomphalaria glabrata*)	100 %
ACAC-Pro (*Aplysia californica*)	94,9 %
ACT1-EC (*Echinococcus granulosus*)	89,5 %
ACT1-PEA (petit-pois)	88,2 %
ACT1-Pl (*Plasmodium falciparum*)	81,4 %

B. Nature non musculaire de l'actine :

Les isoformes α (musculaire) et β (non musculaire) d'actines de vertébrés peuvent être distinguer les unes des autres par l'analyse des acides aminés en des positions bien définies dans la séquence primaire de la protéine. Les auteurs ont en particulier décrit trois boîtes, la première (I) est variable, la deuxième et la troisième déterminent l'isoforme d'actine.

	1			10		17		
M C	D E D E T T A	L V	C	D N G S G	L V	K	actine α
	M D D D I A A	L V	V	D N G S G	M C	L	actine β
M	C D E D V A A	L V	V	D N G S G	M C	K	actine Bg
	I		II		III		

Dans la boîte II, une valine est trouvée en position 10 chez *B. glabrata* comme dans les séquences d'actines non-musculaires ; dans la boîte III, de la même manière la méthionine et la cystéine correspondent à des acides aminés d'une isoforme non musculaire d'actine.

Vingt positions définies d'acides aminés permettent de différencier une isoforme d'une autre (Vanderkerckhove et Weber, 1978). La séquence d'actine de *B. glabrata* possède 17 positions sur les 20 qui correspondent à des acides aminés de l'isoforme β (positions 10, 16, 17, 76, 106, 129, 153, 162, 201, 225, 259, 266, 286, 296, 298, 357, 364) et 2 acides aminés sont du type α (176, 278) et l'acide aminé en position 271 est une valine qui n'a jamais (à notre connaissance) été répertoriée en cette position.

Ces analyses suggèrent fortement que l'ADNc d'actine que nous avons cloné correspond bien à la séquence d'une isoforme d'actine non musculaire.

Il était en effet important de connaître l'isoforme de l'actine isolée puisque son ADNc devait servir de sonde pour cribler une banque génomique de *B. glabrata* et isoler ainsi un promoteur homologue utilisable pour la transfection, dans un premier temps des cellules Bge. Ces cellules étant de type embryonnaire et ressemblant fortement à des hémocytes, il semblait donc peu probable qu'elles expriment l'isoforme musculaire de l'actine et donc *a fortiori* qu'un promoteur d'actine musculaire puisse être fonctionnel dans ces cellules.

C. Recherche de la région promotrice

Des oligonucléotides ont été dérivés de la séquence de l'actine de *B. glabrata* :

ACT5 AGCGACGTTTTCTTGGTGCC position 5-24

ACT6 TGGGTTTAGAGGTGCCTCTG position 390-409

Ces oligonucléotides amplifient par PCR et à une température de 60°C d'hybridation des amorces, une bande de 405 pb à partir d'ADNc. La même PCR réalisée sur l'ADN génomique de *B. glabrata* a donné l'amplification d'une bande unique de taille supérieure (environ 1100-1200 pb) suggérant la présence d'un intron dans cette séquence. Ce fragment PCR a été partiellement séquencé afin d'identifier la présence des sites donneurs et accepteurs d'épissage :

<u>site donneur d'épissage :</u>

	A
consensus	5' C A G / G T G A G T 3'
actine Bg	5' C A T C A G / G T A A A T A A G 3'

<u>site accepteur d'épissage :</u>

	C T
consensus	3' T N C A G / G 5'
actine Bg	3' C T T T T C A G / G G T G T 5'

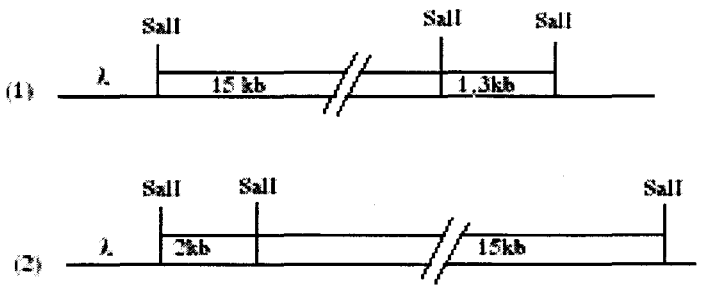
Cet intron est positionné entre les codons correspondant aux acides aminés 42 (Q) et 43 (G). Chez les vertébrés (poissons, amphibiens, oiseaux et mammifères), les gènes d'actine non musculaire possèdent le même profil d'introns (nombre et position). Il y a 4 introns dans la région codante (entre les codons 41/42, 121/122, 327/328 et dans le codon 267) et un intron dans la région 5' non codante (Bergsma *et al.*, 1985 ; Cross *et al.*, 1988 ; Erba *et al.*, 1988). La séquence 5' non traduite de l'actine de *B. glabrata* ne possède pas d'intron dans les 65 dernières pb, cependant il est impossible de conclure en l'absence d'intron dans cette région si la séquence 5' non codante de l'ADNc d'actine n 'est pas complète.

Une bande de 1200 pb mais de très faible intensité a pu être amplifiée à partir d'ADN extrait de 10 µl de la banque génomique EMBL3 de *B. glabrata*, suggérant que le clone correspondant est présent dans la banque.

La banque a donc été criblée avec ce fragment, et deux clones ont été purifiés et l'ADN phagique produit. L'analyse d'un des deux clones (1), montre que la digestion par Sal I libère un fragment de 1,3 kb et un fragment de grande taille (environ 15 kb). Le clone (2) donne après digestion par Sal I deux fragments : l'un de grande taille et un second de 2 kb environ. Pour le clone (1), seul le fragment de 1,3 kb s'hybride avec des sondes correspondant soit à la séquence codante de l'ADNc total de l'actine de *B. glabrata*, soit à la moitié N terminale de cet ADNc.

L'hybridation avec une sonde d'actine non musculaire de *B. mori* (séquences codante + 3' non codante) a montré que le clone (1) n'est pas reconnu alors que le clone (2) s'hybride. Ceci peut s'expliquer de la manière suivante : les deux clones sont différents, le clone (1) possède un insert contenant une petite partie N terminale codante pour l'actine (fragment de 1,3 kb) insuffisante pour s'hybrider avec une sonde d'ADNc hétérologue dérivée de *B. mori*. Le fragment de grande taille du clone (1) qui ne s'hybride avec aucune des sondes contiendrait la séquence en amont de la région 5' non codante. En ce qui concerne le clone (2), il s'agirait d'un clone contenant une plus grande partie de la séquence codante puisque les différentes sondes s'hybrident à la fois sur le fragment Sal I de 2 kb et sur le fragment de grande taille (Figure 3 et Figure 4).

Le clone (1) a été retenu pour le sous-clonage et le séquencage de l'insert de 1,3 kb qui sont actuellement en cours au laboratoire.



Schémas représentant la carte de restriction par Sal I des deux clones génomiques (1) et (2). Les deux schémas ne sont pas représentés à l'échelle.

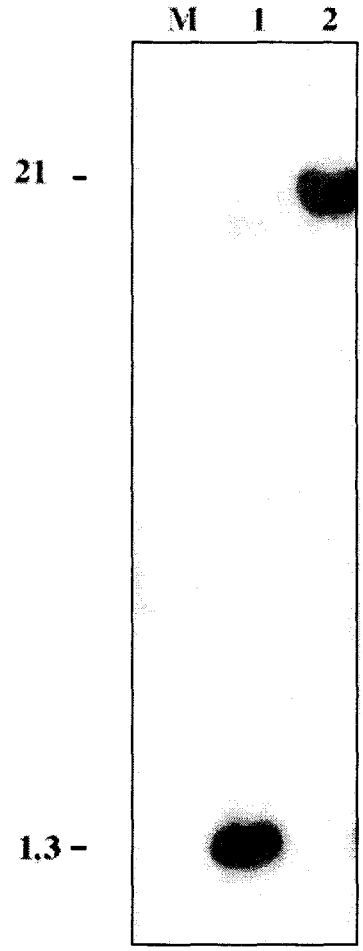


Figure 3 : Southern blot : L'ADN phagique du clone (1) a été digéré par Sal I (piste 1) ou BamH I (piste 2) et hybridé avec la sonde radiomarquée du fragment PCR de 1200 pb correspondant à l'amplification de l'ADN génomique par les amorces ACT5 et ACT6. La piste correspondant au marqueur moléculaire (M) ne s'hybride pas avec la sonde. BamH I ne coupe pas dans le fragment génomique.

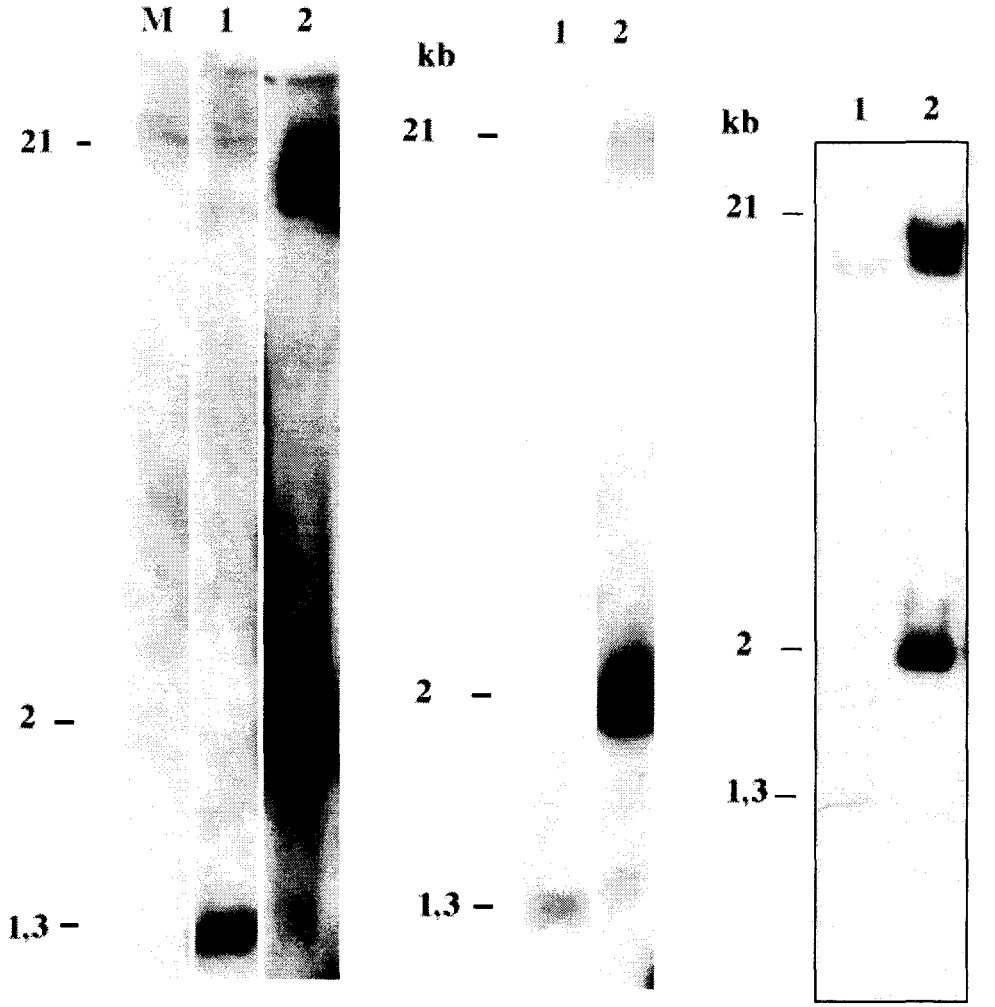


Figure 4 : Southern blot Les deux clones (1) et (2) ont été digérés par Sal I. Il y a libération d'un fragment d'environ 1,3 kb pour le clone (1) et de 2 kb pour le clone (2). Les hybridations sont réalisées dans le gel. Le gel est séché sous vide 1 h à température ambiante et 1 h à 60°C. Aprés 20 min de dénaturation en 0,5 M NaOH ; 0,15 M NaCl suivies de 20 min de neutralisation en 0,5 M Tris ; 0,15 M NaCl, le gel est équilibré en 6 X SSC. L'hybridation est réalisée de façon classique, les lavages sont effectués à 65°C successivement deux fois en 2X SSC ; 0,1 % SDS, puis en 1 X SSC ; 0,1 % SDS et enfin en 0,1 X SSC ; 0,1 % SDS. Le gel de gauche a été hybridé avec la sonde ADNc de l'actine de *B. glabrata* contenant le 5' non codant et toute la séquence codante. Le gel central a été hybridé avec la sonde d'actine de *B. glabrata* ne comportant que le 5' non codant et la moitié N terminale de la séquence codante. Le gel de droite a été hybridé avec une sonde de l'actine 3 non musculaire de *Bombyx mori* (Mangé, 1996) contenant la séquence codante et le 3' non codant.

D. Expression de l'actine non musculaire dans différents tissus :

Les gènes d'actine non musculaire sont considérés comme des gènes de référence à expression constante dans la cellule. Ils ont d'ailleurs pris le nom de « house keeping genes » puisque leur expresssion a été décrite comme étant constitutive.

L'étude de la modulation de l'expression de certains gènes par les cellules de la lignée Bge dans des modèles de coculture ou de stimulation par des produits d'excrétion-sécrétion du parasite ou par différents tissus du mollusque dans le cadre d'une infection parasitaire nécessite de disposer d'un tel gène de référence, celui-ci serait utile également pour toutes les expériences qui concerne l'induction de protéines spécifiques sous l'effet de stress comme par exemple l'infection par *S. mansoni.*

Un Northern blot a été réalisé à partir d'ARN total de cellules Bge ou de *B. glabrata.* Des mollusques de petite taille (diamètre) et de grande taille ont subi différents traitements :

- aucun traitement
- le pied a été pincé fortement
- le pied a reçu une piqure septique de bactéries

24 h après, les mollusques ont été sacrifiés. Le pied et la masse viscérale ont été séparés, et les ARN totaux préparés.

Une même quantité d'ARN total de chaque échantillon a été analysée en Northern blot avec une sonde correspondant à la séquence 5' non codante plus la séquence codante de l'actine non musculaire de *B. glabrata.*

L'autoradiographie (Figure 5) révèle l'hybridation d'une bande majeure à 1,3 kb et d'une bande mineure à 2,9 kb environ dans certaines pistes. La bande de 2,9 kb absente de la piste 1 (cellules Bge) est visualisable dans certaines préparations d'ARN de mollusques et pourrait correspondre à une autre isoforme d'actine par exemple la forme musculaire. Bien que la même quantité d'ARN total ait été déposée dans tous les puits, l'intensité du signal autoradiographique de la bande à 1,3 kb n'est pas égale dans toutes les pistes.

Ces résultats suggérent comme il l'a été rapporté pour les autres gènes d'actine non musculaires, que la demande en actine cytosquelettique varie d'un tissu à un autre et soit l'objet d'une régulation génique complexe (Mangé, 1996). L'utilisation de ce gène comme gène de référence dans les expériences de Northern blot ne semble donc pas favorable.

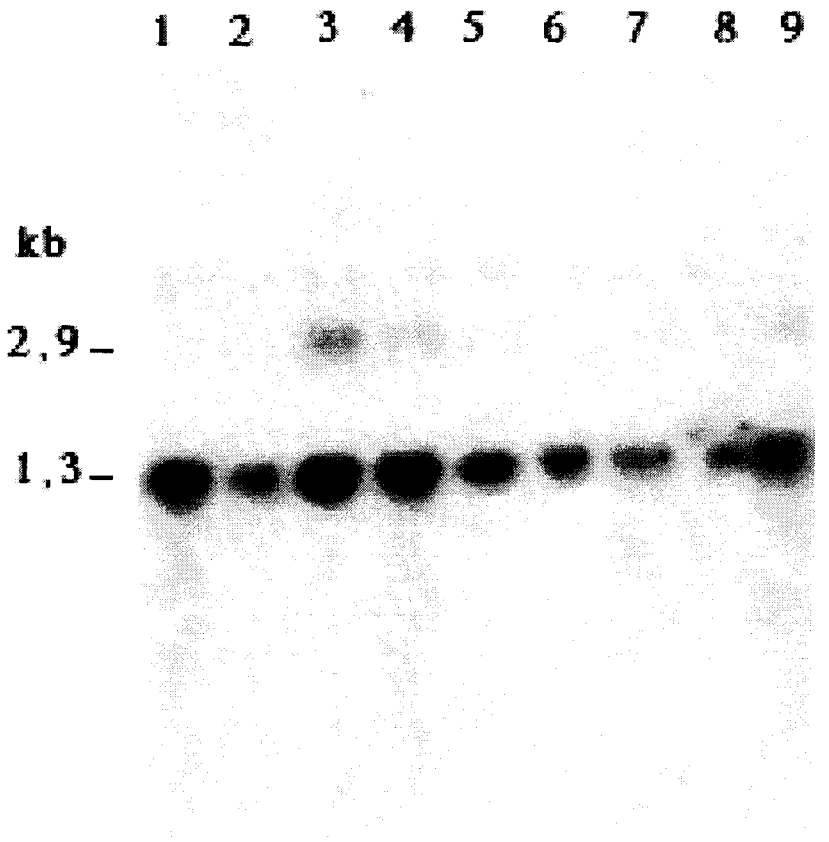


Figure 5 : Northern blot

Les ARN totaux ont été extraits de :

- pied (P) de 10 mollusques de taille inférieure à 1 cm de diamètre
- d'hépatopancréas (HP) de 5 mollusques de taille supérieure à 1 cm de diamètre

5 µg d'ARN total de chaque échantillon ont été déposés dans chaque puits : cellules Bge (1), mollusques de taille < à 1 cm : HP (2), P (3) ; mollusques de taille > à 1 cm : HP (4), P (5) ; mollusques ayant reçu une piqure septique : HP (6), P (7) ; mollusques dont le pied a été pincé : HP (8), P (9).

La sonde correspond à la moitié N terminale de l'ADNc de l'actine de *B. glabrata*..

DNA Sequence — The Journal of Sequencing and Mapping, Vol. 00, pp. 00–00
Reprints available directly from the publisher
Photocopying permitted by license only

© 1996 OPA (Overseas Publishers Association)
Amsterdam B.V. Published under license by
Gordon and Breach Science Publishers SA
Printed in Malaysia

Short Communication

Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of *Biomphalaria glabrata* Actin cDNA

VINCA LARDANS[a,*], PASCAL DUCLERMORTIER[a], VIRGINIE RINGAUT[a], JEAN-PAUL CADORET[b], ANDRÉ CAPRON[a] and COLETTE DISSOUS[a]

[a]*Institut Pasteur-INSERM U167, 1 rue du Pr.Calmette, B.P.245, 59019 Lille Cedex;*
[b]*IFREMER-CNRS-UMR9947, DRIM, 2 place Bataillon, C.P.80, 34095 Montpellier Cedex 5. France*

Data Accession No. Z72387

(Received 28th May 1996)

The complete nucleotide sequence *of Biomphalaria glabrata* actin has been cloned by PCR amplification and screening of a cDNA library of *Biomphalaria glabrata*. The comparison of the deduced amino acid sequence with other actins suggests that a cytoskeletal form of the protein has been cloned.

Keywords: Actin, *Biomphalaria glabrata*, nucleotide sequence, amino acid sequence

Actin is the most abundant protein synthesized in eukaryotic cells and belongs to the highest evolutionary conserved proteins. This contractile protein is predominantly found in the cytoplasm of all the cells, where it constitutes microfilaments implied in a variety of functions (Korn, 1978) including control of motility and cell shape (Mitchison and Cramer, 1996). Muscle-type actins are tissue-specific and are functionally involved in muscle contraction. In most organisms, closely related isoforms of the protein are

*Corresponding author.

encoded by a multigene family, whose members are specifically expressed in given tissues and/or developmental stages (Sanchez *et al.*, 1983). The number of actin genes is variable in different species and the presence of pseudogenes has been reported (Nellen and Gallwitz, 1982). Comparative analyses of actin gene structure and organization have been therefore of particular interest for molecular evolution (Mounier *et al.*, 1992) and functional studies (Vandekerckhove and Weber, 1984). Moreover, the identification of sequences responsible for the control of actin gene expression (Mohun *et al.*, 1986) has allowed the obtention of several actin promoters that have been successfully used in different models to constitutively drive the expression of various transgenes (Coulon-Bublex, *et al.*, 1993). In this paper, we present the cloning of the cDNA of a cytoskeletal isoform of actin from *Biomphalaria glabrata* that represents for us an important step towards the obtention of a constitutive promoter necessary to the transformation of this organism.

B.glabrata is a fresh water gastropod responsible for the transmission of the human parasite *Schistosoma mansoni* in endemic areas. This trematode causes schistosomiasis, one of the most important parasitic disease, and its eradication is actually considered in terms of chemotherapy and/or vaccine as well as in terms of control of vector populations. In this context, the use of transgenesis for the production of resistant snails has been proposed and efforts are currently made to develop genetic transformation of mollusc cells. We have recently demonstrated that a cell line of *B.glabrata* embryos (Bge) (Hansen, 1976a) could be transfected efficiently by constructs containing heterologous promoters (CMV and *Drosophila* Hsp70) (Lardans *et al.*, 1996). Now, we are investigating the possibility to use homologous promoters that are supposed to be more efficient for transgene expression.

A cDNA encoding actin was isolated from a *B.glabrata* cDNA λZAPII library. Two oligonucleotides deduced from the alignment of actin cDNA sequences from two molluscs, *Aplysia cali-*

fornica (Desgroseillers *et al.*, 1990) and *Haliotis rufescens* (Gomez-Chiarri, personal communication) were used for amplification of the total DNA extracted from the *B.glabrata* cDNA library. Reactions were carried out with 35 cycles composed of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 45°C for 45 s and polymerization for 45 s at 72°C. A unique fragment with the expected size was recovered and subcloned in the pTag vector for sequencing. Results confirmed a high degree of homology with the mollusc actin sequences. Northern blot experiments indicated that the PCR fragment hybridized on two mRNA species of 1.4 and 3kb respectively (results not shown). When this fragment was used for the screening of the cDNA library, an important number of positive clones (0.4%) was observed, confirming the abundant expression of the protein. One of these clones (Bg Act) contained a 1.4 kb insert that was supposed to represent a full-length sequence. Sequencing was performed on both DNA strands. The nucleotide and deduced amino-acid sequences of Bg Act are presented in figure 1. The sequence contains 1391 bp and codes for a protein of 376 amino-acids with a calculated molecular weight of 42 kDa and an isoelectric point of 5.3, ie with characteristics similar to those of other actin molecules. The amino-acid sequence is highly homologous to that of various actins from animal and plant species. The highest score of identity (95%) was observed with mollusc (*A. californica*) and sea urchin actins. This percentage remained important (more than 80%) when different higher (insect, vertebrate) or lower (helminth, protozoan) evolutionary species were considered.

The Bg Act sequence contains all of the conserved residues thought to be involved in the binding of the various known actin ligands (myosin, tropomyosin, caldesmon, α-actinin, profilin, DNAse I) (Sheterline and Sparrow, 1994; Oliveira and Kemp, 1995).

In order to define the nature of the isoform, we performed a more precise analysis of the primary sequence of BgAct. Muscle-type (α) and

BU LILLE I

```
CAGAAGCGACGTTTTCTTGGTGCCTTTTCTTCTCTAATTGCTGTGTTAACTTAAACTCCAATTAATAATC    70
ATGTGTGACGAGGACGTAGCCGCTCTTGTAGTAGACAATGGATCTGGTATGTGCAAGGCAGGTTTCGCTG   140
 M  C  D  E  D  V  A  A  L  V  V  D  N  G  S  G  M  C  K  A  G  F  A        23*
GAGACGATGCTCCCAGGGCCGTTTTCCCATCTATTGTTGGCAGACCCAGACATCAGGGTGTGATGGTTGG   210
G  D  D  A  P  R  A  V  F  P  S  I  V  G  R  P  R  H  Q  G  V  M  V  G        47*
TATGGGTCAGAAGGACAGCTATGTTGGTGATGAGGCTCAGTCTAAGAGAGGTATCCTCACCTTGAAATAC   280
 M  G  Q  K  D  S  Y  V  G  D  E  A  Q  S  K  R  G  I  L  T  L  K  Y        70*
CCCATTGAACATGGCATTGTCACAAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACTTTCTACAATG   350
 P  I  E  H  G  I  V  T  N  W  D  D  M  E  K  I  W  H  H  T  F  Y  N        93*
AGCTTAGAGTTGCCCCTGAAGAGCACCCAGTACTTCTCACAGAGGCACCTCTAAACCCTAAAGCCAACAG   420g
E  L  R  V  A  P  E  E  H  P  V  L  L  T  E  A  P  L  N  P  K  A  N  R       117*
AGAAAAGATGACCCAGATCATGTTTGAAACCTTCAACACACCAGCTATGTATGTAGCCATCCAAGCTGTG   490
 E  K  M  T  Q  I  M  F  E  T  F  N  T  P  A  M  Y  V  A  I  Q  A  V       140*
CTCTCATTGTACGCATCTGGTCGTACCACAGGTATTGTCATGGACTCTGGTGATGGTGTGACCCACACTG   560
 L  S  L  Y  A  S  G  R  T  T  G  I  V  M  D  S  G  D  G  V  T  H  T       163*
TCCCCATCTATGAAGGTTATGCTCTTCCTCATGCTATTATGAGGTTAGATTTGGCTGGTCGTGACCTCAC   630
V  P  I  Y  E  G  Y  A  L  P  H  A  I  M  R  L  D  L  A  G  R  D  L  T       187*
AGATTACTTGATGAAAATTCTCACTGAGAGGGGCTACAGCTTCACCACAACAGCTGAGCGTGAAATTGTC   700
 D  Y  L  M  K  I  L  T  E  R  G  Y  S  F  T  T  T  A  E  R  E  I  V       210*
CGTGACATCAAGGAAAAGCTCTGCTATGTGGCTCTAGATTTTGAACAGGAAATGCAAACAGCTTCCACCT   770
 R  D  I  K  E  K  L  C  Y  V  A  L  D  F  E  Q  E  M  Q  T  A  S  T       233*
CTTCATCTCTTGAGAAGAGTTATGAGCTTCCTGACGGTCAAGTCATCACCATTGGCAATGAGCGATTCAG   840
S  S  S  L  E  K  S  Y  E  L  P  D  G  Q  V  I  T  I  G  N  E  R  F  R       257*
ATGTCCAGAAGCTACGTTCCAGCCATCTTTCCTTGGTATGGAAGTCGTCGGTATCCATGAAACAACCTAC   910
 C  P  E  A  T  F  Q  P  S  F  L  G  M  E  V  V  G  I  H  E  T  T  Y       280*
AACTCCATCATGAAATGTGATGTTGACATTCGTAAAGACTTGTATGCTAACACTGTATTGTCTGGTGGTT   980
 N  S  I  M  K  C  D  V  D  I  R  K  D  L  Y  A  N  T  V  L  S  G  G       303*
CCACCATGTTCCCAGGCATTGCAGACAGAATGCAGAAAGAAATCACAGCCTTGGCCCCACCAACAATGAA  1050
S  T  M  F  P  G  I  A  D  R  M  Q  K  E  I  T  A  L  A  P  P  T  M  K       327*
GATCAAGATCATTGCTCCACCAGAGAGGAAATACTCCGTCTGGATTGGAGGATCTATTTTAGCATCTCTC  1120
 I  K  I  I  A  P  P  E  R  K  Y  S  V  W  I  G  G  S  I  L  A  S  L       350*
TCCACCTTCCAACAGATGTGGATCTCCAAACAAGAGTATGACGAATCTGGTCCATCCATTGTTCATAGGA  1190
S  T  F  Q  Q  M  W  I  S  K  Q  E  Y  D  E  S  G  P  S  I  V  H  R       373*
AGTGTTTCTAAACTGTTAACTTGTTACTTAGTATATATATATAAATATATATATAATTATGCTCAAAATA  1260
K  C  F  *                                                                376*
TGTGCACAATTGCTGCCAGATGACCAAAAAGTTCTGCATGTTTACTGATCAAATTTAATTCTGAATCTGT  1330
TCTATTTTTATGTCATAACCTTTAAAGAATTTTTTATATGAAAATAAAAAGTTTTGATAACAAAAAAAAA  1400
AAAAAAAAA                                                               1410
```

FIGURE 1 No Caption.

cytoskeletal (β) vertebrate actins can be distinguished by 20 amino acid replacements in their primary sequences (Vandekerckhove and Weber, 1978). Data showed that BgAct was more related to vertebrate non-muscular actin isoforms since 17 out of 20 amino acids were of the β type (positions 10, 16, 17, 76, 106, 129, 153, 162, 201, 225, 259, 266, 286, 296, 298, 357, 364) and only 2 of the

α type (176, 278); to our knowledge, the residue Val at the position 271 has never been reported before.

In conclusion, our results strongly suggest that the cDNA cloned corresponds to the sequence of a cytoskeletal isoform of mollusc actin. Further access to the promoter of the gene encoding this ubiquitously expressed protein will represent a major step for efficient expression of transgenes in Bge cells. This cell line is supposed to derive from hemocytes (defence blood cells) (Hansen, 1976b; Yoshino and Laursen, 1995) and very likely constitutes the more suitable tool for *in vitro* studies of snail/parasite interaction by the mean of its transformation by resistance genes.

Acknowledgements

This work was supported by the Conseil Regional Nord-Pas de Calais and Pasteur Institute of Lille-INSERM U167.

References

Coulon-Bublex, M., Mounier, N., Couble, P. and Prudhomme, J. C. (1993) "Cytoplasmic actin A3 gene promoter injected as supercoiled plasmid is transiently active in *Bombyx mori* embryonic vitellophages," *Roux's Arch Dev. Biol.*, **202**, 123–127.

DesGroseillers, L., Auclair, D. and Wickham, L. (1990) "Nucleotide sequence of an actin cDNA gene from *Aplysia california*," *Nucl. Acids Res.*, **18**, 3654.

Hansen, E. L. (1976a) A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata); establishment and characteristics. In: *Invertebrate tissue culture: Research applications*, K. Maramorosch (ed). pp. 75–97. (Academic Press. New York.)

Hansen, E. L. (1976b) Application of tissue culture of pulmonate snail to the culture of larval *Schistosoma mansoni*. In: *Invertebrate tissue culture: Applications in medicine and biology and agriculture*, E. Kurstak and K. Maramorosch (eds). pp. 87–97 (Academic Press, New York).

Korn, E. D. (1978) "Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (A review)," *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, **75**, 588–599.

Lardans, V., Boulo, V., Duclermortier, P., Serra, E., Mialhe, E., Capron, A. and Dissous C. (1996) "DNA transfer in a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line by DOTAP lipofection," *Parasitol. Research.* (in press).

Mitchison, T. J. and Cramer, L. P. (1996) "Actin-based cell motility and cell motility," *Cell*, **84**, 371–379.

Mohun, T. J., Garrett, N. and Gurdon, J. B. (1986) "Upstream sequences required for tissue-specific activation of the cardiac actin gene in *Xenopus laevis* embryos," *Embo J.*, **5**,

3185–3193.
Mounier, N., Gouy, M., Mouchiroud, D. and Prudhomme, J. C. (1992) "Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins," *J. Mol. Evol.*, **34**, 406–415.
Nellen, W. and Gallwitz, D. (1982) "Actin genes and actin messenger RNA in *Acanthomoeba castellanii*. Nucleotide sequence of the split actin gene 1," *J. Mol. Biol.*, **159**, 1–18.
Oliveira, G. C. and Kemp, W. M. (1995) "Cloning of two actin genes *from Schistosoma mansoni*," *Mol. Biochem. Parasitol.*, **75**, 119–122.
Sanchez, F., Tobin, S. L., Rdest, U., Zulauf, E. and McCarthy, B. J. (1983) "Two *Drosophila* actin genes in detail. Gene structure, protein structure and transcription during development," *J. Mol. Biol.*, **163**, 533–551.
Sheterline, P. and Sparrow, J. (1994) *Actin*, (Academic Press, London).
Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978) "Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins," *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **75**, 1106–1110.
Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1984) "Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins," *J. Mol. Biol.*, **179**, 391–413.
Yoshino, T. and Laursen, J. R. (1995) "Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells," *J. Parasitol.*, **81**, 714–722.

CHAPITRE III :

CARACTERISATION MOLECULAIRE DU RECEPTEUR POUR LA PROTEINE KINASE C ACTIVEE DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*

La compréhension des interactions moléculaires qui se produisent entre *Biomphalaria glabrata* et *Schistosoma mansoni* est limitée. La base cellulaire de la reconnaissance et de la destruction des parasites réside dans la capacité qu'ont les hémocytes circulants à se lier à la surface du parasite et en l'activation subséquente de ces hémocytes. L'activation des cellules hémocytaires se produit vraisemblablement par la transduction du signal par l'intermédiaire des protéines kinase C (PKCs) à travers la membrane suite à la liaison du parasite par l'hémocyte (van der Knaap et Loker, 1990).

Dans ce chapitre, le clonage et la caractérisation d'une protéine de *B. glabrata* très homologue aux protéines RACKs (Receptor for Activated Kinase C) sont présentés. Cette protéine est impliquée dans la transduction du signal membranaire et interagit avec les PCKs pour les maintenir sous leur conformation tridimensionnelle active.

I. La signalisation cellulaire :

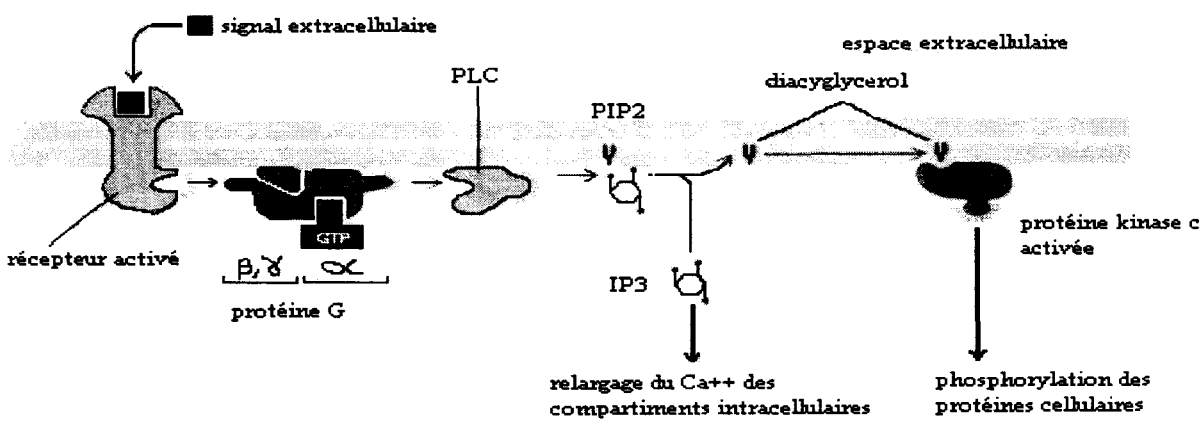
A. *Généralités :*

Les mécanismes par lesquels une cellule répond aux stimuli externes (messagers primaires) impliquent initialement la transduction du signal au travers de la membrane cellulaire. La transduction du signal intracytoplasmique est assurée par la production de substances bioactives (les messagers secondaires) et par la capacité de ces messagers secondaires à entraîner des changements conformationnels des protéines régulatrices.

B. *La transduction du signal intracytoplasmique par la voie des PKCs :*

Les protéines kinases C (PKCs) sont des enzymes qui transmettent des myriades de signaux suite à l'hydrolyse des lipides. Elles sont activées par le diacylglycérol ; leur activité enzymatique est dépendante de phospholipides et pour certains isoenzymes du calcium (Ca^{++}).

Ainsi, la transmission du signal provenant des hormones, des neurotransmetteurs, des antigènes et des facteurs de croissance passe par un mécanisme commun dans les cellules. Les signaux qui stimulent les membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs à activité tyrosine kinase ou non, peuvent provoquer la production de diacylglycérol (DAG) qui est normalement très peu présent dans les membranes cellulaires. Ce phénomène se produit soit rapidement par l'activation de phospholipases C (PLC) spécifiques ou plus lentement par l'activation de la phospholipase D (Mochly-Rosen, 1995). La PLC clive le phosphatidyl inositol 4,5-bis phosphate (PIP_2) en inositol-1,4,5 triphosphate (IP_3) et en DAG. L'IP_3, une petite molécule hydrosoluble, quitte la membrane plasmique, diffuse rapidement dans le cytosol et entraîne la libération du Ca^{++} des stocks intracellulaires (Nishizuka, 1988). De plus, la production d'acides gras par l'activation de la phospholipase A_2 module l'activité des PKCs.



Représentation shématique du mécanisme d'activation des PKCs

Ainsi, plusieurs signaux extracellulaires, passant par des récepteurs différents mais entraînant un renouvellement du phosphatidylinositol, vont avoir pour action commune finale l'activation des PKCs grâce à la production du messager secondaire, le DAG qui est leur activateur (Nishizuka, 1984 ; Newton, 1995). Les esters de phorbol qui miment le DAG peuvent se substituer à ce dernier et activer les PKCs. Cependant, contrairement au DAG, les esters de phorbol ne sont pas réellement métabolisés et le traitement des cellules avec ces composés aboutit à une activation prolongée des PKCs. Ces enzymes requièrent d'autres activateurs en plus du DAG ou des esters de phorbols, il s'agit de la phosphatidylserine et d'acides gras toujours situés à la face interne de la membrane plasmique (Nishizuka, 1992).

II. Les protéines kinases C (PKCs) :

A. Rôles physiologiques des PKCs :

Les PKCs régulent de nombreuses fonctions des cellules eucaryotes telles que par exemple, la différenciation, la mitogénèse, la croissance, le développement neuronal, la transmission synaptique, la contraction des muscles lisses, la sécrétion endocrine et exocrine et le vieillissement. Elles jouent également un rôle essentiel dans la tumorisation (revue de Liu, 1996).

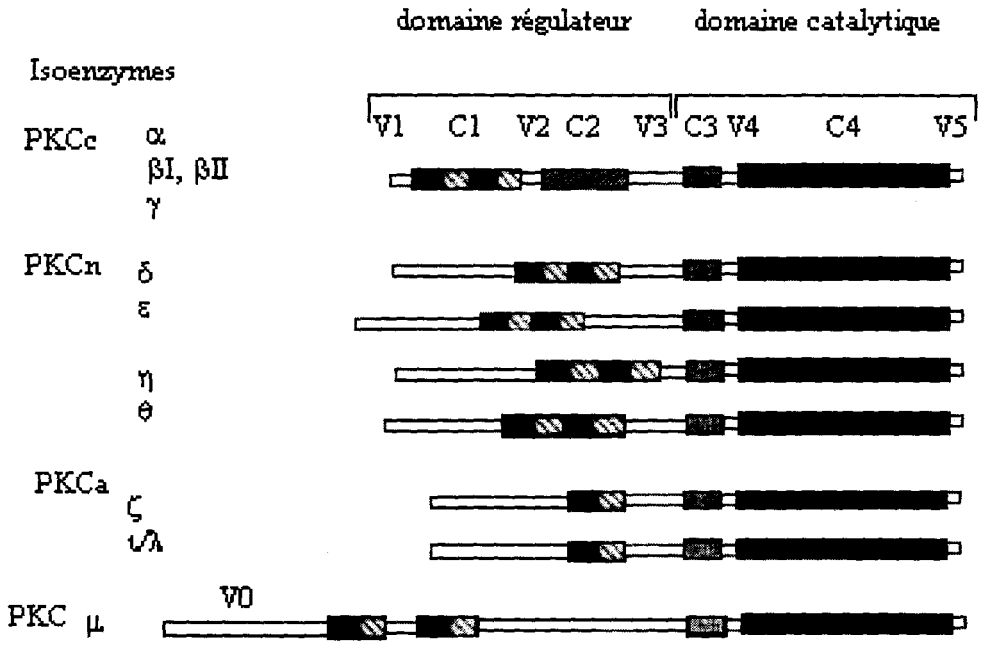
B. Fonctions des PKCs :

Les PKCs phosphorylent les résidus serine et threonine au sein d'une séquence primaire basique. Elles ont également une activité ATPase et une activité phosphatase ; l'enzyme catalyse l'hydrolyse de l'ATP, stimulée par le substrat et peut effectuer la réaction inverse en présence d'un excès d'ADP. Les PKCs renferment trois sites potentiels phosphorylables. La première phosphorylation est effectué par une autre kinase et n'a pas d'effet sur la localisation des PKCs. Elles sont également capables de s'autophosphoryler *in vitro* par un mécanisme intramoléculaire, la seconde autophosphorylation provoque le relargage des PKCs dans le cytosol.

C. Structure des PKCs :

La structure primaire des PKCs peut être divisée en deux domaines : un domaine régulateur et un domaine catalytique. Ces deux domaines ont été respectivement subdivisés en sous domaines selon les isoenzymes. Les PKCs possèdent un domaine catalytique spécifique des serine/thréonine dans la moitié C terminale de la molécule (domaines C3 et C4). Le domaine C3 permet la liaison de l'ATP, le domaine C4 la liaison du substrat. Dans la partie régulatrice N terminale de la protéine, une ou plusieurs structures en doigt de zinc sont présentes, précédées par une séquence pseudosubstrat. Cette séquence pseudosubstrat mime le substrat de la kinase mais contient une alanine à la place du résidu phosphorylable. Les structures en doigt de zinc (domaine C1) jouent un rôle dans la liaison du DAG et des esters de phorbol par les PKCs. La séquence pseudosubstrat inhibe la fonction kinase de l'enzyme en interagissant avec le site de liaison du substrat dans le domaine catalytique (House et Kemp, 1987). Des anticorps dirigés contre le domaine

pseudosubstrat entraînent une activation de la PKC (Marowske et Rosen, 1989). Le domaine C2 confère la propriété de lier le calcium et la phosphatidylserine (PS), le domaine Vo quant à lui procure une affinité accrue pour la PS (Stabel, 1994 ; Nishizuka, 1988).



Structure des domaines des PKCs : 11 isoformes de la famille des PKCs ont été décrits et classées en 4 groupes PKCc, PKCn, PKCa et PKCμ. Les régions conservées (C1-C4) et variables (V0-V5) sont indiquées dans les domaines régulateurs et catalytiques (d'après J.-P. Liu, 1996).

D. Les isoenzymes de la PKC :

Il existe actuellement 11 isoenzymes caractérisés de la PKC. Les différentes PKCs ont été classées en quatre groupes sur la base de critères structuraux.

Le groupe des PKCs conventionnelles aussi appelées PKCs classiques regroupe les PKCs α, βI, βII et γ. Elles ont été caractérisées par leur capacité à lier les esters de phorbol et par leur activité kinase stimulée *in vitro* par le DAG, la PS et le Ca^{++} (Kikkawa *et al.*, 1987).

Les PKCs nouvelles (PKCs δ, ε, η, θ) sont caractérisées par l'absence de région C2 et une séquence N terminale plus longue (séquence V0). Ces enzymes peuvent lier les esters de phorbol mais leur activité kinase est indépendante *in vitro* du Ca^{++} (Ono *et al.*, 1988).

Le groupe des PKCs atypiques (PKCs ι/λ, ζ) comprend des enzymes avec une seule structure en doigt de zinc et la PKCζ ne peut pas lier les esters de phorbol.

La PKCμ tient une position intermédiaire entre les PKCs atypiques et les nouvelles PKCs du point de vue structural ; d'autre part, elle est membranaire.

E. La localisation des PKCs :

L'activation des PKCs a pour effet de provoquer leur translocation du cytosol à la fraction particulaire de la cellule. Le traitement de cellules tumorales par un ester de phorbol produit une diminution très importante de l'activité PKC du cytosol conjointement à une forte augmentation de cette activité liée à la membrane (Kikkawa *et al.*, 1982 ; Kraft et Anderson, 1983). Suite à ces observations, Bell proposait en 1986 que la translocation de la PKC révélait son interaction avec les lipides membranaires (PS) nécessaires à son activation. Des études ultérieures ont indiqué une localisation de la PKC au niveau de divers compartiments intracellulaires différents de la membrane plasmique comme certains composants du cytosquelette (Ito *et al.*, 1989 ; Papadopoulos et Hall, 1989), l'appareil de Golgi (Saito *et al.*, 1989), le noyau (revue de Buchner, 1995) ou l'enveloppe nucléaire (Hasley *et al.*, 1987 ; Fields *et al.*, 1989).

Il apparaît donc que la grande variété d'activités physiologiques des PKCs puisse être attribuée à leurs différentes isoformes (Toker *et al.*, 1990) mais également à leur régulation très fine. En effet, les PKCs sont régulées par deux mécanismes distincts : d'une part, leur propre phosporylation et leurs localisations subcellulaires et d'autre part, par les messagers secondaires qui entraînent l'association des PKCs aux structures membranaires et la dissociation du site pseudosubstrat (revue de Newton, 1995).

F. Les protéines liant les PKCs

La technique du système à deux hybrides de levure (Staudinger *et al.*, 1995) et la technique modifiée de Western blot qui utilise la PKC et les anticorps anti-PKCs pour identifier les protéines qui se lient aux PKCs ont permis d'accroître de façon considérable la liste des protéines substrats des PKCs mais également d'identifier un certain nombre de protéines non substrat. Les protéines interagissant avec les PKCs ont été classées en 2 catégories :

1) les substrats : la revue de Liu de 1995 comptabilise 110 substrats différents phosphorylés par les PKCs.,

2) les récepteurs pour les PKCs activées.

III. Les récepteurs pour les PKCs activées (RACKs) :

A. Mise en évidence des récepteurs pour les PKCs activées :

En 1986, Gopalachrisna et al. ont montré que le traitement des membranes plasmiques par la trypsine réduit l'activité PKC liée à la membrane suggérant que des protéines membranaires étaient essentielles pour que la PKC interagisse avec les lipides membranaires. Des données de plusieurs autres laboratoires ont démontré de façon similaire que les PKCs se liaient à des protéines aux sites de translocation (Wolf *et al.*, 1986 ; Wolf et Baggiolini, 1990 ; Hyatt *et al.*, 1994). Sur la base de ces observations indiquant une interaction protéine-PKC ainsi qu'une localisation de la PKC à

différents sites intracellulaires, Mochly-Rosen *et al.* (1991a) ont proposé l'existence de récepteurs pour les PKCs activées. Ces récepteurs furent nommés RACKs (Receptor for Activated protein Kinase C). Cette équipe a pu identifier ces récepteurs (30 kDa environ) à partir de fractions cellulaires de coeur de rat nouveau né riches en cytosquelette. La liaison de la RACK à la PKC ne se produit pas par l'intermédiaire du site actif de l'enzyme puisqu'un peptide substrat n'inhibe pas la liaison de la PKC aux RACKs. Les protéines RACKs liaient la PKC en présence de DAG, de PS et de Ca^{++}. Puisque l'interaction des deux protéines nécessite la présence de PS et Ca^{++}, il était raisonnable d'envisager un rôle de pontage pour ces activateurs (Bazzi et Nelsestuen, 1987) et en particulier pour PS. Si la RACK est préalablement préincubée avec les activateurs de la PKC, elle possède une affinité pour les PKCs. Cependant, toutes les protéines liant la PS ne sont pas des ligands pour les PKCs. En effet, Mochly-Rosen et al. ont montré que différentes annexines (I à VII) n'avaient pas la même capacité à lier les PKCs. Les annexines sont des protéines qui ont la propriété de lier des phospholipides chargés négativement tels que la PS en présence de Ca^{++} (Crompton *et al.*, 1988). Seules les annexines I et dans une moindre mesure II et VII interagissent avec la PKC alors que les annexines II et VII sont capables respectivement de lier 1,3 et 5,3 fois plus de PS que l'annexine I. De plus, cette dernière est capable de se lier à la PKC en absence de PS. De ces résultats est né un premier modèle décrivant l'interaction entre la RACK et la PKC, modèle dans lequel, la PS ne sert pas de pont entre les deux protéines mais plutôt d'activateur en exposant au niveau de la PKC le site d'interaction avec la RACK (Mochly-Rosen *et al.*, 1991a).

B. Interactions moléculaires PKC-RACK . Importance du domaine C2 des PKCs.

Dans la même période, Aitken *et al.* (1990) ont publiés la purification d'un composant inhibiteur de la PKC (PKCI) qui contient une séquence de 16 acides aminés (127-142) identique à la portion C terminale de l'annexine I (332-346). De l'alignement de ces deux protéines non apparentées mais fixant les PKCs, un peptide a été construit, le peptide I qui se lie aux PKCs et les auteurs ont découvert que ce peptide I fait partie du site de liaison des RACKs aux PKCs car il inhibe de façon spécifique l'interaction entre les deux protéines (Mochly-Rosen *et al.*, 1991b). Afin de prouver la pertinence *in vivo* de ces observations, les auteurs ont réalisé des injections dans des oocytes de xénope de peptide inhibiteur (séquence pseudo-substrat) ou de protéines RACKs exogènes. L'injection du peptide pseudosubstrat ou de RACKs exogènes dans les oeufs de xénope retarde les phénomènes de maturation déclenchables par stimulation des PKCs bien que dans le cas de l'injection de RACKs exogènes, il n'y ait pas d'inhibition directe de la fonction PKCs. Ces données sont en faveur de l'hypothèse que la translocation des PKCs et leur liaison aux RACKs de la fraction particulaire sont requises pour qu'elles soient actives (Smith et Mochly-Rosen, 1992). Etant donné que 3 isoenzymes différentes de PKC (βI, βII, γ) se lient *in vitro* à la protéine RACK, une séquence conservée de PKC doit être impliquée dans l'interaction. Parmi les 4 régions conservées (C1 à C4) de ces PKCs, la région C2 est présente également au niveau de la protéine p65 (synaptogamine) et de la PLCγ. La p65 se lie à la RACK et inhibe la liaison de la

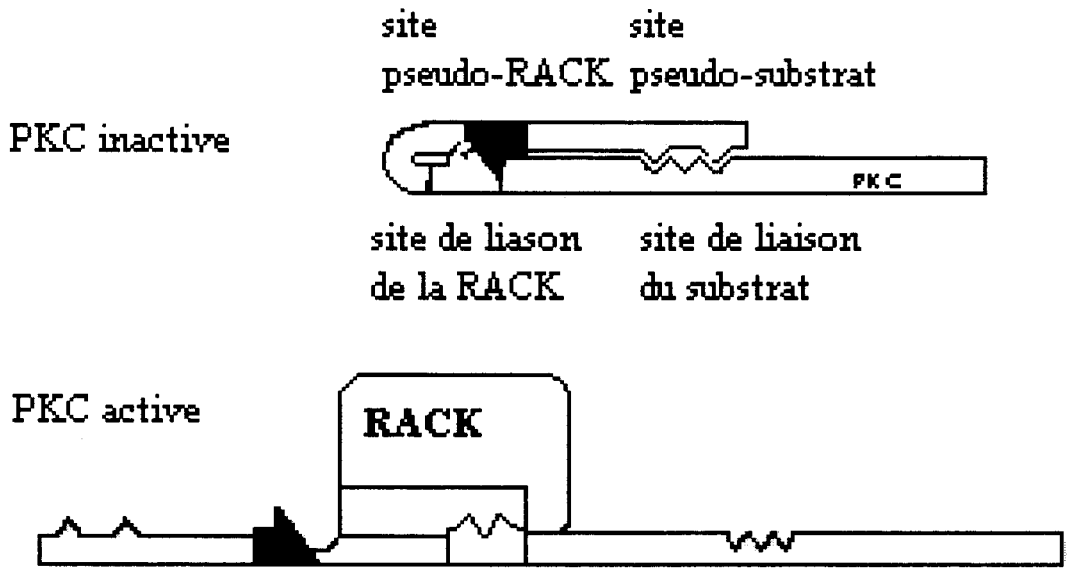
PKC et *vice versa* (Mochly-Rosen *et al.*, 1992). Les mêmes observations peuvent être obtenues en considérant la PLCγ (Disatnik *et al.*, 1994). Ces résultats laissent supposer que la région C2 de ces divers molécules fait partie du site de liaison à la RACK. Des peptides dérivés de régions fines du domaine C2 des PKCs (AA 186-198 ; AA 209-216 ; AA 218-226) inhibent la translocation des PKCs induite par le PMA dans des myocytes cardiaques et des oocytes de xénope. Ces résultats démontrent que la région C2 contient au moins une partie du site de liaison à la RACK (Ron *et al.*, 1995).

C. Clonage d'un récepteur pour les PKCs activées et caractérisation des sites de liaison.

Le récepteur de la PKC de cerveau de rat a été cloné en 1994 par Ron *et al.* Cette protéine est identique à 100% à la RACK de poulet et d'humain préalablement identifiées comme homologues aux sous-unités Gβ (Guillemot *et al.*, 1989). La protéine recombinante, nommée RACK1, se lie de façon optimale aux PKCs en présence de Ca^{++}, PS, et DAG et cette liaison est dépendante de leurs concentrations. L'incubation avec des peptides substrat ou pseudo-substrat n'inhibe pas cette interaction. La RACK n'est pas un substrat de la PKC mais la phosphorylation de l'histone H1 par les PKCs est augmentée de 4,5 fois en présence de la RACK1. Le peptide I inhibe à 81% la liaison des deux protéines. Les auteurs ont suggéré qu'une séquence du peptide I puisse présenter des homologies avec la séquence primaire de la protéine RACK1. Deux peptides ont été retenus : le peptide RACKrIII (AA 107-113) et le peptide RACKrVI (AA 234-241). Ces deux peptides sont capables d'inhiber *in vitro* la liaison de la RACK avec les PKCs. L'effet des peptides RACKrVI a été étudié *in vivo* dans le modèle des oocytes de xénope. Le peptide rVI se lie aux PKCs de façon similaire en absence comme en présence des activateurs classiques alors que la liaison du peptide I aux PKCs est augmentée en présence des activateurs. *In vivo*, leurs rôles sont opposés puisque le peptide I inhibe la maturation des oocytes déclenchable par stimulation de la voie des PKCs alors que le peptide rVI l'active. Des expériences complémentaires ont mis en évidence que le peptide rVI provoquait l'autophosphorylation de la PKCβ, sa translocation, la phosphorylation par la PKCβ de l'histone H1 en absence des activateurs et une augmentation de la sensibilité de l'extrémité N terminale de la PKCβ à l'endopeptidase Arg-C (généralement considérée comme marqueur pour une activation de la PKCβ *in vitro*). Ce peptide contenu dans la RACK se comporte comme un agoniste de l'activation des PKCs (Ron et Mochly-Rosen, 1994).

L'alignement des protéiques de RACK1 et des différentes PKCs a permis de localiser dans les PKCs un motif commun qui pourrait constituer un site pseudo-RACK, c'est-à-dire une séquence de la PKC homologue à la séquence de la RACK impliquée dans l'interaction entre les deux protéines. Le peptide 241-246 (SVEIWD) du domaine C2, homologue au peptide 256-261 (SIKIWD) de la RACK1 est également un agoniste des PKCs ; ceci évoque à nouveau l'idée qu'une partie du domaine C2 soit responsable de l'interaction avec la RACK (Ron *et al.*, 1995). Les PKCs contiennent donc deux sites internes distincts situés dans la région régulatrice qui miment l'un le substrat, l'autre la séquence de la RACK responsable de l'interaction avec la PKC.

Dans une conformation inactive de l'enzyme, le site pseudo-substrat du domaine régulateur se lie au site actif de l'enzyme et le site pseudo-RACK se replie sur le site de liaison de la RACK. Basés sur leurs résultats, les auteurs ont élaboré un modèle schématisant les formes inactive et active des PKCs (Ron et Mochly-Rosen, 1995).



Modèle shématisant les formes inactive et active des PKCs (d'après Ron et Mochly-Rosen, 1995).

IV. La RACK de *Biomphalaria glabrata*

A. Clonage de la Bg RACK

Une PCR réalisée à partir d'amorces dégénérées du TNFα sur une banque λgt11 de Bg a permis d'isoler un fragment de 320 pb possédant une séquence codante pour un peptide de 70 acides aminés. La comparaison avec la banque de données révèle une forte homologie de séquence avec les protéines C12.3 de poulet, H12.3 d'humain (Guillemot *et al.*, 1989) et avec la protéine Cblp de *Chlamydomonas* (Schloss, 1990). Ces protéines étaient apparentées aux sous-unités Gβ des protéines G.

Un Northern blot réalisé avec la sonde de 320 pb a permis de visualiser une bande de 1,3 kb (Figure 1). Le messager de la Cblp possède la même taille en Northern blot (Schloss, 1990). Une banque λZAPII a été construite à partir d'ARNm de Bg purifié sur colonne oligodT (Pharmacia). Le criblage de la banque avec le fragment de 320 pb a permis d'isoler un clone contenant l'ADN complémentaire total. Après excision *in vivo* du phagemide, l'insert de 1218 bp a été totalement séquencé (Figure 2). Le cadre de lecture ouvert de 948 pb code pour un polypeptide de 316 résidus et d'un poids moléculaire calculé de 34 kDa. L'analyse de la séquence a permis de déceler une

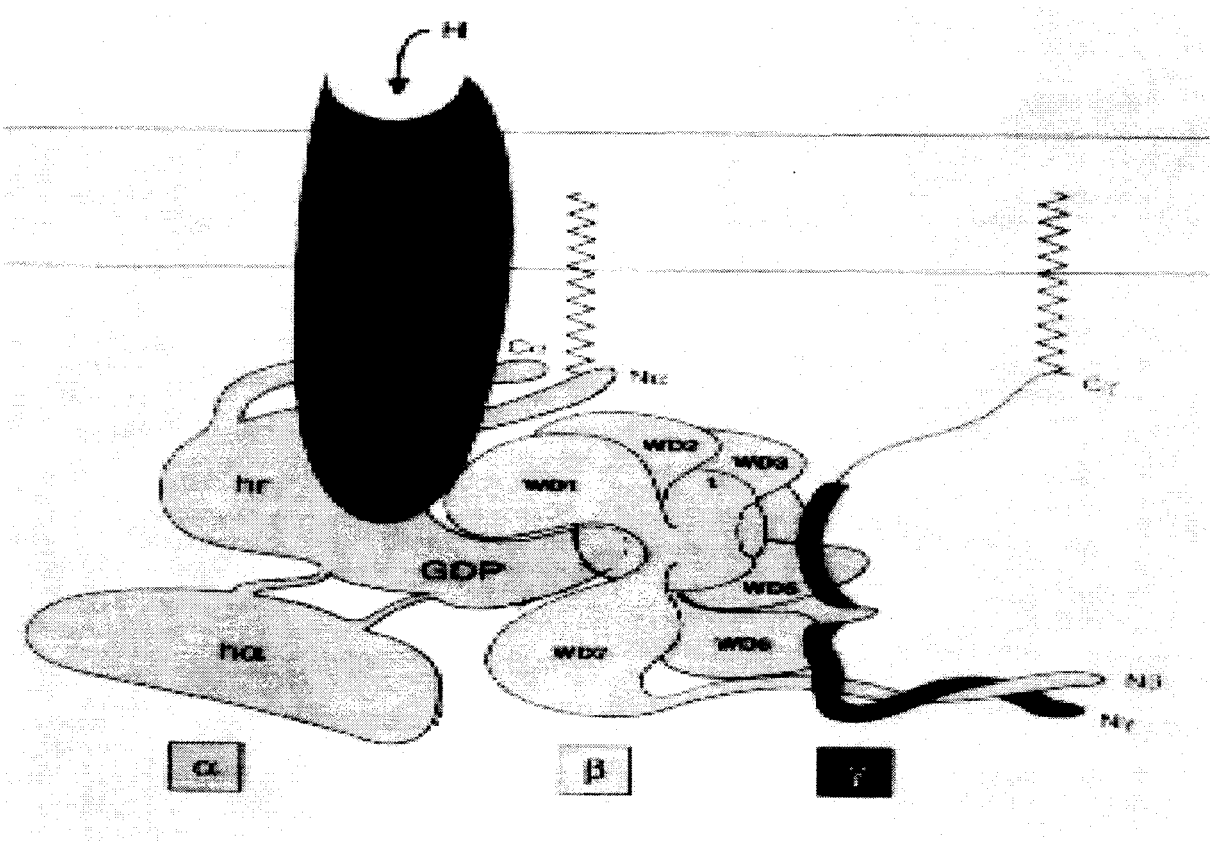
homologie très importante (82,5%) avec la séquence de la protéine RACK1 de rat publiée en 1994 (Ron *et al.*). L'homologie de séquence avec les protéines RACKs des autres espèces est très importante comme il est possible de le constater sur l'alignement des différentes séquences présenté en figure 3. Le pourcentage d'homologie le plus fort est obtenu avec la RACK de mammifères et d'oiseaux, puis viennent par ordre décroissant : l'hydre (80%), les champignons (71%), l'algue (70%), le riz, le navet et le tabac (64, 63, 64% respectivement), la levure (50%) et les protozoaires (47%) (Figure 1, Lardans *et al.*, soumis). Avant de passer à la production de la protéine recombinante dans un vecteur d'expression, la transcription et la traduction *in vitro* de la protéine ont été réalisées en présence de 35S-méthionine afin de contrôler avant sous clonage la possibilité d'obtenir une protéine traduite à partir de l'insert du clone de la Bg RACK. La protéine synthétisée et visualisée par autoradiographie possède un poids moléculaire voisin de 34 kDa (Figure 4). La protéine recombinante a été produite en vecteur d'expression pQE30 et purifiée sur résine de nickel (Figure 5).

B. Caractérisation de Bg RACK

Les sérums des rats immunisés avec la Bg RACK recombinante ont été testés en Western blot en même temps qu'un sérum de souris immunisée avec le fragment C terminal de 24 kDa de la RACK de *Leishmania major* (anti-P24) qui nous a été aimablement fourni par le Dr Glaichenhaus (Figure 6). La protéine Bg RACK recombinante est reconnue par le sérum des rats immunisés avec la Bg RACK et également par le sérum de souris anti-P24. La protéine Bg RACK a été immunolocalisée dans des hémocytes de mollusques (Figure 7) ainsi qu'au niveau des cellules de la lignée Bge (Figure 4, Lardans *et al.*, soumis). La protéine Bg RACK est retrouvée de façon diffuse dans le cytoplasme, le marquage périnucléaire est bien visible ainsi qu'au niveau de la membrane plasmique. Ces résultats vont dans le sens de précédentes observations localisant les PKCs au niveau des structures membranaires, nucléaires ou cytosquelettiques après activation (Gomez *et al.*, 1995) où elles interagissent avec des protéines qui peuvent être des protéines RACKs. La fonctionnalité de la protéine recombinante a été testée de la façon suivante : la protéine Bg RACK recombinante a été immobilisée sur nitrocellulose et mise en présence de PKCs extraites de cerveau de rat et des activateurs des PKCs. La présence de PKCs fixées à la protéine recombinante est détectée par des anticorps anti-PKCs ; les PKCs se fixent à la fois sur la Bg RACK recombinante (piste 2) et sur la RACK provenant de fraction membranaire de cerveau de rat (piste 1). En absence d'activateurs, Bg RACK ne fixe pas les PKCs de cerveau de rat (piste 3). La piste contrôle (piste 4) correspond à une incubation sans PKCs de cerveau de rat (Figure 3, Lardans *et al.*, soumis). L'interaction de la RACK de *B. glabrata* avec des PKCs hétérologues montre la conservation chez ce mollusque des molécules impliquées dans la transduction du signal via les PKCs (voir discussion, Lardans *et al.*, soumis).

C. *Discussion*

La Bg RACK comme les autres RACKs appartient à la famille des protéines à répétition WD (Trp-Asp) (Figure 2, Lardans *et al.*, soumis), ce motif est trouvé également au niveau de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire (van der Voorn et Ploegh, 1992 ; Neer *et al.*, 1994). La comparaison entre les différentes séquences de RACKs montre que pour une protéine donnée, les différentes répétitions WD-40 sont moins similaires les unes aux autres que ne le sont les répétitions en positions équivalentes dans les différentes protéines de la famille des protéines RACKs. Il apparaît que les protéines ayant un motif WD présentent une structure tridimensionnelle en hélice de bateau, très différente d'une protéine transmembranaire. Dans le cas de la Gβ, c'est l'extrémité Nterminale (Nt) qui permet par son interaction avec la Gγ l'ancrage à la membrane (Bockaert, 1996).



Morphologie artistique de l'hétérodimère αβγ (d'après Bockaert, 1996)

Pour Bg RACK, nous avons procédé à une recherche de motif dans la banque PROSITE au niveau des séquences primaires Nt et Cterminale (Ct) de Bg RACK de manière à identifier un possible motif d'ancrage à la membrane. La partie Ct de Bg RACK est très homologue à la Gβ contrairement à la partie Nt de la protéine présentant une homologie avec la séquence signature de

l'involucrine (voir ci-dessous). L'index de similarité entre les 11 acides aminés de la signature de l'involucrine et la portion Nt de la RACK est de 54,5%.

```
involucrine     [1]MSQQXTLPVTL
                   :..: :: .::
Bg RACK         [1]MTEQMTLRGTL
```

L'involucrine est une protéine présente dans les kératinocytes et qui posséde plusieurs répétitions de la signature involucrine. Cette protéine est liée par action d'une transglutaminase qui forme une liaison covalente au niveau de protéines de la membrane cellulaire qui ne peuvent plus être extraites de cette membrane (Simon et Green, 1984 ; Green et Djian, 1992). Dans les kératinocytes, les transglutaminases ont pour rôle de fabriquer une enveloppe qui devient résistante aux détergents (Folk, 1980).

La présence d'une glutamine dans la signature de l'involucrine de Bg RACK, nous suggère que la séquence Nt de la RACK pourrait être impliquée dans l'ancrage de RACK à la membrane. L'analyse des séquences Nt des différentes RACKs a montré que seules les RACKs de mammifères, d'oiseaux, d'hydre et de mollusque ont cette signature avec la présence d'une glutamine dans cette séquence consensus. Les séquences de RACK des *Leishmania* sont totalement délétées de cette séquence Nt et le motif n'est pas retrouvé dans la séquence primaire des RACKs des autres espèces analysées. Par des techniques de Western blot, il serait envisageable de rechercher des protéines pouvant jouer le rôle d'ancrage de Bg RACK à la membrane. Cependant, il convient de considérer ces hypothèses avec précaution en prenant principalement en considération qu'il n'existe pas à ce jour de structure tridimensionnelle déterminée par cristallographie des protéines présentant un motif WD-40.

Le rôle fonctionnel de Bg RACK dans l'activation des hémocytes via la translocation des PKCs pourrait être envisagée chez les cellules Bge.

En effet, en lipofectant la protéine Bg RACK recombinante ou des peptides dérivés de Bg RACK et impliqués dans la translocation des PKCs, on peut imaginer de bloquer l'activation des cellules Bge mises en contact avec le parasite dans le modèle de coculture précédemment décrit. Des expériences analogues ont été réalisées avec succès chez les oocytes de xénope où les auteurs ont montré que l'introduction de RACK retarde la maturation des oocytes déclenchées par l'insuline (Smith et Mochly-Rosen, 1992). Les PKCs semblent être impliquées dans de nombreux phénomènes lors de l'interaction entre le parasite et la cellule sanguine de mollusque comme par exemple l'adhérence mais également la production par l'hémocyte de radicaux superoxides nocifs pour le parasite (Dikkeboom *et al.*, 1987 ; Shozawa *et al.*, 1989). Nous disposons actuellement d'un systéme de stimulation *in vitro* des cellules Bge par l'insuline (E. Aroca, communication personnelle), cependant l'implication de la voie des PKCs dans ce système doit être vérifiée.

En ce qui concerne les gènes des protéines RACKs, peu d'informations sont disponibles. Seul le gène de la protéine de *Chlamydomonas* (Cblp) a été séquencé. La région 5' non traduite contient deux éléments de réponse à la lumière (Schloss, 1990). Le caractère inductible des autres protéines RACKs et en particulier de Bg RACK reste à étudier.

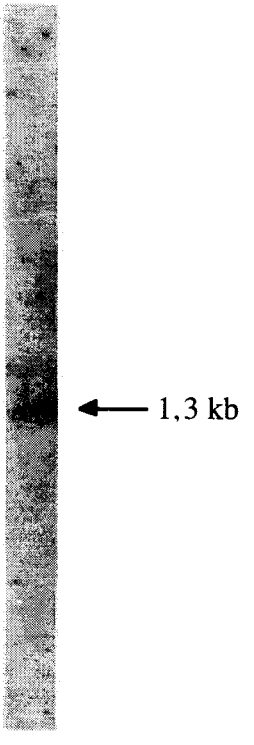


Figure 1 : Northern blot

Le Northern blot a été réalisé à partir de 5 mg d'ARNm de *Biomphalaria glabrata* en utilisant comme sonde un fragment de 320 pb présentant une séquence codante pour une protéine très homologue aux protéines Gβ. Cette séquence a été obtenue de manière fortuite au cours d'une recherche par PCR de la molécule apparentée au TNF et mise en évidence dans l'hémolymphe du mollusque (Oukem-Boyer *et al.*, 1995). La sonde est marquée par l'α^{32}P-dCTP par la technique de random priming (Megaprime, Pharmacia). La radioactivité non incorporée est éliminée sur colonne de Sepharose G50. Après 4 h de préhybridation à 65°C (0,1% SDS, 5x Denhardt's, 6x SSC, 500 µg/ml d'ADN de sperme de hareng bouilli 10 min), la sonde dénaturée est ajoutée à raison de 10^6 cpm/ml et l'incubation se poursuit toute la nuit à 65°C. Les lavages sont effectués de la façon suivante : 2 x 30 min 0,1% SDS, 2 x SSC ; 2 x 20 min 0,1% SDS, 1 x SSC ; 1 x 5 min 0,1% SDS, 0,2 x SSC. Après autoradiographie, une bande de 1,3 kb a pu être visualisée.

```
CTTTAGTGTGTGATATAAATCGTAGTGGATCGTTGTCGAACGTTAGCATCAAAACTACAAAATGACGGAGC 70
                                                              M  T  E      3*
AGATGACATTACGTGGTACCCTTCAGGGTCATGGTGGTTGGGTCACGCAAATTGCGACTACACCGCAATAT 140
Q  M  T  L  R  G  T  L  Q  G  H  G  G  W  V  T  Q  I  A  T  T  P  Q  Y    27*
CCGGACATGATTCTGTCGGCCTCTCGCGACAAATCACTTATTGTGTGGCGTTTGACTCGTGACGAATCCAG210
 P  D  M  I  L  S  A  S  R  D  K  S  L  I  V  W  R  L  T  R  D  E  S  S   50*
CTATGGTGTCCCTCAGAAGTCTCTTCATGGTCATGGACATTTCGTGTCTGATGTCATTTTGTCATCAGATG 280
  Y  G  V  P  Q  K  S  L  H  G  H  G  H  F  V  S  D  V  I  L  S  S  D    74*
GACAGTTTGCTCTCTCTGGATCGTGGGATCATACTCTTCGCTTGTGGGATCTAAGCACTGGTCAGACCACC 350
G  Q  F  A  L  S  G  S  W  D  H  T  L  R  L  W  D  L  S  T  G  Q  T  T   98*
CGTCGTTTTGTTGGTCATACGAAAGACGTCCTGAGTGTTGCCTTTTCTGCTGACAACCGTCAGATTGTTTC 420
 R  R  F  V  G  H  T  K  D  V  L  S  V  A  F  S  A  D  N  R  Q  I  V  S  122*
TGGCTCACGTGATAAGACTATCAAGCTCTGGAACACGTTGGGTGTGTGCAAATACACCATCCAGGATGATT 490
  G  S  R  D  K  T  I  K  L  W  N  T  L  G  V  C  K  Y  T  I  Q  D  D   145*
GTCACACTGACTGGACATCGTGTGTGCGCTTCTCGCCTAACACCCAGAATCCAATCATCGTTTCAAGCGGT 560
C  H  T  D  W  T  S  C  V  R  F  S  P  N  T  Q  N  P  I  I  V  S  S  G  169*
TGGGACAGGCTAGTAAAGGTATGGAATCTGACCAACTGCAAGCTAAAGACAAACCACTACGGTCACACTGG 630
 W  D  R  L  V  K  V  W  N  L  T  N  C  K  L  K  T  N  H  Y  G  H  T  G  193*
TTACGTCAACACTGTAACAGTTTCGCCAGACGGCTCGCTGTGCGCCTCTGGTGGCAAGGACAGCCAGGCAA 700
  Y  V  N  T  V  T  V  S  P  D  G  S  L  C  A  S  G  G  K  D  S  Q  A   216*
TGCTGTGGGACCTCAACGAGGGCAAGCACCTGTACACTCTGGACGGTGCTGGCGACACGATAAACGCTCTC 770
M  L  W  D  L  N  E  G  K  H  L  Y  T  L  D  G  A  G  D  T  I  N  A  L  240*
TGCTTCAGTCCGAACCGCTACTGGCTGTGCGTTGCATCAGGACCGAGTATCAAGATTTGGGATCTCGAGGG 840
 C  F  S  P  N  R  Y  W  L  C  V  A  S  G  P  S  I  K  I  W  D  L  E  G  264*
CAAGGTTGTGGTTGATGAGCTCAAGCCAGAAGTGATGGGAACTACGAGCAAAGCTCCGACTTGTCTGTCGT 910
  K  V  V  V  D  E  L  K  P  E  V  M  G  T  T  S  K  A  P  T  C  L  S   287*
TGGCCTGGTCCGCTGACGGTCAAACGCTGTTTGCTGGCTACACCGACAAACTGATCCGCGTCTGGCAGGTC 980
L  A  W  S  A  D  G  Q  T  L  F  A  G  Y  T  D  K  L  I  R  V  W  Q  V  311*
TCGATGGTCTCGAGATAGACACTCCACACTCACTGCTAACTAAAGTAACTATCTAATTACTGCTGCTACTA 1050
 S  M  V  S  R ***                                                       316*
CTGCATTAGCAAGGGCTGGCCACTGTCGAGTGAGTTGATGAATGTCTTGAGCCGCCGACGACGACGAAGAT 1120

TTGATTTCACGCGCCTAGAATATCGGTGGTTGTTGCATTGATTAATTAGTATGTGACGTTGAAAGAGTGAA 1190

ATAAATACACGGCGTCAACGATTGGACT                                            1235
```

Figure 2 : Séquence nucléique et séquence protéique déduite de l'ADN complémentaire Bg RACK.

La banque lambda ZAPII (Stratagène) a été réalisée à partir de 0,9 µg d'ARNm extrait de corps entiers de *Biomphalaria glabrata.* Nous avons obtenu 1 400 000 clones recombinants. Après amplification, le titre de la banque était de 10^{10} pfu/ml. La banque amplifiée a été criblée avec le fragment PCR de 320 pb. Après excision *in vivo* du phagemide pBluescript, l'ADN complémentaire a été totalement séquencé. La séquence de 1235 bp possède un cadre ouvert de lecture de 948 bp codant pour une protéine de 316 acides aminés. Les régions 5' et 3' non codantes sont respectivement de 61 et 225 bp. Le codon d'initiation est en caractère gras. Le signal de polyadénylation est souligné.

```
1   MS--QESLVLRGTMRAHTDWVTAIATAVD-NSDM-IVTSSRDKSIIVWS
1   MA---EGLVLKGTMRAHTDMVTAIATPID-NSDT-IVSASRDKSIIVWK
1   MAGAQESLVLAGVMHGHNDVVTAIATPID-NSPF-IVSSSRDKSLLVWD
1   MA---ETLTLRATLKGHTNWVTAIATPLDPSSNT-LLSASRDKSVLVWE
1   MT---EQMTLRGTLKGHNGWVTQIATTPQ-FPDM-ILSASRDKTIIMWK
1   MT---EQMTLRGTLQGHGGWVTQIATTPQ-YPDM-ILSASRDKSLIVWR
1   M----EQMTLRGTLKGHNGWVTQIATTPQ-NPDL-ILSASRDKTLIQWQ
1   MAS-NEVLVLRGTLEGHNGWVTSLATSAGQ-PNL-LLSASRDKTLISWK
1   MA---EQLILKGTLEGHNGWVTSLATSLE-NPNM-LLSGSRDKSLIIWN
1   MN--------YEGHLKGHRGWVTSLACPQQAGSYIKVVSTSRDGTAISWK
1   MN--------YEGHLKGHRGWVTSLACPQQAGSYIKVVSTSRDGTAISWK
1   MN--------YEGHLKGHRGWVTSLACPQQAGSYIKVVSTSRDGTVISWK

46  ITK----------DGPQYGVPRRRLTGHGHFVQDVVLSSDGMFALSGSWD
45  LTK----------DDKSYGVRQRRLTGHSHFVEDVVLSSDGQFALSGSWD
48  LTNPVQNVGEGAGASEYGVPFRRLTGHSHFVQDVVLSSDGQFALSGSWD
46  LER---------SE-SNYGYARKALRGHSHFVQDVVISSDGQFCLTGSWD
45  LTR---------DE-TNYGIPQRALRGHSHFVSDVVISSDGQFALSGSWD
45  LTR---------DE-SSYGVPQKSLHGHGHFVSDVILSSDGQFALSGSWD
44  LTR---------DDQTNYGFPKKCLTGHNHFVSDVVLSSDGQFALSCSWD
47  LT----------GDDQKFGVPVRSFKGHSHIVQDCTLTADGAYALSASWD
45  LTR---------DE-TSYGYPKRRLHGHSHIVSDCVISSDGAYALSASWD
43  ANPDRHSV-----DSDYGLPSHRLEGHTGFVSCVSLAHATDYALTASWD
43  ANPDRHSV-----DSDYGLPSHRLEGHTGFVSCVSLAHATDYALTASWD
43  ANPDRHSV-----DSDYGLPNHRLEGHTGFVSCVSLAHATDYALTASWD

86  GELRLWDLQAGTTARRFVGHTKDVLSVAFSVDNRQIVSASRDKSIRLWN
85  GELRLWDLAAGVSTRRFVGHTKDVLSVAFSLDNRQIVSASRDRTIKLWN
97  GELRLWDLSTGVTTRRFVGHDKDVLSVAFSVDNRQIVSASRDRTIKLWN
86  GTLRLWDLNTGTTTRRFVGHTKDVLSVAFSVDNRQIVSGSRDKTIKLWN
85  GTLRLWDLTTGTTTRRFVGHTKDVLSVAFSSDNRQIVSGSRDKTIKLWN
85  HTLRLWDLSTGQTTRRFVGHTKDVLSVAFSADNRQIVSGSRDKTIKLWN
85  KTLRLWDLNQGITTKQFVGHTKDVLSVAFSADNRQIVSGSRDNTIKLWN
87  KTLRLWDVATGETYQRFVGHKSDVMSVDIDKKASMIISGSRDKTIKVWT
85  KTLRLWELSTGTTTRRFVGHTNDVLSVSFSADNRQIVSGSRDRTIKLWN
87  RSIRMWDLRNGQCQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDRLIVSAGRDNVIRVWN
87  RSIRMWDLRNGQCQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDRLIVSAGRDNVIRVWN
87  RSIRMWDLRNGQCQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDRLIVSAGRDNVIRVWN

135 TLGECKYTI-QD---GDSHSDWVSCVRFSPN----NLQPTIVSGSWDRT
134 TLGECKYTISEG---GEGHRDWVSCVRFSPN----TLQPTIVSASCDKT
146 TLGECKYTIGGDLGGGEGHNGWVSCVRFSPN----TFQPTIVSGSWDRT
135 TLGECKYTIGEP----EGHTEWVSCVRFSPM----TTNPIIVSGGWDKM
134 TLGVCKYTVQD-----ESHSEWVSCVRFSPN----SSNPIIVSCGWDKL
134 TLGVCKYTIQD-----DCHTDWTSCVRFSPN----TQNPIIVSSGWDRL
134 TLGQCKYTIQD-----ESHSEWVSCVRFSPN----TQNPIIVSCGWDKM
136 IKGQC-------LATLLGHNDWVSQVRVVPNEKADDDSVTIISAGNDKM
134 TLGDCKFTITE-----KGHTEWVSCVRFSPN----PQNPVIVSSGWDKL
136 VAGECMHEFLR-----DGHEDWVSSICFSPS----LEHPIVVSGSWDNT
136 VAGECMHEFLR-----DGHEDWVSSICFSPS----LEHPIVVSGSWDNT
136 VAGECMHEFLR-----DGHEDWVSSICFSPS----LEHPIVVSGSWDNT
```

```
176 VKIWNLTNCKLRLTLAGHTGYVNTPAVSPDGSLCASGGKDGVILLWDLA
176 VKVWNLSNCKLRSTLAGHTGYVSTVAVSPDGSLCASGGKDGVVLLWDLA
191 VKVWNLTNCKLRCNLEGHGGYVNAVAVSPDGSLCASGGKDGVTLLWDLA
176 VKVWNLTNCKLKNNLVGHHGYVNTVTVSPDGSLCASGGKDGIAMLWDLA
174 VKVWNLANCKLKTNHIGHTGYLNTVTVSPDGSLCASGGKDGQAMLWDLN
174 VKVWNLTNCKLKTNHYGHTGYVNTVTVSPDGSLCASGGKDSQAMLWDLN
174 VKVWNLTNCKLKTNHFGHTGYLNAVTVSPDGSLCASGGKDGNAMLWDLN
178 VKAWNLNQFQIEADFIGHNSNINTLTASPDGTLIASAGKDGEIMLWNLA
174 VKVWELSSCKLQTDHIGHTGYINAVTISPDGSLCASGGKDGTTMLWDLN
176 IKVWNVNGGKCERTLKGHSNYVSTVTVSPDGSLCASGGKDGAALLWDLS
176 IKVWNVNGGKCERTLKGHSNYVSTVTVSPDGSLCASGGKDGAALLWDLS
176 IKVWNVNGGKCERTLKGHSNYVSTVTVSPDGSLCASGGKDGAALLWDLS

225 EGKKLYSLE-SGSIIHSLCFSPNRYWLCAATESSIKIWDLESKSIVDDL
225 EGKKLYSLE-ANSVIHALCFTPNRYWLCAATEQGIKIWDLESKTVVEDL
240 EGKRLYSLD-AGSIIHSLCFSPNRYWLCAATQDSIKIWDLESKHIVQDL
225 EGKRLYSLD-AGDVIHCLCFSPNRYWLCAATQSSIKIWDLESKSIVDDL
223 EGKHLYTLDG-GDIINALCFSPNRYWLCAATGPSIKIWDLEGKIIVDEL
223 EGKHLYTLDGAGDTINALCFSPNRYWLCVASGPSIKIWDLEGKVVVDEL
223 EGKHLYTLDG-GNVINALCFSPNRYWLCAATGPMIKIWDLEMKSVVDEL
227 AKKAMYTLSAQDEVF-SLAFSPNRYWLAAATATGIKVFSLDPQYLVDDL
223 ESKHLYSLN-ANDEIHALVFSPNRYWLCAATSSSIIFDLEKKSKVDEL
225 TGEQLFKINVESP-INQIAFSPNRFWMCVATERSLSVYDLESKAVIAEL
225 TGEQLFKINVESP-INQIAFSPNRFWMCVATERSLSVYDLESKAVIAEL
225 TGEQLFKINVESP-INQIGFSPNRFWMCVATERSLSVYDLESKAVIAEL

273 KVDLKQESEMS-SEGTASGKNKVIYCTSLSWSADGSTLFSGYTDGLIRV
273 KVDLKAEAEKSDGSGTAATKRKVIYCTSLNWSADGSTLFSGYTDGVIRV
288 KPEI-----------PVSKNQMLYCTSLNWSADGSTLYAGYTDGTIRI
273 RPEFN----------ITSKKAQVPYCVSLAWSADGSTLYSGYTDGQIRV
271 KQEVI----------STSSKAEPPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVRV
272 KPEVM----------GTTSK--APTCLSLAWSADGQTLFAGYTDKLIRV
271 KPGVI----------GISTKSRAADCISLAWSADGQTLFAGYTDNLIRV
275 RPEF----------AGYSKAAEPHAVSLAWSADGQTLFAGYTDNVIRV
271 KPEFQ----------NIGKKSREPECVSLAWSADGQTLFAGYTDNIIRA
273 TPD----------GAKPSECISIAWSADGNTLYSGHKDNLIRV
273 TPD----------GAKPSECISIAWSADGNTLYSGHKDNLIRV
273 TPD----------GAKPSECISIAWSADGNTLYSGHKDNLIRV

321 WGIDRY          Nicotiana tabacum
322 WGIGRY          Brassica napus
325 YKISGFSYAG      Oryza sativa
312 WAVGH-S--L      Chlamydomonas reinhardtii
310 WQVTIGT--R      Mammifères et Oiseaux
309 WQVSMVS--R      Biomphalaria glabrata
310 WQVTRSS--Q      Hydra vulgaris
313 WQVMT---AN      Saccharomyces cerevisiae
310 WGV-MSR--A      Neurospora crassa
306 WSISD---AE      Leishmania chagasi
306 WSISD---AE      Leishmania infantum
306 WSISD---AE      Leishmania major
```

Figure 3 : Alignement des séquences protéiques de RACKs

Cet alignement a été réalisé sur DNASTAR par la méthode Clustal. Les résidus ombrés représentent les acides aminés identiques à ceux de la protéine de *Biomphalaria glabrata.* Des décalages ont dû être introduits dans les séquences protéiques de façon à optimiser les alignements, ces décalages sont matérialisés par des traits horizontaux (-). Les acides aminés encadrés correspondent à la séquence consensus de la famille des protéines ayant des répétitions WD-40 (Trp-Asp). Ce motif est le suivant $\{X_{6\text{-}94}\text{-}(GH\text{-}X_{23\text{-}36}\text{-}D\text{-}X_5\text{-}WD)\}\ N_{4\text{-}8}$. Sept motifs consensus sont contenus dans la séquence de la Bg RACK. Les séquences soulignées correspondent aux peptides inhibant l'interaction entre la RACK et les PKCs.

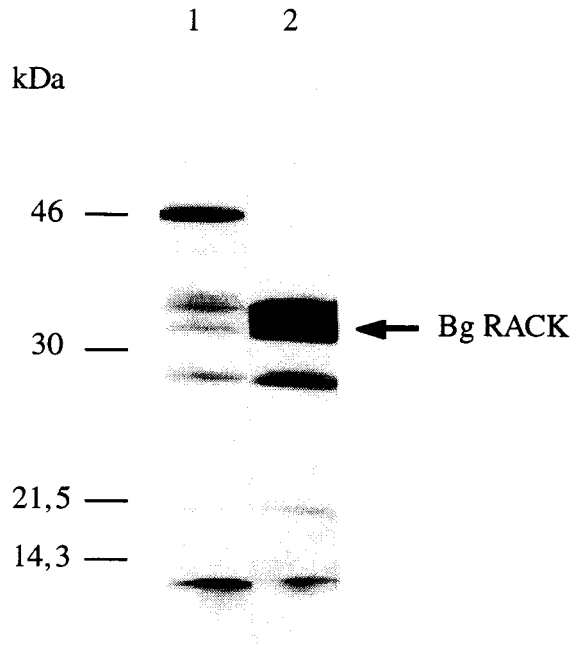


Figure 4 : Transcription et traduction in vitro à partir du plasmide pBluescript contenant l'ADN complémentaire codant pour la protéine Bg RACK.

La réaction de TNT est réalisée selon le protocole préconisé par le fournisseur (Proméga) en présence de 2 µg d'ADN plasmidique et 50 % de lysat de réticulocytes de lapin. 1/10 de la réaction est analysée en SDS-PAGE (gel 12%) en conditions dénaturantes ; le gel est séché et exposé pour autoradiographie. Piste 1 : plasmide irrelevant contenant une autre séquence ADNc, piste 2 : plasmide Bluescript contenant la séquence ADNc de Bg RACK.

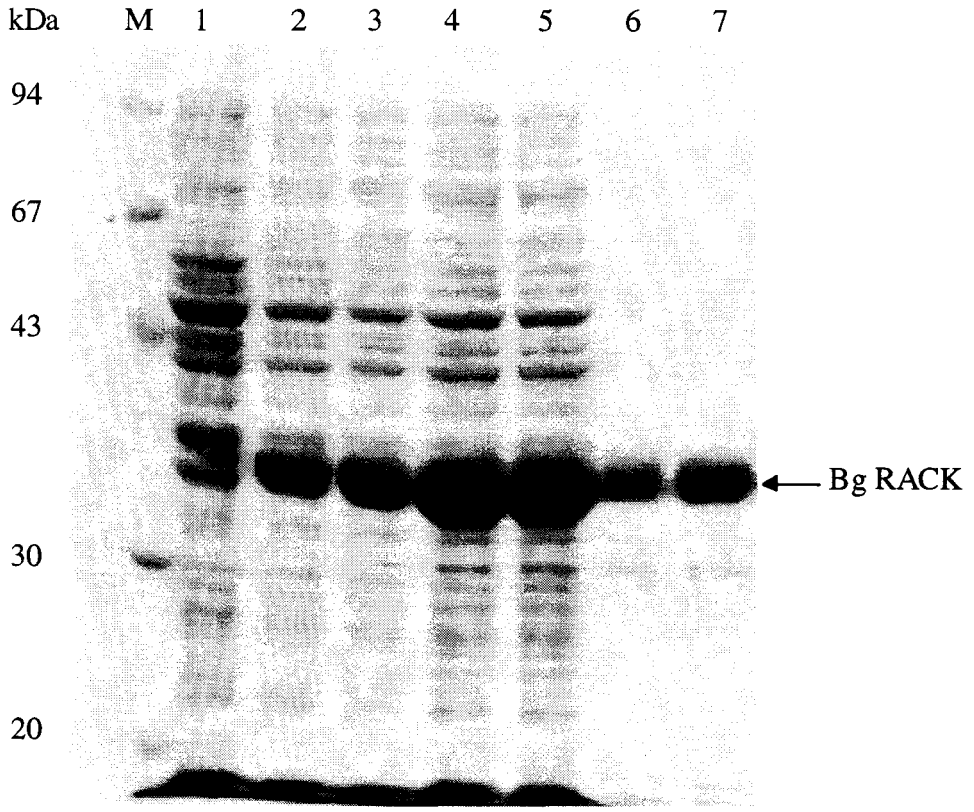


Figure 5 : Production et purification de la protéine Bg RACK recombinante en vecteur d'expression pQE 30 (Qiagen).

L'expression de la protéine recombinante est induite par addition d'IPTG 2mM en concentration finale. A différents temps après l'induction, les bactéries sont centrifugées et remises en suspension dans du tampon B de lyse (Qiagen). Les débris cellulaires sont éliminés et la protéine est purifiée du lysat cellulaire sur résine de Nickel Ni-NTA (Qiagen). La protéine recombinante est éluée par l'EDTA 100mM. Piste 1 : lysat total non induit ; pistes 2 - 5 : lysat total après 1 h (2), 2 h (3), 3 h (4) ou 4 h (5) d'induction ; pistes 6-7 : protéine Bg RACK purifiée sur résine de Ni-NTA à partir d'une culture induite pendant 4 h, 1ère élution (6), 2nde élution (7). Le dosage de la protéine recombinante (kit BCA, Pharmacia) indique qu'une quantité totale de 600 µg a été obtenue à partir de 80 ml de culture bactérienne induite.

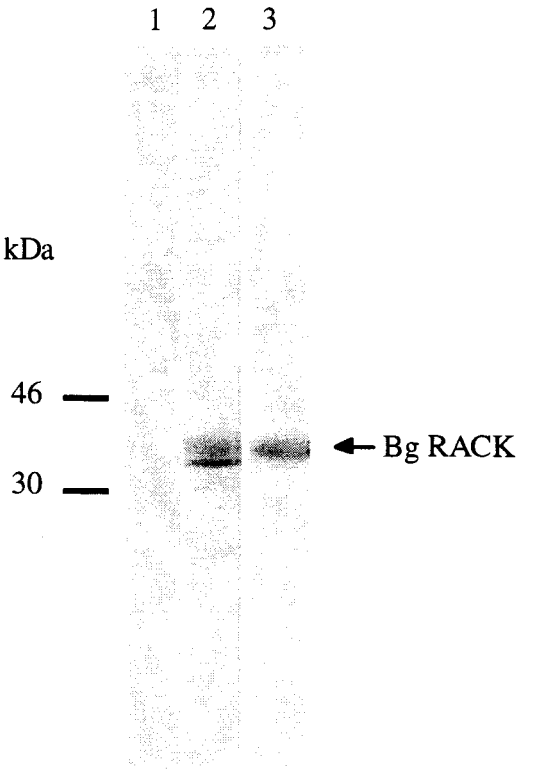
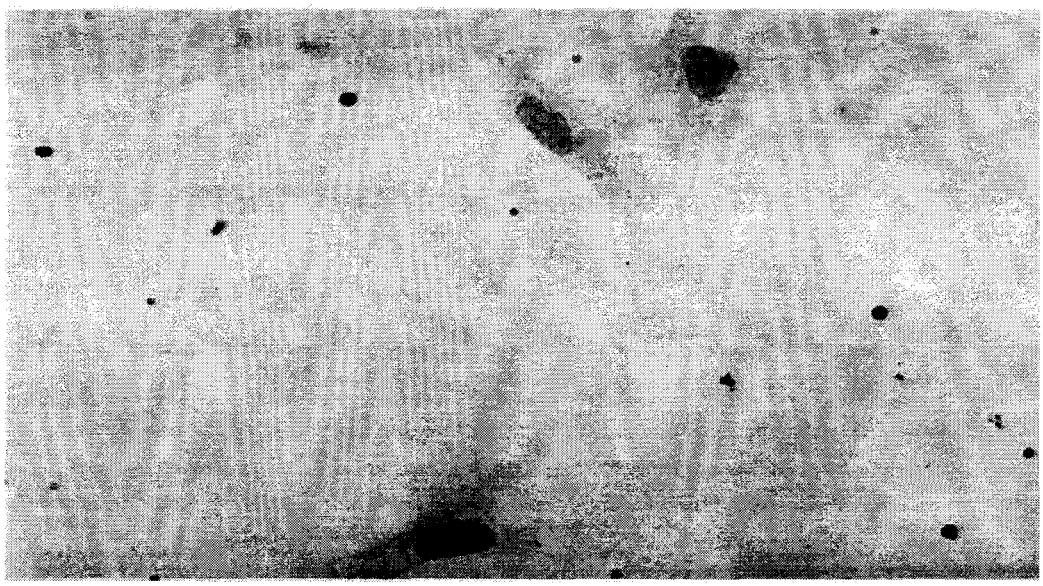


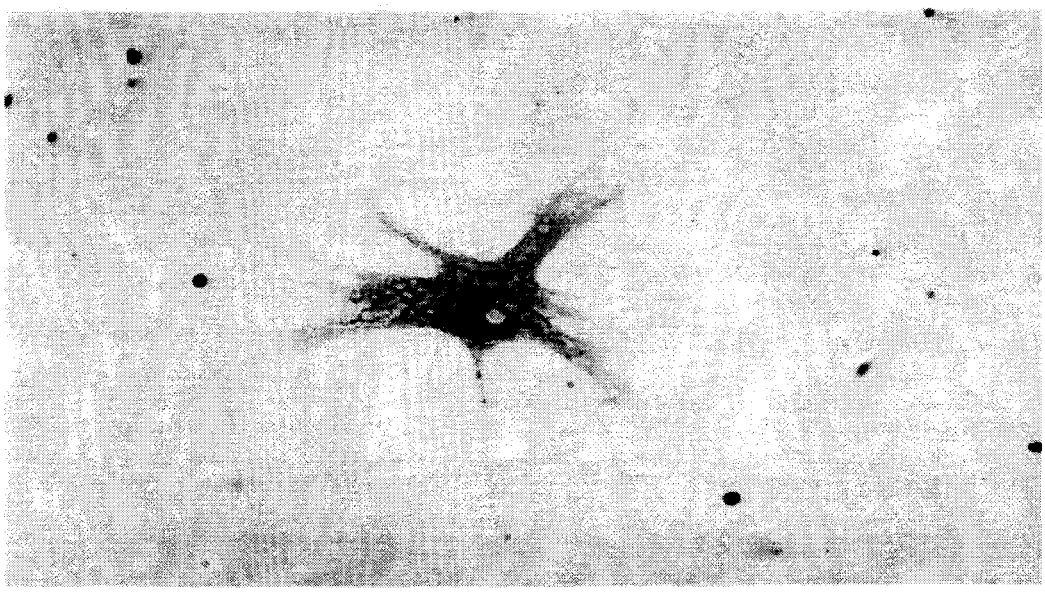
Figure 6 : Western blot

Des rats Fisher de 6 semaines ont été immunisés avec 80 µg de protéine Bg RACK recombinante en présence d'adjuvant complet de Freund. Trois rappels ont été effectués à 10 jours d'intervalle avec 50 µg de Bg RACK recombinante en présence d'adjuvant incomplet de Freund. Les rats ont saignés par ponction rétro-orbitale.

La protéine recombinante Bg RACK a été déposée sur gel SDS-PAGE (gel à 12%) en condition réductrice et transférée sur nitrocellulose (Schleicher & Schull). La saturation a été réalisée en PBS-BSA 1% toute la nuit à 4°C. Après lavage en PBS, l'incubation avec les sérums de rats anti-Bg-RACK a été réalisée en PBS-BSA 1% pendant 2 h 30 à température ambiante, suivie de 3 lavages de 5 min en PBS-Tween 0,04% et d'un lavage en PBS. Le conjugué de lapin anti-IgG (H+L) de rat couplé à la peroxidase (Sigma Immunochemical, St Louis, USA) 1/500 a été incubé 1 h 30 à température ambiante. Après un nouveau lavage, la révélation a été obtenue en présence d'α-chloro 1-naphtol et d'H_2O_2. Piste 1 : sérum de rat pré-immun (1/1000), piste 2 : sérum de rat immunisé avec la protéine Bg RACK recombinante (1/1000), piste 3 : sérum de souris anti-P24 (1/500) fourni par Dr Glaichenhaus (CNRS, UPR 411, Valbonne, France) obtenu après immunisation d'animaux avec un fragment de 24kDa de la protéine RACK de *Leishmania* (Mougneau *et al.*, 1995) et révélé par un conjugué de chèvre anti-souris IgG (H+L) marqué à la peroxidase 1/500 (Sanofi-Diagnostic Pasteur, France).



A



B

Figure 7 : Immunocytolocalisation de Bg RACK dans les hémocytes de Biomphalaria glabrata.

L'hémolymphe est collectée par rétractation du pied à partir de mollusques adultes. Les hémocytes adhèrent à la lame de verre en 15 min en atmosphère humide, ils sont ensuite fixés en PBS 1/3, 3% de paraformaldéhyde pendant 8 min et perméabilisés en PBS 1/3, Triton X100 à 0,3% pendant 4 min. Après lavage en PBS 1/3, les lames sont saturées en PBS 1/3 BSA 1%, sérum de lapin sain 1/50 durant 2 h. L'activité de la peroxydase endogène est bloquée par incubation des lames pendant 20 min en présence de PBS 1/3, H_2O_2 3%. Les lames sont ensuite incubées en présence de sérum de rat pré-immun 1/50 (photo A) ou de sérum de rat immunisé par la protéine recombinante Bg RACK 1/50 (photo B) pendant 2 h à température ambiante. Le conjugué de lapin anti-rat marqué à la peroxydase (1/100) est mis en contact pendant 90 min à température ambiante. La révélation s'effectue en présence de DAB (Sigma) et d'H_2O_2 (0,03%). Les noyaux sont contre-colorés à l'hématoxyline de Harris.

Characterization of an intracellular receptor for activated protein kinase C (RACK) from the mollusc *Biomphalaria glabrata,* the intermediate host for *Schistosoma mansoni*

Vinca LARDANS, Esteban SERRA and Colette DISSOUS

From the Unité INSERM 167, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 LILLE, FRANCE

Running head: Receptor for PKCs of *B.glabrata*

Corresponding author : Colette DISSOUS, Unité INSERM 167, Institut Pasteur, 59019 Lille, Cedex, France, Tel : 03 20 87 73 50 ; Fax: 03 20 87 78 88 ; e-mail : Colette.Dissous@pasteur-lille.fr.

The sequence data reported herein has been submitted to Genbank and assigned the accession number U 49437

Key words: *Biomphalaria glabrata*, mollusc, RACK protein, PKC

Index descriptors and abbreviations: *Biomphalaria glabrata* ; Mollusca ; *Schistosoma mansoni* ; Trematoda ; Kilodalton (kDa) ; Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ; Protein kinase C (PKC) ; Receptor for activated PKC (RACK) ; Phosphatidyl serine (PdtSer) ; Diacyglycerol (DAG).

Summary : A receptor for activated protein kinase C (RACK) was characterized from the mollusc *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host for the human parasite *Schistosoma mansoni*. This protein was shown to possess structural and functional characteristics of other RACK proteins from various cells and organisms. Its ability to bind mammalian PKCs also confirmed the conservation of PKC and RACK interactive domains throughout evolution. Results of immunolocalization indicated the presence of Bg RACK in the cytoplasm of mollusc hemocytes and *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells with a more intense staining around nucleus. These results are in agreement with the association of RACK proteins with cytoskeletal elements.

INTRODUCTION

Protein kinases C are a family of serine/threonine kinases that act as signal transducers. They regulate many cellular functions in eukaryotic cells including differentiation, cell growth and secretion. PKCs also play a central role in tumor promotion, transformation and other signal transduction pathways. Activation of PKCs results in phosphorylation of specific proteins and their selective activity is dependent on specific subcellular targeting that allows their accessibility to selected substrates (Liu 1996).

PKC isoenzymes are among the first signalling proteins that have been shown to undergo translocation from the cytosol to the particulate fraction upon activation. Translocation of PKCs was first thought to reflect a direct binding of the enzyme to membrane lipids but further data indicated that proteins could also anchor activated PKCs at the site of translocation (Newton 1995). Many of these PKC-targeting proteins, essentially implied in cytoskeleton functions, constitute potential substrates for PKC and their association with the enzyme is regulated by phosphorylation (Chapline *et al.* 1993). Other proteins interacting with C-kinase (PICKs) have been identified. PICK1 located at the nucleus periphery represents a PKC substrate but its binding capacity is independent on its state of phosphorylation (Staudinger *et al.* 1995).

Another class of proteins is able to bind specifically PKC isoenzymes but not via the catalytic site. These molecules, termed RACKs (receptors for activated C-kinases), are not substrates for PKC and their role consists to increase substrate phosphorylation by stabilizing the PKC active form (Mochly-Rosen *et al.* 1991). One of these receptors (RACK1) has been shown to be homologous to the β subunit of G-proteins.The protein fulfills RACK criteria: its binding to PKC is dependent on the presence of PKC activators, it is not affected by substrate peptides and it is saturable and specific (Ron *et al.*, 1994). RACK proteins have been characterized in different organisms from the animal and plant kingdoms (Schloss 1990 ; Guillemot *et al.* 1989 ; Mueller *et al.* 1995 ; Mougneau *et al.* 1995 ; Iwasaki *et al.* 1995).

Molecular studies concerning relationships between the parasite *Schistosoma mansoni* and its host *Biomphalaria glabrata*, have led us to clone and characterize the RACK1 homologue of the mollusc (Bg RACK). Comparative analysis indicated the structural homology between Bg RACK and other related proteins and the capacity of the mollusc protein to bind mammalian PKC isoenzymes confirmed its functional conservation throughout evolution. This protein is likely to be involved in intracellular signal transduction in hemocytes activated during mollusc infection.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Laboratory bred *Biomphalaria glabrata* (albino strain) were used in this study. Hemolymph was collected from adult snails (1cm diameter) following foot puncture. *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC CRL 1494 ; Rockville, Maryland) and maintained at 26°C in Bge medium (Hansen 1976) supplemented with heat-inactivated 10% fetal calf serum (Sigma).

Isolation of a clone encoding Bg RACK

A λZAP II library was prepared from poly A^+ mRNA extracted from complete bodies of *B.glabrata* snails, according to the procedure recommended by suppliers (Stratagene). Screening was performed using a mollusc cDNA probe of 320 bp containing a nucleotide sequence coding for a protein sequence homologous to Gβ proteins. The probe was ^{32}P labelled by the random priming technique (Amersham) and hybridized on nitrocellulose filters at 65°C overnight in 6X SSC, 5X Denhardt, 0.1% SDS and 100 μg/ml denaturated herring sperm DNA. Filters were washed two times in 2X SSC, 0.1% SDS for 20 min at room temperature, then two times in 1X SSC, 0.1% SDS at 65°C for 15 min before being exposed for autoradiography. Selected clones were purified before *in vivo* excision of pBluescript (pBS) phagemids.

Sequence analysis

Sequencing of pBS inserts was performed by the chain-termination method (Sanger *et al.* 1977) using both fluorescein labelled M13 universal and reverse primers. Sequencing reactions were analyzed on an automated laser fluorescence (ALF) sequencer apparatus (Pharmacia). Sequence analysis was performed using the DNASTAR program.

Expression of recombinant BgRACK and production of antisera

The complete coding region of BgRACK was PCR amplified and cloned in the plasmid pQE30 (Qiagen Inc.). BamH1 and Sal1 restrictions sites were introduced in the BgRACK specific primers in order to facilitate in frame introduction of the PCR fragment. The recombinant protein was induced and purified by affinity chromatography on a Ni^{++} Agarose matrix as described by the manufacturer.

Antisera were raised in 6 week-old Fisher rats by immunization with 80 μg of recombinant RACK in the presence of complete Freund's adjuvant. Rats were boosted three times, each ten

days, with 50 μg of protein in incomplete Freund's adjuvant. Rats were bled by retro-orbital punction.

Immunocytolocalization

Bge cells or hemocytes from hemolymph were allowed to adhere to slides. They were fixed for 10 min in phosphate buffered saline (PBS) 1/3 diluted and containing 3% (w/v) paraformaldehyde, then treated with 0.1% Triton X100 for permeabilization. Slides were saturated for 2h with 1% BSA and normal rabbit serum (1/50) in PBS. Blocking step was followed by a 2h incubation with rat anti-Bg RACK serum diluted at 1/100 in PBS-BSA 1%. Washed slides were allowed to react for 90 min with alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-rat IgG (Sigma). Reaction was developed for 3 min with new fuchsin substrate system (DAKO, CA). Counterstaining was performed using Harris' hematoxylin.

Binding of PKC to recombinant BgRACK

Subcellular fractionation of Fisher rat brain was performed according to the procedure described (Kikkawa *et al.* 1982). Brain tissue was homogeneized in 20mM Tris-HCl pH7.5, 0.25M sucrose, 2mM EDTA, 10mM EGTA containing 0.2mM PMSF and 100U/ml aprotinin. The homogenate was centrifuged for 1h at 100 000g to pellet the membrane fraction. The supernatant was used as a source of soluble PKC mixture. Binding of rat brain PKCs to RACK proteins was carried out in conditions similar to that used for the mammalian RACK1 protein (Ron *et al.* 1994). Following SDS-PAGE and electroblotting of rat brain membrane proteins or recombinant Bg RACK, strips of nitrocellulose were incubated in overlay blocking buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2M NaCl, 0.1% PEG, 3% BSA) for 2h at room temperature. PKC binding was then carried out in overlay buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1% PEG, 0.1% BSA, 12mM β-mercaptoethanol, 0.2mM PMSF, 100U/ml aprotinin) containing PdtSer (60μg/ml), DAG (2μg/ml), $CaCl_2$ (1mM) and rat soluble PKC mixture (1mg/ml protein). Following three washes in overlay blocking buffer, nitrocellulose strips were incubated with rabbit anti-rat PKC antibodies (Gibco-BRL) for 16h, then washed three times in PBS-Tween 0.04% before incubation with peroxydase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Diagnostic Pasteur, France). Peroxydase activity was detected by the ECL technique (Amersham).

RESULTS AND DISCUSSION

A cDNA clone (320 bp) was isolated serendipitously from a λgt11 expression library of *B.glabrata* and shown to contain a sequence coding for a polypeptide (70 AA) homologous to the C terminal part of the chicken C12.3 and human H12.3 proteins that were first described as Gβ-like proteins (Guillemot *et al.* 1989), then demonstrated to correspond to intracellular receptors for

PKC enzymes and called RACK1 proteins (Ron *et al.* 1994). Further screening of a λZAPII cDNA library of *B.glabrata* using the 320bp cDNA as a probe, allowed us to isolate the complete cDNA encoding the mollusc RACK1 homologue. The sequence was 1218 bp in length and this size was confirmed by Northern blot experiments (results not shown). It contained an open reading frame of 948 bp, coding for a predicted protein of 316 residues with a calculated molecular weight of 34 kDa (Genbank, U 49437).

Using computer analysis (Clustal method of DNASTAR) we compared the primary structure of Bg RACK with that of homologous proteins present in data bases. The figure 1 presents the results of a phylogenic analysis of RACK sequences. A high degree of identity was observed between Bg RACK and proteins of superior eukaryotes from the animal (mammals and birds, 83%) and plant (63-64%) kingdoms. The mollusc protein was also highly identical to algae (*Chlamydomonas rheinardtii*, 72%), fungi (*Neurospora crassa*, 71%) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, 50%) proteins. As expected, the lowest score of identity (47%) was obtained with the protozoan homologue of *Leishmania.* Such values illustrate the ancestral origin and the universal distribution of RACK proteins in living cells and organisms. The important conservation of primary structures from protozoan to superior eukaryotes confirmed that RACK proteins were essential for cellular functions.

RACK proteins are members of the ancient family of WD-repeat proteins that are built of conserved repeated units usually ending with Trp-Asp. First found in the β-subunit of heterotrimeric GTP-binding proteins, the WD-40 motif has been shown to be contained in a variety of proteins with diverse structures and functions including signal transduction, gene expression and cell division. All of these proteins play regulatory roles but have no enzymatic function (Neer *et al.* 1994). From the deduced amino-acid sequence of Bg RACK, we have determined the position of putative repeats contained in the protein. Seven repeats constitute the essential part of the molecule and as in other RACK molecules, no extension is observed, in constrat with many other WD-40 proteins (Neer *et al.* 1994). Figure 2 presents the alignment of these repeats and their deduced consensus sequence, susceptible to represent the conserved core for the unit. This core is similar to the consensus previously proposed for rat RACK1 (Ron *et al.* 1994), a result that is in accordance with the high degree of identity observed between both proteins. Comparison with other RACK proteins mentioned in Fig. 1, shows that in a given protein, the different repeats are less similar to each other than they are themselves at equivalent positions in different proteins of the RACK subfamily. This observation has already been related to the differentiation and the functional specialization of repeating units, each repeat specifying the interaction with a different partner component (Neer *et al.* 1994).

We further investigated the PKC-binding properties of Bg RACK using the technique of overlay described by Ron *et al* (1994). In these experiments, the recombinant mollusc protein expressed in *E.Coli* was submitted to SDS-PAGE analysis and transferred onto nitrocellulose, before being incubated with PKC enzymes. A soluble extract from rat brain was used as a PKC source, rat PKC isoenzymes being detectable by commercially available specific antibodies.

Results presented in Fig. 3 show that BgRACK was able to bind heterologous PKCs (lane 2) as efficiently as rat brain receptors (lane 1). In both cases, a 36kDa band corresponding to the rat or mollusc RACKs was labelled. The binding occurred in the presence of PKC activators (Ca^{++}, phosphatidyl serine and diacylglycerol) but not in their absence (lane 3), indicating that Bg RACK fulfills criteria for a receptor for activated PKC. No binding of anti- PKC antibodies was detected when soluble rat brain extract was omitted (lane 4). The ability of Bg RACK to bind heterologous isoenzymes demonstrated the functional conservation of PKC-mediated signaling molecules in molluscs. In mammalian RACKs, previous work has identified two sequences rIII and rVI present respectively in the third and sixth WD-40 repeats of the rat RACK1 protein, and homologous to PKC-binding sites of annexin I and PKC inhibitor (Ron *et al.* 1994). The authors have demonstrated that rVI and to a lesser extent rIII are able to inhibit PKC binding to the RACK recombinant protein, suggesting that these peptides constitute at least part of the kinase binding site. In this context, it is interesting to note that rIII and rVI sequences of RACK1 are found with about 100% of identity in repeats III and VI of Bg RACK. When considering all of the RACK proteins, we could observe that rIII is completely conserved in superior eukaryotes, with only a pronounced divergence in yeast, but that the RACK1 rVI sequence is poorly conserved in plant and lower eukaryotes. The perfect identity of the putative PKC-binding sites of RACK1 and Bg RACK could explain the affinity of rat PKCs for the mollusc protein.

Immunolocalization of Bg RACK was performed on permeabilized mollusc cells using antibodies to the recombinant protein. Results presented in Fig. 4 show an intense labelling of the Bge cytoplasm with a more intense staining around nucleus. Similar results were obtained with hemocytes purified from hemolymph and were in accordance with the demonstration that RACK proteins are contained in the particulate fraction and associated with cytoskeletal elements (Mochly-Rosen *et al.* 1991).

Bge cells have been derived from *B. glabrata* embryos by Hansen (1976) and share some features with snail hemocytes in that they emit filopodia and can adhere to and encapsulate *S. mansoni* sporocysts *in vitro*. Bge cells have been shown to provide good environmental conditions for the development of mother sporocysts to the daughter form (Yoshino and Laursen 1995), implying activation and subsequent adherence of Bge cells to parasites. Recent results from our group have indicated that *in vitro* transformed sporocysts released products that stimulate activation and proliferation of Bge cells (unpublished data). This strongly suggests the implication of PKC pathway and therefore the implication of Bg RACK in this process.

Acknowledgments : The authors are grateful to Jean-Marc Merchez for pictures, Pascal Duclermortier for helpful discussion and Jacques Trolet for technical assistance. This work was supported by the Conseil Regional Nord-Pas de Calais and Pasteur Institute of Lille-INSERM U 167.

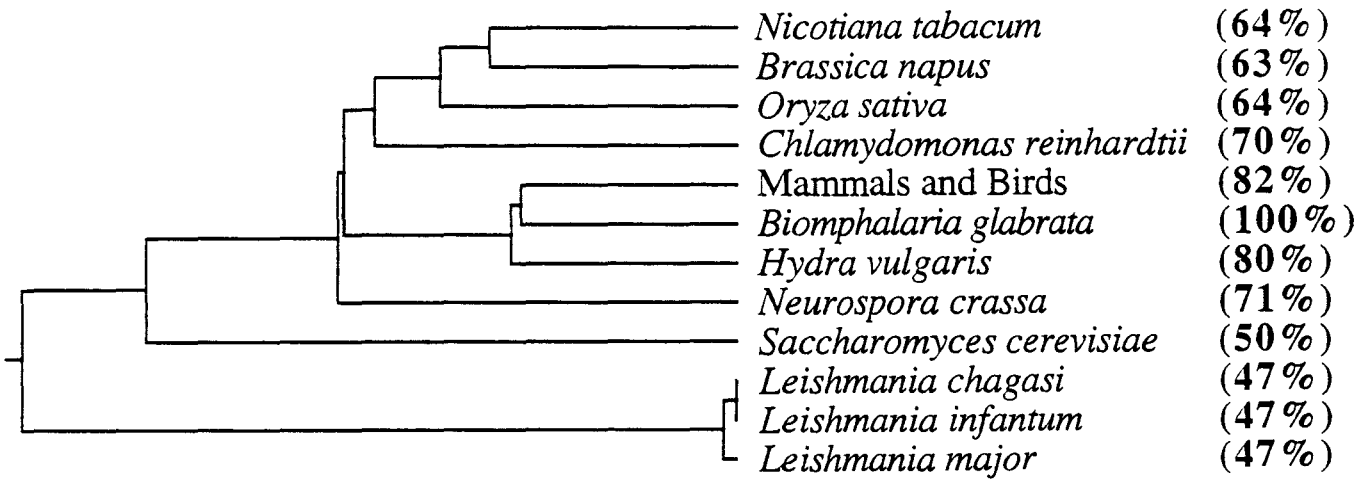


Figure 1 : Phylogenetic tree from the RACK proteins generated from Clustal method comparison (DNASTAR). Sequences are identified by Genbank accession numbers : *Nicotiana tabacum*, D17526 ; *Brassica napus*, Z33643, *Oryza sativa*, D38231 ; *Chlamydomonas reinhardtii*, X53574 ; Mammals and Birds : M24194 (human), U03390 (rat), M24193 (chicken) ; *Hydra vulgaris*, X97800 ; *Biomphalaria glabrata*, U49437 ; *Saccharomyces cerevisiae*, Z49702 ; *Neurospora crassa*, X81875 ; *Leishmania chagasi*, U27569 ; *Leishmania infantum*, U49695 ; *Leishmania major*, U27568.

A

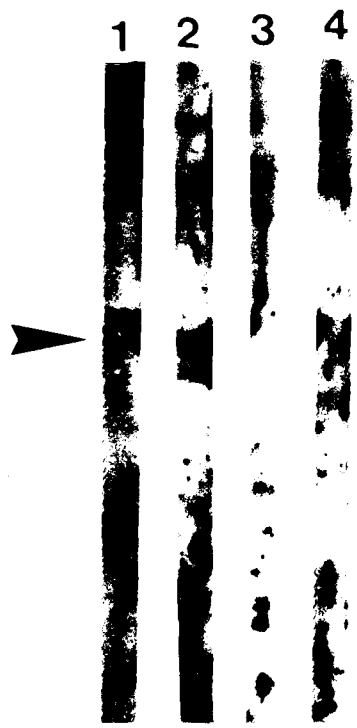
```
MTEQMTLRGTLQGHGGWVTQIATTPQYPD--MILSASRDKSLIVWRLTRDESS (51)   Repeat I
   YGVPQKSLHGHGHFVSD---VILSSDGQFALSGSWDHTLRLWDLS (93)        Repeat II
   TGQTTRRFVGHTKDVLS---VAFSADNRQIVSGSRDKTIKLWNTLG (136)      Repeat III
  VCKYTIQDDCHTDWTS-CVRFSPNTQNPIIVSSGWDRLVKVWNLT (180)        Repeat IV
   NCKLKTNHYGHTGYVNT---VTVSPDGSLCASGGKDSQAMLWDL (221)        Repeat V
 NEGKHLYTLDGAGDTINA---LCFSPN-RYWLCVASGPSIKIWDLEGKVVVDE (270) Repeat VI
     LKPEVMGTTSKAPTCLSLAWSADGQTLFAGYTDKLIRVWQVSMVSR (316)    Repeat VII
```

B

Consensus sequences:

```
BgRACK      GHT--V-----V--SPD---ILSGS-DK-IKLW-L
Rat RACK1   GHS--V---- V--SSD---ILSG--D-TIKLW-L
```

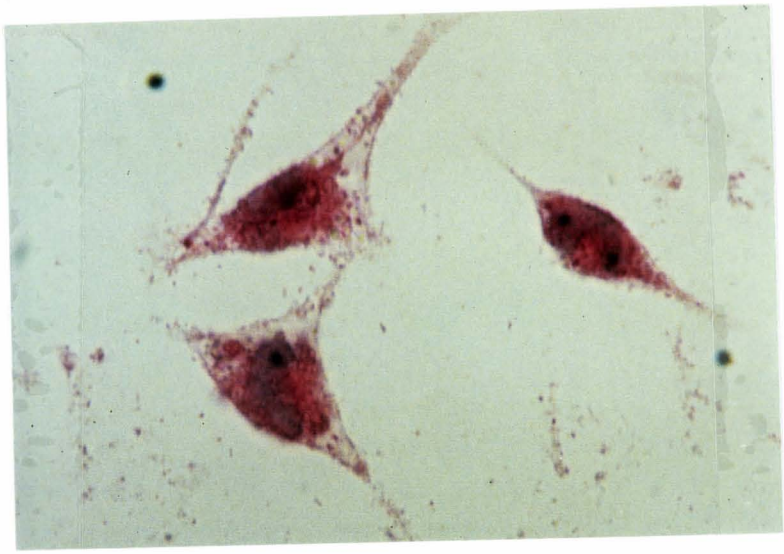
Figure 2 : Deduced amino acid sequence of Bg RACK. A) Alignment of the seven internal WD-40 repeats was constructed manually. The following motifs were aligned by introducing gaps to maximize WD-40 alignment. The consensus sequence within each repeat of Bg RACK is given in bold letters. B) The consensus sequences of Bg RACK and rat RACK1 are compared.



	1	2	3	4
PKCs	+	+	+	-
Ca^{++}, DAG, PS	+	+	-	+

Figure 3 : Overlay assay of recombinant Bg RACK with rat brain PKCs. Rat brain PKCs binding to rat brain membranes (lane 1) was used as a positive control. Binding to recombinant Bg RACK (lanes 2-4) was performed in the presence (lane 2) or in the absence (lane 3) of PS, DAG, Ca^{++}. In lane 4, rat PKCs were omitted.

A



B

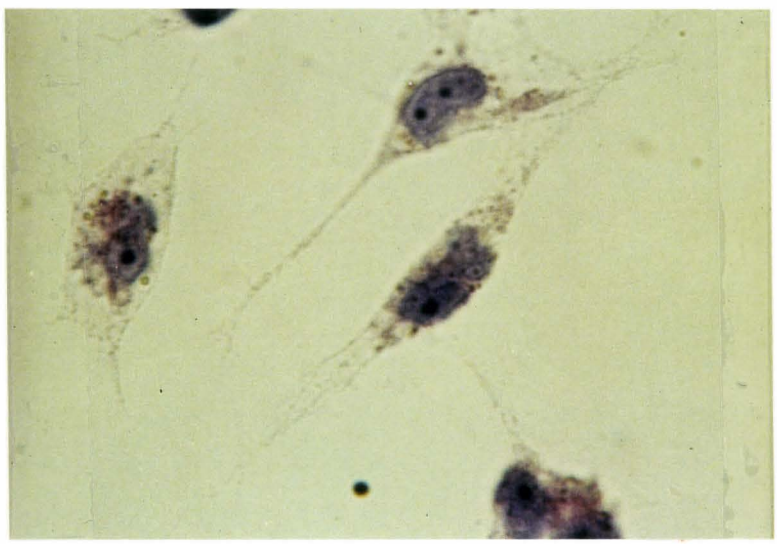


Figure 4 : Immunolocalization of Bg RACK on Bge cells using rat antibodies to the recombinant protein (A). Preimmune rat serum was used as a control (B).

References

Chapline, C., Ramsay, K., Klauck, T. and Jaken, S. 1993 Interaction cloning protein kinase C substrates. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 6858-6861

Guillemot, F., Billaut, A. and Auffray, C. 1989 Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA* **86**, 4594-4598

Hansen, E.L. 1976 A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata), establishment and characteristics. « Invertebrate tissue culture : research applications » (Maramorosch, K.ed), pp 75-97 Academic Press, New York

Iwasaki, Y., Komano, M., Ishikawa, A., Sasaki, T. and Asahi, T. 1995 Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty -amino-acid repeat (WD-40 repeat). *Plant Cellular Physiology* 36 505-510

Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. and Nishizuka, Y. 1982 Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* **257** 13341-13348

Liu, J.P. 1996 Review : Protein kinase C and its substrates. *Molecular and Cellular Endocrinology* **116**, 1-29

Mochly-Rosen, D., Khaner, H. and Lopez, J. 1991 Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA* **88**, 3997-4000

Mougneau, E., Altare, F., Wakil, A.E., Zheng, S., Coppola, T., Wang, Z.E., Waldmann, R., Locksley, R.M. and Glaichenhaus, N. 1995 Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen.*Science* **268**, 563-566

Mueller, F., Krueger, D., Sattleger, E., Hoffman, B., Ballario, P., Kanaan, M. and Barthelmess, I.B. 1995 The cpc-2 gene of *Neurospora crassa* encodes a protein entirely composed of WD-repeat segments that is involved in general amino acid control and female fertility. *Molecular Gene Genetics* **248**, 162-173

Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. and Smith, T.F. 1994 The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300

Newton, A.C. 1995 Protein Kinase C: Structure, function and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 28495-28498.

Ron, D., Chen, C.-H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. and Mochly-Rosen, D. 1994 Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C : a homolog of the β subunit of G proteins. *Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA* **91**, 839-843

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of the Sciences, USA* **74**, 5463-5467

Schloss, J.A. 1990 A *Chlamydomonas* gene encodes a G protein β subunit-like polypeptide. *Molecular Gene Genetics* **221**, 443-452

Staudinger, J., Zhou, J., Burgess, R., Elledge, S.J. and Olson, E.N. 1995 PICK1 : a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by yeast two-hybrid system. *Journal of Cellular Biology* **128**, 263-271

Yoshino, T. P. and Laursen J. R. 1995 Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (BGE) cells. *Journal of Parasitology* **81**, 714-722

CONCLUSION GENERALE

Dans la schistosomiase, l'hôte intermédiaire est le siège d'une importante multiplication asexuée du parasite par polyembryonie, la pénétration d'un miracidium sera suivie de la naissance de milliers de cercaires, infestantes pour l'homme.

Les programmes de lutte anti-vectorielle ont eu pour but d'éliminer les gastéropodes des sites d'endémique ce qui aurait permis ainsi d'interrompre le cycle de vie du parasite et d'éradiquer la maladie. Cependant, les efforts réalisés sur le terrain et les recherches effectuées pour identifier une substance molluscicide efficace se sont soldées par un échec à l'exception toutefois de quelques succès ponctuels en particulier dans les régions insulaires. De plus, les programmes d'irrigation dans les pays en voie de développement sont en plein essor ce qui peut laisser présager une recrudescence de la maladie et une expansion des zones endémiques dans les années à venir.

L'idée de contrôler une maladie transmise par un vecteur en altérant génétiquement sa compétence vectorielle dans une population naturelle est venue des progrès considérables réalisés dans la génération d'organismes génétiquement modifiés (Collins, 1994). Depuis cette stratégie alternative à la lutte antivectorielle classique s'est généralisée à d'autres invertébrés d'importance médicale ou d'intérêt économique en particulier les insectes vecteurs de maladies (paludisme, filariose, maladie du sommeil, myase...etc), les insectes nuisibles en agriculture (ravageurs des cultures), les insectes d'importance économique (pollinisateurs, parasitoïdes, vers à soie, abeilles...etc), les mollusques gastéropodes vecteurs des bilharzioses, les mollusques et les crustacés marins faisant l'objet de productions aquacoles (moules, huîtres, crevettes).

Dans le cas de la schistosomiase, la production de mollusques résistants ou même partiellement réfractaires au parasite est confrontée à toute une série de problèmes dont les deux plus évidents sont certainement :

- d'identifier des gènes de résistance au parasite
- de développer des outils de transformation génétique qui puissent être utilisés chez le gastéropode.

Du fait de l'existence de souches de laboratoire résistantes au parasite, plusieurs équipes s'activent aujourd'hui à identifier les gènes impliqués dans les mécanismes de résistance ou de sensibilité.

Il existe également un modèle d'interaction *in vitro* entre le parasite *S. mansoni* et des cellules d'une lignée dérivée d'embryons de mollusques (la lignée Bge). Cette lignée cellulaire présente certaines des caractéristiques des hémocytes qui sont les cellules de défense du mollusque et qui interviennent dans la destruction du parasite lors des interactions incompatibles. Les cellules Bge sont capables comme les hémocytes d'adhérer au plastique, d'émettre des filopodes et d'un point de vue morphologique, elles leur sont très semblables. Comme les hémocytes également, elles sont capables d'encapsuler les miracidiums *in vitro* et de plus, elles fournissent les conditions

favorables à leur maturation jusqu'au stade sporocyste secondaire (Yoshino et Laursen, 1995). Il convient de rappeler que dans les mollusques parasités, les hémocytes sont recrutés au niveau des parasites afin de les pourvoir en nutriments. Ce système de coculture *in vitro* représente un modèle idéal pour accéder à une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction entre le parasite et les cellules *de B. glabrata.*

Nous avons entrepris de réaliser la transformation génétique des cellules de la lignée Bge. D'un point de vue génétique, très peu d'informations sont disponibles concernant le génome *de B. glabrata.* Différents ADNcs ont été séquencés : tropomyosine (Dissous *et al.*, 1990), hsp70 (Yoshino, communication personnelle), actine non musculaire (Lardans *et al*, 1997), récepteur pour les PKCs activées (Lardans *et al.*, soumis). Un fragment de clone génomique de 2 kb présentant des homologies avec la transcriptase réverse des éléments LINEs a été caractérisé (Knight *et al.*, 1992). Aucun promoteur n'est à l'heure actuelle disponible et aucun outil de transfection et *a fortiori* de transformation n'a été décrit.

Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à transfecter les cellules Bge afin de tester différents promoteurs hétérologues et différents gènes rapporteurs. La transfection des cellules Bge a pu être réalisée avec le DOTAP, un lipide cationique qui interagit spontanément avec l'ADN et qui fusionne avec les membranes cellulaires. Des quantités de 20 µg de liposomes sont suffisantes pour permettre une transfection optimale des cellules dans nos conditions de lipofection. La transfection des cellules par le DOTAP a permis de montrer que deux promoteurs hétérologues sont fonctionnels dans l'environnement cellulaire des cellules Bge : le promoteur inductible Hsp70 de *D. melanogaster* et le promoteur constitutif des gènes précoces du cytomégalovirus. Au contraire, le promoteur SV-40 et le promoteur proximal de la glutathion S-transférase de *S. mansoni* ne semblent pas capables d'induire la transcription dans les cellules de mollusques. Ces observations laissent supposer l'absence ou la grande divergence de certains facteurs de transcription dans les cellules de la lignée embryonnaire de *B. glabrata.* La caractérisation de promoteurs homologues plus efficaces est en cours, il s'agit du promoteur de l'actine non musculaire (au laboratoire) et du promoteur de la protéine de choc thermique de 70 kDa (T. P. Yoshino, communication personnelle).

Parmi les gènes rapporteurs testés (β-galactosidase, β-glucuronidase et luciférase) seul le gène codant pour la luciférase a permis de déceler l'activité des promoteurs hétérologues.

Concernant les outils disponibles pour procéder à une intégration génomique, nous nous sommes tournés vers les moyens disponibles en particulier chez les insectes. La caractéristique des transposons réside dans leur capacité à se mobiliser et à assurer de manière autonome leur transposition. Aucun élément mobile n'ayant été caractérisé chez *B. glabrata*, la mobilité de deux éléments transposables d'insectes hobo et Hermes a été testée dans les cellules Bge. Aucun événement de transposition n'a pu être observé ; cependant, la mobilité de mariner reste à tester.

En effet, l'élément hobo est mobile principalement dans les cellules germinales et dans les cellules somatiques uniquement durant les stades précoces du développement embryonnaire (Calvi et Gelbart, 1994 ; Handler et Gomez, 1995). Les données bibliographiques concernant le rôle fonctionnel de l'élément Hermés ne sont pas encore disponibles (Warren *et al.*, 1994). L'élément mariner est fonctionnel à la fois dans les cellules de la lignée germinale et dans les cellules de la lignée somatique ; de plus, il a été identifié chez un grand nombre d'espèces : l'homme (Oosumi *et al.*, 1995), les insectes (Warren et Crampton, 1994), les nématodes et même chez un plathelminthe : la planaire (Garcia-Fernandez, 1994). De plus, la recherche de transposon par PCR dans le génome de *B. glabrata* a permis d'obtenir une courte séquence présentant une faible homologie avec mariner correspondant certainement à un vestige de l'élément. Ce résultat invite raisonnablement à penser qu'un élément mariner homologue ou hétérologue puisse permettre la transformation génomique des cellules Bge.

Globalement beaucoup de choses restent à faire, mais les efforts effectuées dans ce sens par de nombreuses équipes devraient permettre d'obtenir des gènes rapporteurs performants (GFP, marqueurs phénotypiques) ainsi que des outils de vectorisation efficaces. Les rétrovirus pseudotypés restent une voie très prometteuse de la transformation génétique des cellules Bge.

Parallèlement à ce programme de recherche quelque peu ambitieux et risqué, nous nous sommes intéressés à l'identification de molécules impliquées dans la défense de l'hôte et nous avons poursuivi le travail entrepris par O. Oukem sur la caractérisation de molécules apparentées aux cytokines dans l'hémolymphe du mollusque. Une tentative de clonage d'une molécule apparentée au TNFα nous a conduit à la caractérisation d'un récepteur pour les protéines kinases C activées (RACK). Cette protéine possède les caractéristiques structurales et fonctionnelles des protéines RACK de divers organismes. Sa capacité à lier les PKCs de mammifères confirme également la conservation des domaines d'interaction entre les PKCs et la RACK *de B. glabrata.* Cette molécule est impliquée dans la transduction du signal intracytoplasmique en interagissant avec les PKCs ; elle les stabilise dans leur conformation tridimensionnelle active. Ces résultats permettent d'envisager l'étude de la signalisation dans les cellules Bge, en particulier dans le modèle de coculture avec les parasites compte tenu de leur grande ressemblance avec les hémocytes dont l'activation se produit vraisemblablement par la transduction du signal *via* les PKCs suite à la liaison de l'hémocyte au parasite (van der Knaap et Loker, 1990).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aitken A., Ellis C. A., Harris A., Sellers L. A. et A. Toker (1990) Kinase and neurotransmitters. Nature **344** : 594

Amory-Soisson L. M., Masterson C. P., Tom T. D., McNally M. T., Lowell G. H. et M. Strand (1992) Induction of protective immunity in mice using a 62 kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. J. Immunol. **149** : 3612-3620

Andrews P. (1983) The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. Pharmacol. Ther. **19** : 245-295

Anon (1993) Schistosomiasis control WHO Techn. Rep. Ser. N°. 830

Aragao F. J., de Sa M. F., Almeida E. R., Gander E. S. et E. L. Rech (1992) Particle bombardment-mediated transient expression of a brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris L.*). Plant. Mol. Biol. **20** : 357-359

Armaleo D., Ye G. N., Klein T. M., Shark K. B., Sanford J. C. et S. A. Johnston (1990) Biolistic nuclear transformation in *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. Curr. Genet. **17** : 97-103

Arthur J. F., Butterfield L. H., Roth M. D., Bui L. A., Kiertscher S. M., Lau R., Dubinett S., Glaspy J., McBride W. H. et J. S. Economou (1997) A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. Cancer Gene Ther. **4** : 17-25

Asante E. A., Boswell J. M., Burt D. W. et G. Butfield (1994) Tissue specific expression of an alpha-skeletal actin-lacZ fusion gene during development in transgenic mice. Transgenic Res. **3** : 59-66

Atkinson P. W., Warren W. D. et D. A.O'Brochta (1993) The hobo transposable element of drosophila can be cross-mobilized in houseflies and excises like the Ac element of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (20) : 9693-9697

Auge-Gouillou C., Bigot Y., Pollet N., Hamelin M. H., Meunier-Rotival M. et G. Periguet (1995) Human and other mammalian genomes contain transposons of the mariner family. FEBS let. **368** (3) : 541-546

Ausenda C.D., Bresolin N., De Liso A., D'Angelo M.G., Moggio M., Del Bo R., Gallanti A., Comi G.P., Torrente Y., Bordoni A. et G. Scalato (1996) *In vivo* biolistic technique in control and mdx dystrophic mice. Muscle Nerve **19** : 912-914

Balloul J.-M., Sondermeyer P., Dreyer D., Capron M.,Grzych J.-M., Pierce R. J., Carvallo D., Lecocq J. P. et A. Capron (1987) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. Nature **326** : 149-153

Barbosa F. S. (1975) Survival and cercaria production of Brasilian *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* infected with *Schistosoma mansoni.* J. Parasitol. **61** : 151-152

Barbosa F. S., Coelho M. U. et J. E. Dobbin (1954) Qualidades de vetor dos hospederios de *Schistosoma mansoni* no nordeste do Bresil. II. Duraçao de infestaçao e eliminaçao de cercarias em *Australobis glabratus.* Publicaciones Avulses Instituto Aggeu Magalhaes **3** : 78-93

Basch P. F. (1976) Parasitological reveiw : intermediaite host specificity in *Schsitosoma mansoni.* Exp. Parasitol. **39** : 150-169

Bayne C. J. (1990) Phagocytosis and non-self-recognition in invertebrates. Bioscience **40** : 723-731

Bayne C. J. et E. S. Loker (1987) Survival within the snail host. In "The biology of Schistosomes From genes to latrines" Academic Press, Eds D. Rollinson et A-J.G. Simpson : 321-346

Bayne C. J., Buckley P. M. et P. C. De Wan (1980) *Schistosoma mansoni* : cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in the plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. **50** : 409-416

Bazzi M. D. et G. L. Nelsestuen (1987) Role of substrate in determining the phospholipid specificity of protein kinase C activation. Biochemistry **26** : 5002-5008

Becker W. (1980) Microcalorimetric studies in *Biomphalaria glabrata* : the influence of Schistosoma mansoni on basal metabolism. Comp. Biochem. physiol. **135B** : 101-105

Bell R. M. (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. Cell **45** : 631-632

Belot J. (1993) Fields trials to control schistosome intermediate hosts by the plant molluscicide *Ambrosia maritima* L. in the Senegal river basin. Acta Trop. **52** : 275-282

Bergsma D. J., Chang K. S. et R. J. Schwartz (1985) Novel chicken actin gene : third cytoplasmic isoform. Mol. Cell. Biol. **5** : 1151-1162

Bigot Y., Auge-Gouillou C. et G. Periquet (1996) Computer analyses reveal a hobo-like element in the nematode *Caenorhabditis elegans* which presents a conserved transposase domain common with the Tc1-Mariner transposon family. Gene **174** (2) : 265-271

Bigot Y., Hamelin M. H., Capy P. et G. Periguet (1994) Mariner-like elements in hymenopteran species : insertion site and distribution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (8) : 3408-3412

Blackman R. K., Grimaila R., Koehler M. M. et W. M. Gelbart (1987) Mobilization of hobo elements residing with the decapentaplegic gene complex : suggestion of a new hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster*. Cell **49** (4) : 497-505

Blackman R. K., Koehler M. M., Grimaila R. et W. M. Gelbart (1989) Identification of a fully-functional hobo transposable element and its use for germ-line transformation of *Drosophila*. EMBO J. **8** (1) : 211-217

Blanchetot A. et R. H. Gooding (1995) Identification of a mariner element from the tsetse fly, *Glossina palpalis palpalis*. Insect. Mol. Biol. **4** (2) : 89-96

Bockaert J. (1996) Récepteurs couplés aux protéines G : des concepts à la structure. Médecine/Sciences n° spécial **12** : 79-85

Boris-Lawrie K. et H. M. Temin (1994) The retroviral vector : Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. Gene Therapy for Neoplastic Diseases **716** : 59-71

Boswell C. A. et C. J. Bayne (1984) Isolation, characterization and functional assessement of a hemagglutinin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Dev. Comp. Immunol. **6** : 519-528

Boulanger D., Reid G. D. F., Sturrock R. F., Wolowczuck I., Balloul J.-M., Grezel D., Pierce R. J., Otieno M. F., Guerret S., Grimaud J. A., Butterworth A. E. et A. Capron (1991) Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. Parasit. Immunol. **13** : 473-490.

Boulo V. (1997) Transformation génétique chez les mollusques bivales marins. Analyses fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* de vecteurs d'expression et d'integration hétérologues. Thèse EPHE.

Boulo V., J.-P. Cadoret, Le Marrec F., Dorange G. et E. Mialhe (1996) Transient expression of luciferase reporter gene after lipofection in oyster (*Crassostrea gigas*) primary cell cultures. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. **5** (3) : 167-174

Brinster R. L. et R. D. Palmiter (1986) Introduction of genes into germ line of animals. In "The Harvey Lectures", Liss, A. R. (Ed). 80 : 1-38

Bryan G. J., Jacobson J. W. et D. L. Hartl (1987) Heritable somatic excision of a drosophila transposon. Science **235** (4796) : 1636-1638

Buchner K. (1995) Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. Eur. J. Biochem. **228** : 211-221

Burns J. C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M. et J.-K. Yee (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors : concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** : 8033-8037

Burns J. C., Matsubara T., Lozinski G., Yee J.-K., Friedmann T., Washabaugh C. H. et P. A. Tsonis (1994) Pantropic retroviral vector-mediated gene transfer, integration and expression in cultured newt limb cells. Develop. Biol. **165** : 285-289

Butterworth A. E., Fulford A. J., Dunne D. W., Ourna J. H. et R. F. Sturrock (1988) Longitudinal studies on human schistosomiasis. Philos.Trans. Soc. Lond. Biol. Sci. **321** (1207) : 495-511

Cadoret J.-P. (1992) Mise au point de méthodes de manipulation embryonnaire de mollusques bivalves. Application en génétique et pathologie infectieuse. Thése EPHE : 100

Cadoret J.-P., Boulo V., Gendreau S., et E. Mialhe (1996) Transient expression of reporter genes in embryos of the oyster *Crassostrea gigas* using particule bombardment. Transgenic Res.

Calvi B. R. et W. M. Gelbart (1994) The basis of germline specificity of the hobo transposable element in *Drosophila melanogaster*. EMBO J. **13** (7) : 1636-1644

Capron A., DeBlock A., Biguet J., Clay A., Adeniss L. et A. Vernes (1965) Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à *Schistosoma haematobium*. Bull. WHO, **32** : 755-778

Capy P., Langin T., Bigot Y., Brunet F., Daboussi M. J., Periguet G., David J. R. et D. L. Hartl (1994) Horizontal transmission versus ancient origin : mariner in the witness box. Genetica **93** (1-3) : 161-170

Carter O. S. et B. J. Bogitsh (1975) Histological and cytochemical observations of effects of *Schistosoma mansoni* on *Biomphalaria glabrata*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **206** : 380

Chapline C., Ramsay K., Klauck T. et S. Jaken (1993) Interaction cloning protein kinase C substrates. J. Biol. Chem. **268** : 6858-6861

Cheng F. M. et J. Ke (1994) Effect of biolistic particle size on the efficiency of transfection of oocytes in *Xenopus* ovary tissue. Nucleic Acids Res. **22** : 3265-3266

Cheng T. C. (1975) Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. Annals N. Y. Acad. Sci. **266** : 343-379

Cheng T. C. et F. O. Lee (1971) Glucose levels in the mollusc *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. J. Invert. Path. **18** : 395-399

Cheng T. C. et J. W. Bier (1972) Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. Parasitol. **64** : 129-141

Cheng T. C. et T. A. Garrabant (1977) Acid phosphatase in granulocytic capsule formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially ressitant to *Schistosoma mansoni*. Int. J. Parasitol. **7** : 467

Chernin E. (1968) Interference with the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect the molluscan host. J. Parasitol. **54** : 509-516

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

Chernin E. et C. A. Dunavan (1962) The influence of host-parasite dispersion upon the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect *Australorbis glabratus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **11** : 455-471

Christiansen S. K., Knudsen S. et H. Giese (1995) Biolistic transformation of an obligate plant pathogenic fungus, *Erysiphe graminis* f.sp. hordei. Curr. Genet. **29** : 100-102

Coates C. J., Johnson K. N., Perkins H. D., Howells A. J., O'Brochta D. A. et P. W. Atkinson (1996) The hermit transposable element of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, belongs to the hAT family of transposable elements. Genetica **97** (1) : 23-31

Coates C. J., Turney C. L., Frommer M., O'Brochta D. A., Warren W. D. et P. W. Atkinson (1995) The transposable element mariner can excise in non-drosophilid insects. Mol. Gen. Genet. **249** (2) : 246-252

Collins F. H. (1994) Prospects for malaria control through the genetic manipulation of its vectors. Parasitol. Today **10** (10) : 370-375

Collombet J.M., Wheeler V.C., Vogel F. et C. Coutelle (1997) Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. Anovel appraoch toward gene correction for mitochondrial disorders. J. Biol. Chem. **272** : 5342-5347

Combes C. (1992) Seminar on « International Cooperation in the field of genetic transformation of invertebrates and resistance to diseases » Washington, 4-5 décembre

Combes C. (1993) Les schistosomes, l'eau et l'homme. Rev. Prat. **43** : 405-415

Combes C. (1996) L'écologie des interactions durables ou le parasitisme revisité. Médecine et Sciences n° spécial **12** : 158-162

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

Connors V. A., Lodes M. J. et T. P. Yoshino (1991) Identification of a *Schistosoma mansoni* sporocysts excretory-secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes. J. Invert. Path. **58** : 387-395

Couch L., Hertel L. A. et E. S. Etges (1990) Humoral response of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection : observations on a circulating hemagglutinin. J. Exp. Zool. **255** (3) : 340-349

Cram E. B., Files V. S. et M. F. Jones (1947) Experimental molluscan infection with *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. National Institute of Health Bulletin **189** : 81-94

Crampton J. M. et P. Eggleston (1994) Transgenic insects. In "Animals with novel genes ", Maclean, N., (Ed.). Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 21-62

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

Crompton M. R. , Moss S. E. et M. J. Crumpton (1988) Diversity in the lipocotin/calpactin family. Cell **55** : 1-3

Cross G. S., Wilson C., Erba H. P. et H. R. Woodland (1988) Cytoskeletal actin gene families of *Xenopus borealis* and *Xenopus laevis*. J. Mol. Evol. **27** : 17-28

Danos O. et R. C. Mulligan (1988) Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** : 6460-6464

Da Silva C. M., Henrique, Ferreira B., Picon M., Gorfinkiel N., Ehrlich R. et A. Zaha (1993) Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. Mol. Biochem. Parasitol. **60** (2) : 209-219

De Jonk-Brink M., Elsaadany M. et M. Solis-Soto (1991) The occurence of schistosomin, an antagonist of female gonadotropic hormones is a general phenomenon in haemolymph of schistosome-infected freshwater snails. Parasitol. **103** : 371-378

DeVault J. D. et S. K. Narang (1994) Transposable elements in lepidoptera : hobo-like transposons in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **203** (1) : 169-175

DeVault J. D., Hugues K. J., Leopold R. A., Johnson O. A. et S. K. Narang (1996) Gene transfer into corn earworm (*Helicoverpa zea*) embryos. Genome Res. **6** (7) : 571-579

Dikkeboom R., Tijnagel J. M. G. H., Mulder E. C. et W. P. W. van der Knaap (1987) Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate active forms of oxygen. J. Invertebr. Pathol. **49** : 321-331

Disatnik M.-H., Hernandez-Sotomayor S. M. T., Jones G., Carpenter G. and D. Mochly-Rosen (1994) Phospholipase C-γl binding to intracellular receptors for activated protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** : 559-563

Dissous C., Dissous C. et A. Capron (1986b) Stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidia by a 80 kDa glycoprotein from *Biomphalaria glabrata*. Mol. Biochem. Parasitol. **21** : 203-209

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

Dissous C., Torpier G., Duvaux-Miret O. et A. Capron (1990) Structural homology of tropomyosins from the human trematode *Schistosoma mansoni* and its intermediate host *Biomphalaria glabrata*. Mol. Biochem. Parasitol. **43** : 245-256

Djuzenova C.S., Zimmerman U., Frank H., Skhorukov V.L., Richter E. et G. Fuhr (1996) Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electropermeabilized myeloma cells. Biochim. Biophys. Acta **1284** : 143-152

Duvaux-Miret O. et A. Capron (1992) Proopiomelanocortin in the helminth *Schistosoma mansoni*. Synthesis of beta endorphin, ACTH and alpha MSH. Existence of POMC-related sequences. Annals N. Y. Acad. Sci. **650** : 245-250

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

Ebert P. R. , Hileman J. P. 4th et H. T. Nguyen (1995) Primary sequence, copy number, and distribution of mariner transposons in honey bee. Insect. Mol. Biol. **4** (2) : 69-78

Eggleston W. B., Rim N. R. et J. K. Lim (1996) Molecular characterization of hobo-mediated inversions in *Drosophila melanogaster*. Genetics **144** (2) : 647-656

Erasmus D. A. (1972) "The biology of trematodes". Edward Arnold, London.

Erba H. P., Eddy R., Shows T., Kedes L. et P. Gunning (1988) Structure chromosome location and expression of the human gamma-actin gene : differential evolution, location and expression of the cytoskeletal beta- and gamma-actin genes. Mol. Cell. Biol. **8** : 1775-1789

Etges F. J., Carter O. S. et G. Webbe (1975) Behavioral and developmental physiology of schistosome larvae as related to their molluscan hosts. Ann. N. Y. Acad. Sci. 266 : 480-496

Etkin L. D. et B. Pearman (1987) Distribution, expression and germ line transmision of exogenous DNA sequences following microinjection into *Xenopus laevis* eggs. Development **99** : 15-23

Fallon P. G., Tao L.-F., M. M. Ismail et J. L Bennett (1996) Schistosome resistance to praziquantel : Fact or Artifact ? Parasitol. Today **12** (8) 316-319

Farooq M. (1966) The effect of area-wide snail control on the endemicity of bilharziasis in Egypt. Bull. World Health Organ. **35** (5) : 369-375

Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenze M., Northrop J. P., Ringold G. M. et M. Danielsen (1987) Lipofection : a highly efficient , lipid mediated DNA transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 7413-7417

Fields A. P., Pincus S. M., Kraft A. S. et W. S. May (1989) Interleukin 3 and bryodtatin mediate rapid nuclear envelop protein phosphorylation in growth factor-dependent FDC-P1 hematopoeitic cells. J. Biol. Chem. **264** : 21896-21901

Finnegan D. J. (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. TIG **5** (4) : 103-107

Folk J. E. (1980) Transglutaminases Ann. Rev. Biochem. **49** : 517-531

Fournier A. et A.Théron (1985) Sectorisation morphoanatomique et fonctionnelle du sporocyste fils de *Schistosoma mansoni*. Zeitschrift für Parasitenkunde **71** : 325-336

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

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

Fryer S. E., Hull C. J. et C. J. Bayne (1989) Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata* : carbohydrate specificity of hemocyte receptors and a plasma opsonin. Dev. Comp. Immunol. **13** : 9-16

Gabriel B. et J. Teissié (1995) Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells. Biochem. Biophys. Acta **1266** : 171-178

Gagne M. B., Pothier F. et M. A. Sirard (1991) Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. Mol. Reprod. Dev. **29** : 6-15

Garcia-Fernandez J., Bayascas-Ramirez J.R., Marfany G., Munoz-Marmol A. M., Casali A., Baguna J. et E. Salo (1995) Highcopy number of highly similar mariner-like transposons in planarian (Platyhelminthes) : evidence for trans-phyla horizontal transfer. Mol. Biol. Evol. **12** (3) : 421-431

Gay P. Coq D. L., Steinmetz M., Berkelman T. et C. I. Kado (1985) Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **164** : 918-921

Gendreau S. (1992) Recherches sur la transformation génétique des crustacés. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale.

Gendreau S., Lardans V., Cadoret J.-P. et E. Mialhe (1995) Transient expresssion of luciferase reporter gene after ballistic introduction in *Artemia fransciscana* (Crustacea) embryos. Aquaculuture **133** : 199-205

Glayzer D. C., Roberts I. N., Archer D. B. et R. P. Oliver (1995) The isolation of Ant1, a transposable element from *Aspergillus niger*. Mol. Gen. Genet. **249** (4) : 432-438

Gloor G. B., Nassif N. A., Johnson-Schlitz D. M., Preston C. R. et W. R. Engels (1991) Targeted replacement in *Drosophila* via P element induced gap repair. Science **253** : 1110-1117

Godon C., Caboche M. et F. Daniel-Vedele (1993) Transient plant gene expression : a simple and reproductible method based on flowing particle gun. Biochimie **75** : 591-595

Gomez J., Martinez de Aragon A., Bonay P., Pitton C., Garcia A., Silva A., Fresco M., Alvarez F. et A. Rebello (1995) Physical association and functional relationship between protein kinase C zeta and the actin cytoskeleton. Eur. J. Immunol. **25** : 2673-2678

Gopalakrishna R., Barsky S. H., Thomas T. P. etV. W. Anderson (1986) Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. Differences between Ca^{2+}-induced and phorbol ester-stabilized membrane binding of PKC. J. Biol. Chem. **261** : 16438-16445

Graham F. L. et A. J. van der Eb (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5. Virology **52** : 456-467

Granath W. O. et J. E. Aspevig (1993) Comparison of hemocyte components from *Schistosoma mansoni* (Trematoda) susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) that cross-react with larval schistosoma surface proteins. Comp. Biochem. Physiol. **104** (4) : 675-680

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

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

Grappin P., Audeon C., Chupeau M. C. et A. M. Grandbastien (1996) Molecular and functional characterization of Slide, an Ac-like autonomous transposable element from tobacco. Mol. Gen. Genet. **252** (4) : 386-397

Green H. et P. Djian (1992) Consecutive actions of different gene altering mechanisms in the evolution of involucrin. Mol. Biol. Evol. **9** (6) : 977-1017

Guillemot F., Billaut A. et C. Auffray (1989) Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** : 4594-4598

Haas W., Haberl B., Kalbe M. et M. Körner (1995) Snail-host-finding by miracidia and cercariae : Chemical host cues. Parasitol. Today **11**(12) 468-472

Hanauer A., Levin M., Heilig R., Daegelen D., Kahn A. et J. L. Mandel (1983) Isolation and characterization of cDNA clones for human skeletal muscle alpha actin. Nucleic. Acids. Res. **11** (11) : 3503-3516

Handler A. M. et S. P. Gomez (1995) The hobo transposable element has transposase-dependent and independent excision activity in drosophilid species. Mol. Gen. Genet. **247** (4) : 399-408

Handler A. M. et S. P. Gomez (1996) The hobo transposable element excises and has related elements in tephritid species. Genetics **143** (3) : 1339-1347

Hansen E. L. (1973) Progeny-daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*. International J. Parasitol. **3** : 267-268

Hansen E. L. (1976) A cell line from embryos of Biomphalaria glabrata (Pulmonata) , establishment and characteristics. In « Invertebrate tissue culture : research applications in medicine and biology and agriculture. » Kurstak E. et K. Maramorosch eds. New York Academic Press 75-97

Hartl D. L. (1989) Transposable element mariner in *Drosophila* species. In « Mobile DNA », Eds Berg D. E. et M. M. Howe. American Society for Microbiology, Washington DC, 531-536

Harumoto T. et K. Hiwatashi (1992) Stable and unstable transformation by microinjection of macronucleoplasm in *Paramecium*. Dev. Genet. **13** : 118-125

Hashmi S., Hashmi G. et R. Gaugler (1995) Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. J. Invertebr. Pathol. **66** : 293-296

Hasley D. L., Girard P. R., Kuo J. F. et P. J. Blackshear (1987) Protein kinase C in fibroblasts. Characteristics of its intracellular location during growth and after exposure to phorbol esters and other mitogens. J. Biol. Chem. **262** : 2234-2243

Heltianu C., Serban G., Alexandru V., Gafencu A., Simionescu N. et M. Simonionescu (1997) Expression of transferrin receptors in endothelial cells transfected by electroporation. Eur. J. Cell. Biol. **72** : 79-89

Herrera R. J. et J. Wang (1991) Evidence for a relationship between the *Bombyx mori* middle repetitive Bm1 sequence family and the U1 snRNA. Genetica **84** (1) : 31-37

Hirt D. (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J. Mol. Biol. **26** : 365-369

Hoffman G.A. et G.A. Evans (1986) Electronic genetic-physical and biological aspects of cellular electromanipulation. IEEE Engeneering in Med. and Biol. 14-25

Horard B., Mangé A., Pélissier B. et P. Couble (1994) *Bombyx* gene promotor analysis in transplanted silk gland transformed by particle delivery system. Insect. Mol. Biol. 3 : 261-265

House C. et B. E. Kemp (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. Science **238** (4834) : 1726-1728

Hurd H. (1990) Physiological and behavioral interactions between parasites and invertebrate hosts. Adv. Parasitol. **29** : 271-318

Hyatt S. L., Liao L., Aderem A., Nairn C. et S. Jaken (1994) Correlation between protein kinase C binding proteins and substrates in REF52 cells. Cell. Growth Differ. **5** : 495-502

Inoue K. (1991) Expression of reporter genes introduced by microinjection and electroporation in fish embryos and fry. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. **1** : 266-270

Ito M., Tanabe F., Sato A., Ishda E., Takami Y. et S. Shigeta (1989) Possible involvement of microfilaments in PKC translocation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **160** (3) : 1344-1349

Jacobson J. W., Medhora M. M. et D. L. Hartl (1986) Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** (22) : 8684-8688

Jacquemin P., Alsat E., Oury C., Belayew A., Martial J. A. et D. Evain-Brion (1993) Efficient lipofection of human trophoblast cells in primary cultures. Biochem. Biophys. Res. Commun. **1** : 376-381

James C. et S. K. Prah (1978) The influence of physical factors on the behaviour and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. III Effect of contact time and dispersion in static and flowing waters. J. Helminthol. **52** : 221-226

Jeyaprakash A. et M. A. Hoy (1995) Complete sequence of a mariner transposable element from the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* isolated by an inverse PCR approach. Insect. Mol. Biol. **4** (1) : 31-39

Johnston S.A. et D.C. Tang (1996) The use of microparticle injection to introduce genes into animal cells *in vitro* and *in vivo*. Genet. Eng. (NY) **15** : 225-236

Johnston S.A., Anziano P.Q., Shark K., Sanford J.C. et R.A. Butow (1988) Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. Science **240** : 1538-1541

Jourdane J. (1982) Etude des mécanismes de rejet dans les couples mollusque-schistosome incompatibles à partir d'infectations par voie naturelle et par transplantations microchirurgicales de stades parasitaires. Acta Tropica **39**, 325-335

Jourdane J. et A. Théron (1987) Larval development : eggs to cercariae. In : « The biology of schistosomes » Rollinson D. et A. J. G. Simpson eds. New York Academic Press 83-113

Jourdane J. et M. Xia (1987) The primary sporocyst stage in the life cycle of *Schistosoma japonicum* (Trematodes : Digenea) Trans. Am. Microsc. Soc. **106** (4) : 364-372

Jourdane J. et T. C. Cheng (1987) The two phase recognition process of allografs in a Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata*. J. Invert. Path. **49** : 145-158

Kajihara N. et al (1979) Laboratory assessment of the molluscicidal activity of B-2, a new chemical against *Oncomelania nosophora*. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **32** : 185-188

Kassim O. O. et C. S. Richards (1978) Schistosoma mansoni : lysozyme activity in *Biomphalaria glabrata* during infection with to strains. Exp. Parasitol. **46** : 213-217

Kassim O. O. et C. S. Richards (1979) Radioisotope labeling of *Schistosoma mansoni* miracidia for *in vivo* studies in *Biomphalaria glabrata*. J. Invert. Path. **33** : 385-386

Kaufman P. D. et D. C. Rio (1992) P element transposition in vitro proceeds by a cut and past mechanism and uses GTP as a cofactor. Cell **69** : 27-39

Khoo H. W., Ang L. H., Lim H. B. et K.Y. Wong (1992) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. Aquaculture **107** : 1-19

Kikkawa U., Ogita K., Ono Y., Asaoka Y., Shearman M.S., Fugii T., Ase K., Sekiguchi K., Igarashi K. et Y. Nishizuka (1987) The common structure and activities of four subspecies of rat brain protein kinase C family. FEBS lett. **223** : 212-216

Kikkawa U., Takai Y., Minakuchi R., Inohara S. et Y. Nishizuka (1982) Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. J. Biol. Chem. **257** : 13341-13348

Kim A. I. et E. S. Beliaeva (1991) Transposition of mobile element mdg4 (gypsy) and hobo in somatic and germ cells of a genetically unstable mutator strain of *Drosophila melanogaster*. Genetica **97** (1) : 1519-1530

Kim U.-H., Kim H.-S. et S. G. Rhee (1990) Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor promote translocation of phospholipase C-γ from cytosol to membrane. FEBS letters **270** : 33-36

Kinoti G. K. (1971) The attachment and penetration apparatus of the miracidium of *Schistosoma*. J. Helminth. **14** : 229-235

Kloos H. et F.S. McCullough (1987) Plant molluscicides (Mott, K. E. eds), 45-108

Ko A., Dräger V. C. et D. A. Harn (1990) A Sm epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1 Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** : 4159-4163

Köster B. et M. Strand (1994) *Schistosoma mansoni* : immunolocalization of two different fucose containing carbohydrate epitopes. Parasitol. **108** : 433-446

Köster B., Hall M. R. et M. Strand (1993) *Schistosoma mansoni* : immunoreactivity of human sera with the surface antigen Sm23. Exp. Parasitol. **77** (3) : 282-294

Kraft A.S. et W. B. Anderson (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca^{++}, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. Nature **301** : 621-623

Lampe D. J., Churchill M. E. et H. M. Robertson (1996) A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. EMBO J. **15** (19) : 5470-5479

Landau N. R., Page K. A. et D. R. Littman (1991) Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. J. Virol. **65** : 162-169

Langin T., Capy P. et M. J. Daboussi (1995) The transposable element impala, a fungal member of the Tc1-mariner superfamily. Mol. Gen. Genet. **246** (1) : 19-28

Larson S. E., Andersen P. L., Miller A. N., Cousin C. E., Richards C. S., Lewis F. A. et M. Knight (1996) Use of RAPD-PCR to differentiate genetically defined lines of an intermediate host of *Schistosoma mansoni, Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. **82** (2) 237-244

Leung M. K., Dissous C., Capron A., Woldegaber H., Duvaux-Miret O., Pryor S. et G. B. Stefano (1995) *Schistosoma mansoni* : Presence and potential use of opiate-like substances. Exp. Parasitol. **81** : 208-215

Lidholm D. A., Lohe A. R. et D. L. Hartl (1993) The transposable element mariner mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*. Genetics **134** (3) : 859-868

Lim J. K. (1988) Intrachromosomal rearrangements mediated by hobo transposons in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** (23) : 9153-9157

Lin S., Gaiano N., Culp P., Burns J.C., Friedmann T., Yee J.-K.et N. Hopkins (1994) Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. Science **265** : 666-669

Liu J. (1996) Analyse de la localisation d'antigènes à potentialité vaccinale dans le parasite *Schistosoma mansoni*: incidence sur la compréhension des mécanismes de l'immunité.Thèse de doctorat.

Liu J.-P. (1996) Review : Protein kinase C and its substrates. Mol. Cell. Endocrinol. **116** : 1-29

Lodes M. J., Connors V. A. et T. P. Yoshino (1991) Isolation and functional characterization of snail hemocyte-modulating polypeptides from primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. **49** : 1-10

Lodes M. J. et T. P. Yoshino (1990) The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. J. Invertebr. Path. **56** : 75-85

Loker E. S. (1983) A comparative study ofthe life-histories of mammalian schistosomes. Parasitology **87** : 343-369

Loker E. S. Cimino D. F. et L. A. Hertel (1992) Excretory-Secretory products of Echinostoma paraensei sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. J. Parasitol. **78** (1) 104-115

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

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

Loker E. S., Bayne C. J., Buckley P. M. et K. T. Kruse (1982) Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of the juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. **68** (1) : 84-94

Loker E. S., Yui M. A. et C. J. Bayne (1984) *Schistosoma mansoni* : agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in the plasma of *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. **58** : 56-62

Lozovskaya E. R., Nurminsky D. I., Hartl D. L. et D. T. Sullivan (1996) Germline transformation of *Drosophila virilis* mediated by the transposable element hobo. Genetics **142** (1) : 173-177

Lu J.-K., Chen T. T., Allen S. K., Matsubara T. et J. C. Burns (1996) Production of transgenic dwarf surfclams, *Mulinia lateralis*, with pantropic retroviral vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** : 3482-3486

MacInnis A. J., Bethel W. H. et E. M. Cornford (1974) Identification of chemicals of snail origin that attract *Schistosoma mansoni* miracidia. Nature 248 : 361-363

Mack K. et R.W. Titball (1996) Transformation of *Burkholderia pseudomallei* by electroporation. Anal. Biochem. **242** : 73-76

Malek E.A. (1985) Snails hosts of schistosomiasis and other snail transmitted diseases in tropical america : a manual. Washington, DC. Pan American Health Organization Scientific Publication **478** : 1-325

Mangé A. (1996) Etude structurale et fonctionnelle des genes d'actine cytoplasmique de *Bombyx mori*. Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard-Lyon I.

Mann R. S., Mulligan R.C. et D. Baltimore (1983) Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. Cell **33** : 871-879

Mansour M. H. (1995) Evidence for a familly of schistosome glycan-binding lectins in *Biomphalaria glabrata alexandrina*. Dev. Comp. Immunol. **19** (5) : 365-376

Marin M., Etienne-Julan M., Piechaczyk M. et D. Noel (1994) L'intégration des rétrovirus : faits et croyances. Médecine/Sciences **10** : 318-324

Markowitz D., Goff S. et A. Bank (1988) A safe packaging line for gene transfer, separating viral genes on two different plasmids. J. Virol. **62** : 1120-1124

Markowske M. et O. M. Rosen (1989) Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. J. Biol. Chem. **264** : 16155-16159

Marston A. et K. Hostettmann (1991) in Methods in Plant Biochemistry vol. 6 Dey P. M. et J. B. Harborne eds 153-178

Maruyama K. et D. L. Hartl (1991) Evolution of the transposable element mariner in *Drosophila* species. Genetics **128** (2) : 319-329

Mason P. R. et P. J. Fripp (1977) Chemical stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidial activity. Zeitchrift für Parasitenkunde **53** : 287-295

Matsubara T., Beeman R. W., Shike H., Besanky N. J., Mukabayire O., Higgs S., James A. A. et J. C. Burns (1996) Pantropic retroviral vectors integrate and express in cells of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** : 6181-6185

McClintock B. (1948) Mutable loci in maize. Carnegie Inst. Washington Yearb. **47** : 155-169

McCullough F. S. (1980) Molluscicides in schistosomiasis control. Bull. WHO **58** : 681-689

Medhora M., Medhora K. et D. L. Hartl (1991) Molecular and functional analysis of the marine mutator element Mos1 in *Drosophila*. Genetics **128** (2) : 311-318

Mello C. C., Kramer J. M., Stinchcomb D. et V. Ambros (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans* : extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. EMBO J. **10** : 3959-3970

Meuleman E. A. (1972) Host-parasite inter relationships between the freshwater pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and the trematode *Schistosoma mansoni*. Netherlands J. Zool. **22** : 355-427

Mialhe E. et L. H. Miller (1994) Biolistic techniques for transfection of mosquito embryos (*Anopheles gambiae*). Biotechniques **16** : 924-931

Miller A. D. (1992) Retroviral vectors. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **158** : 1-24

Miller A. N., Ofori K., Lewis F. et M. Knight (1996) *Schistosoma mansoni* : Use of a subtractive cloning strategy to search for RFLPs in parasite-resistant *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. **84** : 420-428

Miller A. D. et G. J. Rosman (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Biotechniques **7** (9) : 980-982, 984-986, 989-990

Minchella D. J. et P. T. Loverde (1981) A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. Am. Naturalist. **118** : 876-881

Mochly-Rosen D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins : a theme in signal transduction. Science **268** : 247-251

Mochly-Rosen D. et D. E. Koshland Jr (1987) Domain structure and phosphorylation of protein kinase C. J. Biol. Chem. **262** : 2291-2297

Mochly-Rosen D. Khaner H. et J. Lopez (1991) Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** : 3997-4000

Mochly-Rosen D., Khaner H., Lopez J. et B. L. Smith (1991) Intracellular receptors for activated protein kinase C. J. Biol. Chem. **266** : 14866-14868

Mochly-Rosen D., Miller K. G., Scheller R. H., Khaner H., Lopez J. et B. L. Smith (1992) p65 fragments, homologous to the C2 region of protein kinase C, bind to the intracellular receptors for protein kinase C. Biochem. **31**: 8120-8124

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

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

Morgan J. R., Tompkins R. G. et M. L. Yarmush (1993) Advances in recombinant retroviruses for gene delivery. Adv. Drug Delivery Rev. **12** : 143-158

Morris A.C., Eggleston P. et J.M. Crampton (1989) Genetic transformation of the mosquitoo *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. Med. Vet. Entomol. **3** : 1-7

Mouahid A. et A. Théron (1986) *Schistosoma bovis* : pattern of cercarial emergence from snails of the genera *Bulinus* and *Planorbarius*. Exp. Parasitol. **62** : 389-393

Mouchet F., Théron A., Brémond P., Sellin E. et B. Sellin (1992) Pattern of cercarial emergence of *Schistosoma curassoni* from Niger and comparison with three sympatric species of Schistosomes. J. Parasitol. **78** : 61-71

Mougneau E., Altare F., Wakil A. E., Zheng S., Coppola T., Wang Z.-E., Waldmann R., Locksley R. et N. Glaichenhaus (1995) Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. Science **268** : 563-566

Mukabayire O. et N. J. Besansky (1996) Distribution of T1, Q, Pegasus and mariner transposable elements on the polytene chromosomes of PEST, a standard strain of *Anopheles gambiae*. Chromosoma **104** (8) : 585-595

Muller F., Ivics Z., Erdelyi F., Papp T., Varadi L., Horvath L., Maclean N. et L. Orban (1992) Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. **1** : 276-281

Muller F., Lele Z., Varadi L., Menczel L. et L. Orban (1993) Efficient transient expression system based insquare pulse electroporation and *in vivo* luciferase assay of fertilized fish eggs. FEBS lett. **324** : 27-32

Neer E. J., Schmidt C. J., Nambudripad R. et T. F. Smith (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. Nature **371**: 297-300

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y. et P. H. Hofschneider (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. **1** (7) : 841-845

Neumann E., Kakorin S., Tsoneva I., Nikolova B. et T. Tomov (1996) Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. Biophys. J. **71** : 868-877

Newman S.M., Boynton J.E., Gilham N.W., Randolph-Anderson B.L., Johnson A.M. et E.H. Harris (1990) Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas* : molecular and genetic characterization of integration events. Genetics **126** : 875-888

Newton A. C. (1995) Seeing two domains. Current Biology **5** : 973-976

Newton A. C. (1996) Protein kinase C : Ports of anchor in the cell. Current Biology **6** (7) : 806-809

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

Nishizuka Y (1992) Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science **258** : 607-614

Nishizuka Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor pormotion. Nature **308** : 693-698

Nishizuka Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. Nature **334** : 661-665

O'Brochta D. A. et A. M. Handler (1988) Mobility of P elements in *Drosophila* and non drosophilids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** : 6052-6056

O'Brochta D. A., Warren W. D., Saville K. J. et P. W. Atkinson (1994) Interplasmid transposition of Drosophila hobo elements in non-drosophilid insects. Mol. Gen. Genet. **244** (1) : 9-14

O'Brochta D. A., Warren W. D., Saville K. J. et P. W. Atkinson (1996) Hermes, a functional non-drosophilid insect gene vector from *Musca domestica*. Genetics **142** (3) : 907-914

Okada N. (1991) SINEs. Curr. Opin. Genet. Dev. **1** : 498-504

Okamoto A., Kosugi A., Koizumi Y., Yanagida F. et S. Udaka (1997) High efficiency transformation of *Bacillus brevis* by electroporation. Biosci. Biotechnol. Biochem. **61** : 202-203

Ono Y., Fuji T., Ogita K., Kikkawa U., Igarashi K. et Y. Nishizuka (1988) The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family. J. Biol. Chem. **263** : 6927-6932

Oosumi T., Belknap W. R. et B. Garlick (1995) Mariner transposons in humans. Nature **378** (6558) : 672

Oosumi T., Garlick B. et W. R. Belknap (1996) Identification of putative nonautonomous transposable elements associated with several transposon families in *Caenorhabditis elegans*. J. Mol. Evol. **43** (1) : 11-18

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

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

Papadopoulos V. et P. F. Hall (1989) Isolation and characterization of PKC from Y-1 adrenal cell cytoskeleton. J. Cell. Biol. **108** : 553-567

Pearce E. J., James S. L., Hieny S., Lanar D. E. et A. Sher (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** : 5678-5682

Perrett S. et P. J. Whitfield (1996) Currently available molluscicides. Parasitol. Today **12** (4) 156-159

Pinkerton A. C., O'Brochta D. A. et P. W. Atkinson (1996) Mobility of hAT transposable elements in the Old World bollworm, *Helicoverpa armigera*. Insect. Mol. Biol. **5** (4) : 223-227

Pitchford R. J. et J. F. Du Toit (1976) The shedding pattern of three little known African schistosomes under outdoor conditions. Ann. Trop. Med. Parasitol. **70** : 181-187

Pointier J.-P. et A. Guyard (1992) Biological control of the snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Martinique, French West Indies. Trop. Med. Parasitol. **43** : 98-101

Pointier J.-P., Théron A., Imbert-Establet D. et G. Borel (1991) Eradication of a sylvatic focus of *Schistosoma mansoni* using biological control competitor snails. Biological Control **1** : 244-247

Powers D.A., Hereford L., Cole T., Creech K., Chen T.T., Lin C.M., Kight K. et R. Dunham (1992) Electroporation : a method for transferring genes into the gametes of zebrafish (*Brachydanio rerio*), channel cat fish (*Ictalurus punctatus*) and the common carp (*Cyprinus carpio*) Mol. Mar. Biol. Biotechnol. **1** (4-5) : 301-308

Powers D.A., Kirby V.L., Cole T. et L. Hereford (1995) Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Haliotis rufescens*) embryos. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. **4** : 369-375

Prah S. K. et C. James (1977) The influence of physical factors on the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. J. Helminthol. **51** : 73-85

Prentice M. A. (1983) Displacement of *Biomphalaria glabrata* by the snail *Thiara granifera* in field habitats in St. Lucia, West Indies. Ann. Trop. Med. Parasitol. **77** : 51-59

Presnail J.K. et M.A. Hoy (1994) Transmission of injected DNA sequences to multiple eggs of *Metaseiulus occidentalis* and *Amblyseius finlandicus* (Acari : Phytoseidae) following maternal microinjection. Exp. Appl. Acarol. **18** : 319-330

Ray J. et F. H. Gage (1992) Gene transfer into established and primary fibroblast cell lines : comparison of transfection methods and promoters. Biotechniques **4** (4) : 598-603

Reynolds S. R., Dahl C. E. et D. A. Harn (1994) T and B epitope detremination and analysis of multiple antigenic peptides for *Schistosoma mansoni* experimental vaccine Triose Phosphate isomerase. J. Immunol. **152** : 193-200

Reynolds S. R., Shoemaker C. B. et D. A. Harn (1992) T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membran protein of *Schistosoma mansoni*. J. Immunol. **149** : 3995-4001

Richards C. S. (1970) Genetics of a molluscan vector of Schistosomiasis. Nature **227** : 806-810

Richards C. S. (1973) Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. **22** : 748-756

Richards C. S. (1975) Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. Parasitology **70** : 231-241

Richards C.S., Knight M. et F. A. Lewis (1992) Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. Parasitol. Today **8** (5) 171-174

Rio D. C., Barnes J., Laski F. A., Rine J. et G. Rubin (1988) Evidence for *Drosophila* P element transposase activity in mammalian cells and yeasts. J. Mol. Biol. **200** : 411-415

Robertson H M. et D. J. Lampe (1995) Recent horizontal transfer of a mariner transposable elment among and between Diptera and Neuroptera. Mol. Biol. Evol. **12** (5) : 850-862

Robertson H. M. (1993) The mariner element is widespead in insects. Nature **362** (6417) : 241-245

Robertson H. M. (1995) The Tc1-mariner superfamily of transposons in animals. J. Ins. Physiol.

Robertson H. M. et E. G. MacLeod (1993) Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly and related arthropods. Ins. Mol. Biol. **2** : 125-139

Robertson H. M. et M. L. Asplund (1996) Bmmar1 : a basal lineage of the mariner family of transposable element in the silkworm moth, *Bombyx mori*. Insect. Mol. Biol. **26** (8-9) : 945-954

Roe T., Reynolds T. C., Yu G. et P. O. Brown (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. EMBO J. **12** : 2099-2108

Rollinson D. et V. R. Southgate (1987) The genus Schistosoma : a taxonomic appraisial. In : "The Biology of Schistosomes. From genes to latrines." D. Rollinson et A. J. G. Simpson eds New York Academic Press 1-49

Rols M. P. et J. Tiesséi (1990) Electropermeabilization of mammalian cells. Biophys. J. **58** : 1089-1098

Ron D. Chen C. -H., Caldwell J., Jamieson L., Orr E. et D. Mochly-Rosen (1994) Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C : a homolog of the β subunit of G proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** : 839-843

Ron D. et D. Mochly-Rosen (1994) Agonists and antagonists of protein kinase C function, derived from its binding proteins. J. Biol. Chem. **269** : 21395-21398

Ron D. et D. Mochly-Rosen (1995) An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92** : 492-496

Ron D., Luo J. et D. Mochly-Rosen (1995) C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of β protein kinase C *in vivo*. J. Biol. Chem. **270** (41) : 24180-24187

Ross A. G. P., Li Y. S., Sleigh A. C. et D. P. McManus (1997) Schistosomiasis control in the people's republic of China. Parasitol. Today **13** (4) : 152-155

Rousseau C. (1995) Développement de technologies de transformation d'embryons et de cellules de crevettes pénéides. Thèse EPHE

Rubin G. M. et A. C. Spradling (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vector. Science **218** : 348-353

Ruiz-Tiben E., Palmer J.-R. et F. F. Ferguson (1969) Biological control of *Biomphalaria glabrata* by *Marisa cornuarietis* in irrigation ponds of Puerto Rico. Bull. WHO **41** : 329

Saito N., Kose A., Ito A., Hosoda K., Mori M., Hirata M., Ogita K., Kikkawa U., Ono Y., Igarashi K., Nishizuka Y. et C. Tanaka (1989) Immunocytolocalization of βII subspecies of protein kinase C in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** : 3409-3413

Saladin K. S. (1979) Behavioral parasitology and perspectives on miracidial host-finding. Z. Parasitenkd **60** (3) : 197-210

Samuelson J. C., Quinn J. J. et J. P. Caufield (1984) Video microscopy of swimming and secreting cercariae of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. **70** (6) : 996-999

Sandmeyer S. B., Hansen L. J. et D. L. Chalker (1990) Integration specificity of retrotransposons and retroviruses. Ann. Rev. Genet. **24** : 491-518

Schedl A., Larin Z., Montoliu L., Thies E., Kelsey G., Lehrach H. et G. Schutz (1993) A method for the generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection. Nucleic Acids Res. **21** : 4783-4787

Schloss J. A. (1990) A *Chlamydomonas* gene encodes a G protein β subunit-like polypeptide. Mol. Gen. Genet. **221**: 443-452

Schutte H. J. (1974) Studies of the South African strain of *Schistosoma mansoni*. Part 2 : The intra-molluscan larval stages. South African J. Sci. **70** : 327-346

Sedensky M. M., Hudson S. J., Everson B. et P. G. Morgan (1994) Identification of a mariner-like repetitive sequence in *C. elegans*. Nucleic Acids Res. **22** (9) : 1719-1723

Sells M. A., Li J. et J. Chernoff (1995) Delivery of protein into cells using polycationic liposomes. Biotechniques **1** : 72-76

Serra E. Zemzoumi K., Trolet J., Capron A. et C. Dissous (1996) Functional analysis of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase gene promoter : involvement of SMNF-Y transcription factor in multimeric complexes. Mol. Biochem. Parasitol. **83** : 69-80

Serra E., Zemzoumi K. et C. Dissous (1997) Deletion analysis of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase gene promoter. Functionality of a proximal AP-1 site. Eur. J. Biochem. (sous presse)

Shark K.B., Smith F.D., Harpending P.R., Rasmussen J.L. et S.C. Sanford (1991) Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 480-485

Sheen F., Lim J. K. et M. J. Simmons (1993) Genetic instability in *Drosophila melanogaster* mediated by hobo transposable elements. Genetics **133** (2) : 315-334

Shiff C. J. (1968) Location of *Bulinus* (Phytopsis) globosus by miracidia of *Schistosoma mansoni*. Int. J. Parasitol. **54** : 1133-1140

Shoemaker C., Gross A., Gebremichael A. et D. Harn (1992) cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** : 1842-1846

Shozawa A. et C. Suto (1990) Hemocytes of *Pomacea caniculata* : I. Reversible aggregation induced by Ca^{++}. Dev. Comp. Immunol. **14** (2) : 175-184

Simmons G. M. (1992) Horizontal transfer of hobo transposable elements within the *Drosophila melanogaster* species complex : evidence from DNA sequencing. Mol. Biol. Evol. **9** (6) : 1050-1060

Simon M. et H. Green (1984) Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. Cell **36** : 827-834

Sin F. Y. T., Bartley A. L., Walker S. P., Sin I. L., Sydmonds J. E., Hawke L. et C. L. Hopkins (1993) Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electropoating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA. Aquaculture **117** : 57-69

Smith B. L. et D. Mochly-Rosen (1992) Inhibition of protein kinase C function by injection of intracellular receptors for the enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. **188** : 1235-1240

Smyth J. D. (1966) "The physiology of trematodes", 1st edn. H. Freeman, San Franscisco.

Son K. et L. Huang (1994) Exposure of human ovarian carcinoma to cisplatin transiently sensitizes the tumor cells for liposome-mediated gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **26** : 12669-12672

Stabel S. (1994) Protein kinase C- an enzyme and its relatives. Cancer Biology **5** : 277-284

Staudinger J., Zhou J., Burgess R., Elledge S. et E. N. Olson (1995) PICK1 : a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by yeast two-hybrid system. J. Cell Biol. **128** (3) 263-271

Streck R. D., McGaffey J. E. et S. K. Beckendrof (1986) The structure of hobo transposable elements and their insertion sites. EMBO J. **5** : 3615-3623

Stump J. L. et D. E. Gilbertson (1980) Differential leukocytic responses of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Schistosoma mansoni*. J. Invert. Path. **35** : 217-218

Sullivan J. T. et P. C. Hu (1996) Fate of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria obstructa*. J. Parasitol. **82** (5) 743-747

Swezey R.R et D. Epel (1989) Stable, resealable pores formed in sea urchin eggs by electric discharge (electroporation) permit substrate loading for assay of enzymes *in vivo*. Cell Regulation **1** : 65-74

Takahaschi T., Mori K. et Y. Shiceta (1961) Phototactic, thermotactic and geotactic responses of miracidia of *Schistosoma japonicum*. Japanese J. Parasitol. **10** : 686-691

Tendler M., Brito C. A., Vilar M. M., Serra-Freire N., Diogo C. M., Almeida M. S., Delhem A. C. B., Da Silva J. F., Savino W., Garratt R. C., Katz N. et A. J. G. Simpson (1996) A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** : 269-273

Théron A. (1989) Hybrids between *Schistosoma mansoni* and *S. rhodaini* : characterization by cercarial emergence rythms. Parasitol. **99** : 225-228

Théron A. (1992a) Spatial and energy compromise between host and parasite : the *Biomphalaria glabrata-Schistosoma mansoni* system. Int. J. Parasitol. **22** : 91-94

Théron A. (1992b) Early enhanced growth of the digestive gland of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* : side effect or parasite manipulation. Parasitol. Res. **78** : 445-450

Théron A.(1985) Early and late shedding patterns of *Schistosoma mansoni* cercariae : ecological significance in transmission to human and murine hosts. J. Parasitol. **70** : 652-655

Thornill J. A., Jones J. T. et J. R. Kusel (1986) Increased oviposition and growth in immature *Biomphalaria* after exposure to *Schistosoma mansoni*. Parasitol. **93** : 443-450

To K.Y., Cheng M.C., Chen L.F. et S.C. Chen (1996) Introduction and expression of foreign DNA in isolated spinach chloroplasts by electroporation. Plant J. **10** : 737-743

Toffaletti D.L., Rude T.H., Johnston S.A., Durack D.T. et J.R. Perfect (1993) Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. J. Bacteriol. **175** : 1405-1411

Toker A., Ellis A. E., Sellers L. A. et A. Aitken (1990) Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3 protein. Eur. J. Biochem. **191** : 421-429

Tsai H.J., Lai C.H. et H.S. Yang (1997) Sperm as a carrier to introducee an exogenous DNA fragment into the oocyte of the japanese abalone (*Haliotis diversicolor supoetexta*). Transgenic Res. **6** : 85-95

Upatham E. S. (1973) The effect of water temperature on the penetration and development of St Lucian *Schistosoma mansoni* miracidia in local *Biomphalaria glabrata*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health **4** : 367

Valério D. (1992) Retrovirus vectors for gene therapy procedures. In : "Transgenic Animals" F.Grosveld & G. Kollias Eds., Academic Press, 211-239

van der Knaap W. P. W. et E. S. Loker (1990) Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol. Today. **6** (6) : 175-182

van der Knaap W. P. W., Adema C. M. et T. Sminia (1993) Invertebrate blood cells : morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail Lymnea stagnalis. Comp. Haematol. Int. **3** : 20-26

van der Voorn L. et H. L. Ploegh (1992) The WD-40 repeat. FEBS letters **307** : 131-134

Vermund S. H., Bradley D. J. et E. Ruiz-Tiben (1983) Survival of *Schistosoma mansoni* in the human host : estimates from a community based prospective study in Puerto Rico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32 : 1040-1046

Vianey-Liaud M. (1990) Biologie de la reproduction de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (mollusque, gastéropode, planorbidae). Thèse d'Etat.

Wan T., Widhodm J. M. et P. G. Lemaux (1995) Type callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) . Planta **196** : 7-14

Warren A. M. et J. M. Crampton (1994) Mariner : its prospects as a DNA vector for the genetic manipulation of medically important insects. Parasitol. Today **10** (2) : 58-63

Warren W. D., Atkinson P. W. et D. A. O'Brochta (1994) The Hermes transposable element from the house fly , *Musca domestica*, is a short inverted repeat-type element of the hobo, Ac, and tam3 (hAT) element family. Genet. Res. **64** (2) : 87-97

Warren W. D., Atkinson P. W. et D. A. O'Brochta (1995) The Australian bushfly *Musca vetustissima* contains a sequence related to transposons of the hobo, Ac and Tam3 family. Gene **154** (1) : 133-134

Watanabe Y., Nomoto H., Takezawa R., Miyoshi N. et T. Akaike (1994) Highly efficient transfection into primary cultured mouse hepatocytes by use of cation-liposomes : an application for immunization. J. Biochem. **6** : 1220-1226

Webbe G. (1965) Transmission of bilharziasis. 2. Production of cercariae. Bulletin WHO **33** :155-162

Webbe G. (1987) Molluscicides in the control of schistosomiasis. In Plant Molluscicides, (Mott eds) 1-26

Wesseling J. G., Smits M. A. et J. G. Schoenmakers (1988) Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. **30** (2) : 143-153

Wolf M. et M. Baggiolini (1990) Identification of phosphatidylserine-binding proteins in human white blood cells. Biochem.J. **269** : 723-728

Woolhouse M. E. J. (1994) Immunoepidemiology of human schistosomes : taking the theory into the field. Parasitol. Today **10** (5) : 196-202

Wu Y., Sifri C.D., Lei H.H, Su X.Z. et T.E. Wellems (1995) Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92** : 973-977

Xiong Y. et T. H. Eickbush (1990) Origin and evolution of retroelement based upon their reverse transcriptase sequences. EMBO J. **9** : 3353-3362

Xu C.-B, Verwaerde C., Gras-Masse H., Fontaine J., Bossus M., Trottein F., Wolowczuck I., Tartar A. et A. Capron (1993) *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathion S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxy-terminal domains. J. Immunol. **150** : 940-949

Xu C.-B, Verwaerde C., Grzych J.-M., Fontaine J. et A. Capron (1991) A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and eggs viability. Eur. J. Immunol. **21** : 1801-1807

Yannopoulos G., Stamatis N., Monastirioti M., Hatzopoulos P. et C. Louis (1987) Hobo is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23.5MRF. Cell **49** (4) : 487-495

Yannopoulos G., Zabalou S., Stamatis N. et G. Tsamathis (1994) Differential regulation of P and hobo mobile elements by two laboratory strains of *Drosophila melanogaster*. Genet. Res **63** (2) : 129-137

Yao L., Kawakami Y. et T. Kawakami (1994) The pleckstrin homology domain of Buron tyrosine kinase interacts with protein kinase C. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **91** : 9175-9179

Yee J.-K., Miyanohara A., Laporte P., Bouic K., J. C. Burns et T. Friedmann (1994) A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors : highly efficient infection of primary hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (20) : 9564-9568

Yoshino T. P. et C. A. Boswell (1986) Antigen sharing between larval trematodes and their snail hosts : how real the phenomenon in immune evasion ? Symp. Zool. Soc. London **56** : 221-238

Yoshino T. P. et J. R. Laursen (1995) Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (BGE) cells. J. Parasitol. **81** (5) 714-722

Yoshino T. P. et M. J. Lodes (1988) Secretory protein biosynthesis in snail hemocytes : in vitro modulation by larval schistosome excretory-secretory products. J. Parasitol. **74** : 538-547

Yoshino T. P. et W. O. Granath (1983) Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. Cell. Tissue Res. **232** : 553-564

Yoshino T. P. et W. O. Granath (1985) Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes : functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. J. Invert. Path. **45** : 174-186

Yoshino T. P. et T. C. Cheng (1978) Snail host like antigens associated with the surface membranes of *Schistosoma mansoni* miracidia. J. Parasitol. **64** (4) : 752-754

Zimmerman U. (1986) Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **105** : 175-256

UNIVERSITÉ DES SC ET TECHN. LILLE
BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE