

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse de Doctorat
pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement par

Cécile Cocude

*Les sérine protéases de Schistosoma mansoni :
Caractérisation moléculaire d'une nouvelle protéase
kallikréine-like ou facteur-I like
et étude de l'activité enzymatique de l'élastase recombinante*

Présentée le 14 Décembre 1998 devant la commission d'examen :

Président : Professeur G. Spik

Directeur de thèse : Professeur A. Capron

Rapporteurs : Docteur C. Auriault
Docteur M.F. Cesbron-Delauw

Examineurs : Docteur J. Khalife
Docteur E. Davioud
Mr. J.M. Duport



Ce travail a été réalisé au
Centre d'immunologie et de Biologie Parasitaire
INSERM U167 Institut Pasteur de Lille

Sous la direction du Professeur A. Capron

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

La purification de la protéine native correspondant à SmSP1 a été
réalisée au sein de la société HELIX BIOTECHNOLOGIE (PARIS) sous la
direction de Mr. J.M Duport.

Au souvenir et en leur mémoire,

*A ma famille et
belle-famille,*

*A mes frères,
A Magali et Marion,*

A Pascal.

Monsieur le Professeur Capron,
Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire et permis de réaliser ce travail au sein d'un programme de recherche passionnant. Que ce manuscrit soit le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Madame le Professeur Spik,
Vous avez accepté de présider ce jury, je vous remercie pour l'attention particulière que vous avez prêtée à ce travail.

Monsieur le Docteur Auriault,
Je vous remercie sincèrement pour le regard critique et averti avec lequel vous avez lu ce manuscrit.

Madame le Docteur Cesbron-Delauw,
Vous avez accepté d'être rapporteur de cette thèse, merci pour l'intérêt porté à ce travail. Les remarques et critiques que vous avez apportées à ce manuscrit ont été très constructives, je vous en remercie beaucoup.

Madame le Docteur Davioud,
Je vous remercie sincèrement pour tous les conseils préconisés au cours de notre collaboration. L'intérêt que vous avez manifesté m'a beaucoup encouragé.

Monsieur Jean-Michel Duport,
Je te remercie très vivement pour ton aide précieuse, tes explications, pour tout ce que tu m'as transmis et pour m'avoir accueillie dans ton équipe. L'intérêt que tu as prêté à ce travail m'a beaucoup touché.

Monsieur le Docteur Jamal Khalife,
Je te remercie Jamal d'avoir accompagné ce travail pendant trois années, merci pour tes encouragements et ton soutien pendant ce long périple. Que cette thèse soit le témoignage de ma profonde gratitude.

Un grand Merci

A Catherine, pour ce qu'elle est, pour ce qu'elle sait, parce que deux années se sont écoulées.

A Claude, pour ses concours, ses histoires qui ne font rire que lui, sa gaieté et sa franchise!
A Christine, pour son aide, ses conseils et sa logique!

A Jamal, pour la chance qu'il m'a donnée, parce qu'un jour il fit rimer « espoir » et « désespoir », parce qu'il a dit vrai et qu'il a eu confiance en moi.

A Jean-Michel, pour son aide, ses compétences, son humour et pour tout ce qu'il m'a appris.

A Farida, pour ses chaleureux conseils, ses idées et pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eues.

A Jean-Marc, pour son professionnalisme, son calme, sa gentillesse et sa passion pour la photo.

A Jean-Loup, pour ses conseils en informatique !

A Jocelyne et Thérèse pour leur accueil et leur leçon de vie.

A Ricardo pour ses conseils, ses compétences et surtout sa gentillesse.

A Raymond pour les lectures et les corrections de mes articles.

Aux filles des hybridomes, pour leur féminité et leur gentillesse.

A Josette et Sophia pour leurs compétences et leurs conseils.

A Suzanne, pour son dévouement et « ses cercaires ».

A Monique et Jean-Pierre, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi!

A Maria, Nadine, Charlotte, Chantal, et Monique...pour leur dévouement et leurs compétences.

A tous les autres, ceux que j'ai croisés un jour dans un couloir ou autre part...

Merci à tous....

Et puis il y a ceux qui n'y étaient pas, ceux qui n'ont rien retenu, mais que j'ai quand même envie de remercier, parce qu'il y a autre chose dans la vie, les amis: Catherine et Godfried, Corinne et Sylvain, Virginie et Xavier, Eric et Sophie, Pierre et Hélène, Sébastien et Sandrine, Christelle et Raphaël.

Publications et Communications concernant ce travail

✓ **Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. (1997)** Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease. *Parasitology* 115, 395-402.

Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Fontaine, J. Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine protease homologous to mouse plasma Kallikrein and human Factor I. *Parasitology (Sous presse)*

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

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

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

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

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

Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Capron, A. & Khalife, J. Caractérisation moléculaire d'une sérine protéase de *Schistosoma mansoni*. Société française d'Immunologie, SFI, 26-28 novembre 1997.

Publications et Communications concernant d'autres travaux

✓ Cêtre, C., **Cocude, C.**, Pierrot, C., Godin, C., Capron, A., Capron, M. & Khalife, J. (1998) In vivo expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*, **20**, 135-142.

Khalife, J., Pierrot, C., **Cocude, C.**, Cêtre, C., Godin, C., Capron, A. (1998) Molecular cloning and sequencing of the rat interleukin-12 p40 gene. *European Cytokine Network* **9**, 69-73.

Cêtre, C., Pierrot, C. **Cocude, C.**, Lafitte, S., Capron, M., Capron, A. & Khalife, J. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after a primary and a secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. (*Soumis pour publication*)

Pierrot, C., **Cocude, C.**, Cêtre, C., Godin, C., Lafitte, S. & Khalife, J. Expression of rat interleukin-5 and generation of neutralizing antiserum : comparative study of rat IL-5 produced in *E. coli* and insect cells. (*Soumis pour publication*)

✓ Cêtre, C., **Cocude, C.**, Pierrot, C. Capron, M., Capron, A. & Khalife, J. Study of cytokine mRNA expression in experimental rat schistosomiasis. Société française d'Immunologie, SFI, 26-28 novembre 1997. Poster 14.

Sommaire

Résumé.....	10
Abréviations.....	11
Généralités.....	12
<i>La Schistosomiase ou Bilharziose.....</i>	<i>13</i>
<i>Les protéases.....</i>	<i>53</i>
Cadre et Objectifs.....	91
Matériels et Méthodes.....	94
Résultats.....	119
Discussion et Perspectives.....	160
Références bibliographiques.....	173
Annexes.....	193
<i>Article 1.....</i>	<i>194</i>
<i>Article 2.....</i>	<i>203</i>
Table des matières et Liste de figures et tableaux.....	222

Résumé

Impliquées dans un large spectre d'activités biologiques, les protéases sont, chez *Schistosoma mansoni*, fondamentales non seulement pour assurer la survie du parasite mais aussi parce qu'elles sont capables d'interagir avec la réponse immune de l'hôte. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux sérine protéases de ce parasite.

Dans un premier temps, une stratégie de PCR à l'aide d'oligonucléotides dégénérés, nous a permis d'identifier une nouvelle sérine protéase (SmSP1) dont la caractérisation moléculaire a été abordée. Ainsi, des homologies significatives avec différentes sérine protéases impliquées dans les cascades de coagulation sanguine, du complément et dans le système kallikréine-kinine ont été mises en évidence. L'expression de la SmSP1 semble régulée au cours du développement du parasite et sa localisation conforte l'hypothèse selon laquelle, elle serait capable d'interagir avec les systèmes de régulation de l'hôte évoqués précédemment. Malgré la sécrétion vers le milieu extérieur et/ou son expression en surface, aucune réponse humorale n'a été détectée au cours d'infections expérimentales par *S. mansoni*. Cette observation suggère une forme d'échappement à la réponse immune développée par le parasite. Enfin, la purification de la protéine native correspondante a été abordée et a permis de déterminer les conditions de purification à partir de vers adultes.

Nous nous sommes intéressés ensuite, à la seule sérine protéase caractérisée chez ce parasite, l'élastase de cercaire, connue pour sa participation active dans la pénétration des larves chez l'hôte définitif. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence son rôle en tant que cible chimiothérapeutique et son intérêt dans la modulation de la réponse immune. L'absence d'enzyme active gênant toute approche expérimentale, nous avons exprimé l'élastase recombinante en cellules d'insectes. L'activité enzymatique détectée montre des résultats préliminaires intéressants.

Les purifications par chromatographie d'affinité de l'élastase recombinante ainsi que de la protéine native correspondant à SmSP1, pourront nous permettre alors de tester leur rôle éventuel en tant que modulateur de la réponse immune ou cible thérapeutique.

Abréviations

aa	Acides aminés
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNg	Acide DésoxyriboNucléique génomique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
DO	Densité Optique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
hsp	heat-shock protein
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IFN	Interféron
IPTG	Isopropyl B-D Thiogalactoside
LDL	Low Density Lipoprotein
kDa	kilo Dalton
kb	kilo (paire de) bases
MEM	Minimum Eagle's Medium
min	minute
MMP	Matrix MetalloProtease
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPD	Ortho Phénylène Diamine
SDS-PAGE	SDS-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
PAB	Para amino benzamidine
pb	paire(s) de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phényl Méthyl Sulfonide
PZQ	Praziquantel
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
rSmSP1	SmSP1 recombinante
SEA	Soluble Egg Antigen
Sm28GST	Glutathion S-Transférase de 28kDa de <i>S. mansoni</i>
SmSP1	<i>S. mansoni</i> sérine protéase 1 (nom donné à la sérine protéase nouvellement identifiée)
SRP	Schistosomula Released Products
SWAP	Soluble Worm Antigen Preparation
TNF	Tumor Necrosis Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
X-Gal	5 Bromo 4 Chloro 3 Indoyl B D Galactopyranoside

Généralités

La Schistosomiase

ou

Bilharziose

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

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

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

1. Le Parasite

What is a parasite?

Parasites are punctual, prudent, prolific, periparturient, pampered, pandemic, particular, pathogenic, peculiar, pecunial, pejorative, pleiomorphic, penetrating, peragate, perforating, periclitate, perineal, peripatetic, permeable, pernicious, perpetual, perplexing, persevering, pertinaceous, perturbatory, pestilential, piercing, pleonastic, poisonous, polygametic, populous, polyphyletic, practical, prevalent, problematic, profligate, progenitive, promiscuous, prompt, propinquent, protean, proximate, provident, palpable, punctilious, pyrogenic.

Parasites are not parsimonious, pathetic, peaceful, penitent, pessimistic, perambulatory, pleasing, poetic, pretentious, pretty (H. Mc L.Gordon in "Biochemical Adaptation in Parasites").

1.1 Taxonomie

Les schistosomes (figure 1) sont des vers plats appartenant à l'embranchement des Plathelminthes (vers plats non segmentés), à la classe des Trématodes, sous-classe des digènes (deux hôtes), à la famille des Schistosomatidae et au genre *Schistosoma* qui rassemble 19 espèces. Parmi elles, cinq espèces sont des parasites de l'homme, mais trois d'entre elles, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma japonicum*, constituent une menace plus grave pour la santé publique du fait de leur fréquence, de l'étendue de leur distribution et de leur pathogénicité. La distinction entre les espèces est basée sur des critères morphologiques, biochimiques, parasitologiques (localisation géographique, hôtes intermédiaires et définitifs,...) et pathologiques (localisation tissulaire...).

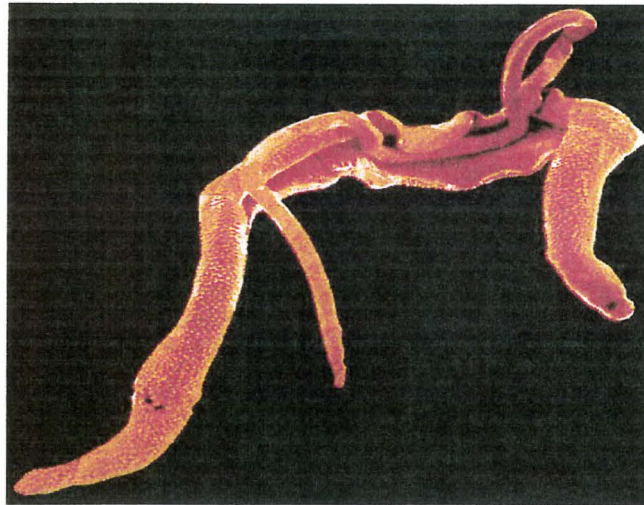


Figure 1: Couple de Schistosome

Contrairement à l'immense majorité des trématodes, les schistosomes ont des sexes séparés et présentent un très fort dimorphisme sexuel. Cependant, il semble que le schistosome soit malgré tout capable d'hermaphroditisme (Bash *et al.*, 1990) ou de parthénogénèse (Basch *et al.*, 1984).

Chez le schistosome, l'accouplement est permanent, le mâle (long de 5 à 11 millimètres) loge la femelle (jusqu'à 20 millimètres) dans son canal gynécophore. Les couples ainsi formés semblent alors fidèles (Tchuem Tchuente *et al.*, 1996). Sans cet accouplement, les femelles restent de petite taille et sont incapables de parvenir à maturité sexuelle (Basch *et al.*, 1990). Le mâle n'a besoin, ni d'être fertile, ni d'être de la même espèce, pour induire la maturation des femelles.

1.2 Principales espèces infectant l'homme

S. mansoni, *S. japonicum* et *S. mekongi* sont associés aux bilharzioses intestinales, *S. haematobium* est responsable de la bilharziose uro-génitale et *S. intercalatum* de la bilharziose rectale. Les diverses pathologies sont dues à une localisation différente de l'espèce chez l'hôte définitif. *S. haematobium* s'établit dans l'appareil uro-génital, *S. mansoni* dans les veines mésentériques supérieures et *S. japonicum* au niveau des veines mésentériques inférieures.

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

1.3 Cycle parasitaire

Le cycle parasitaire (figure 2) s'effectue entre un hôte définitif mammifère et un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce. Les mollusques-hôtes sont spécifiques de chaque espèce: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* et *S. mekongi* infectant respectivement les genres *Biomphalaria*, *Bulinus*, *Oncomelania* et *Neotricula*.

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

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

Le jeune parasite va alors se différencier en **schistosome** et subir une maturation sexuelle. S'il est de sexe mâle, il acquiert la morphologie caractéristique du schistosome mâle, sa face ventrale formant un canal gynécophore dans lequel se loge la femelle. Il s'accouple ainsi à une femelle schistosome qui peut, alors seulement, atteindre sa maturité sexuelle.

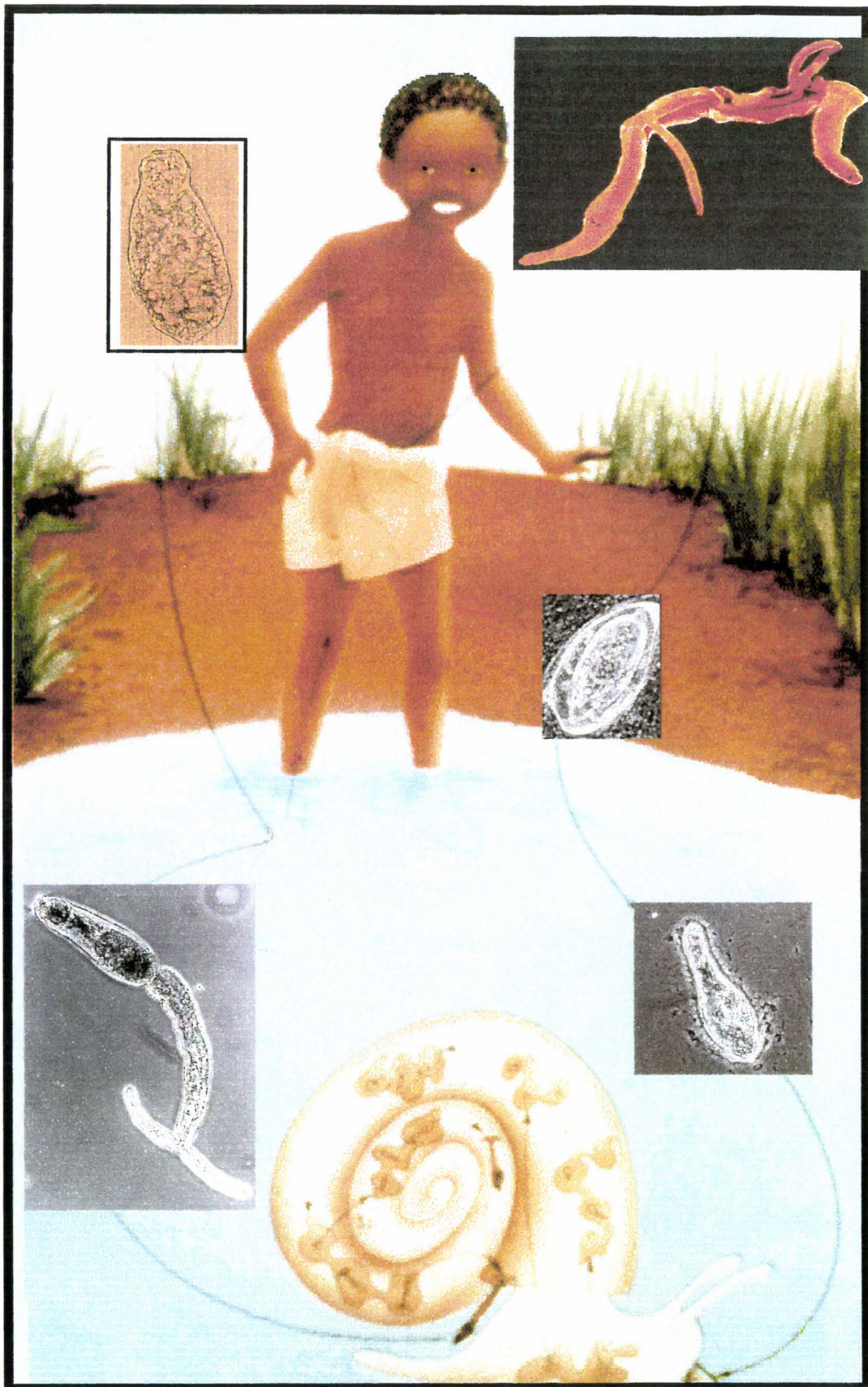


Figure 2 : Cycle évolutif de *S. mansoni*

Chez l'homme, les vers peuvent demeurer accouplés pendant plusieurs années. Les vers appariés se déplacent ensuite à contre-courant du flux sanguin grâce à leurs deux ventouses latérales et vont gagner leur lieu de ponte. La majorité des espèces de schistosomes infectant l'homme va se nicher dans les veines proches de l'intestin. L'espèce *S. haematobium*, quant à elle, a un tropisme particulier pour le système uro-génital.

Les femelles matures vont produire des œufs en continu; on estime que la femelle de *S. mansoni* pond jusqu'à 300 œufs par jour. Les œufs sont ensuite disséminés dans divers organes internes, notamment le foie, où à la faveur du rétrécissement des vaisseaux sanguins, ils se trouvent bloqués. Les œufs sont alors la cible d'une forte réaction inflammatoire désignée sous le terme de réaction granulomateuse. Ces granulomes sont responsables de la pathologie liée à l'infection. Les œufs qui parviennent à franchir les muqueuses de l'appareil urinaire (*S. haematobium*) ou intestinal (*S. mansoni* et *S. japonicum*), par la sécrétion de substances protéolytiques, sont alors excrétés dans les urines ou les selles et ainsi libérés dans l'eau.

Les œufs vont alors donner naissance, quand certaines conditions de milieu sont réunies (pH neutre, luminosité suffisante, hydrométrie, salinité modérée et température proche de 30°C), à une forme larvaire libre, le **miracidium**. Celui-ci est extrêmement mobile car doté de cils vibratiles lui permettant de se déplacer en quête de son hôte intermédiaire, le mollusque, vraisemblablement attiré par des facteurs chimiotactiques.

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

L'étude des " profils d'émergence " des cercaires révèle une ponctualité intéressante, en effet, la forme infestante va quitter son hôte intermédiaire à une heure de la journée qui coïncide le mieux avec le moment où son hôte définitif fréquente le milieu aquatique (Combes *et al.*, 1993). Ainsi, les larves de *S. mansoni* seront libérées vers le milieu de la journée (pic à 11h) lorsque les activités de l'homme (travail, tâches ménagères ou loisirs) les mènent au contact de l'eau, alors que les cercaires de l'espèce *S. bovis* seront présentes dans l'eau à l'heure où le bétail vient s'abreuver (pic à 9h). Cette chronobiologie

cercarienne est génétiquement déterminée chez le schistosome et ne dépend pas de l'activité propre du mollusque (Théron & Combes, 1988).

1.4 Hôtes définitifs

1.4.1 Réservoirs mammaliens naturels

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

Certains mammifères sont infestés occasionnellement et d'autres constituent un authentique réservoir de la schistosomiase; ils peuvent entretenir l'infestation entre eux, sans la présence de l'homme.

Dans le cas de *S. japonicum*, les réservoirs animaux ont une très grande importance en santé publique. Les principaux réservoirs, mise à part l'espèce humaine, sont par ordre d'importance décroissante: les bovins domestiques, les porcs, les chiens et les rats. En Indonésie, cinq espèces de rongeurs et certains animaux domestiques (vaches, buffles, chiens et chevaux) sont parasités par *S. japonicum*.

Au Brésil, les rongeurs qui constituent les hôtes les plus fréquents et les plus abondants de *S. mansoni* peuvent transmettre l'infection, ce qui justifie des études complémentaires sur l'importance épidémiologique.

En revanche, on ne connaît pas d'hôte définitif, autre que l'homme pour *S. haematobium*.

1.4.2 Modèles animaux

La compréhension de la schistosomiase a été facilitée par l'utilisation de nombreux modèles animaux de laboratoire aisément manipulables et susceptibles à l'infection. Nous n'évoquerons ici que le cas de la schistosomiase à *S. mansoni*.

Le **hamster**, considéré comme l'hôte le plus susceptible à *S. mansoni*, est largement utilisé en laboratoire notamment pour le maintien du cycle parasitaire. En effet,

il assure une maturation complète du parasite et permet une obtention aisée de vers adultes et d'un grand nombre d'œufs viables.

La **souris** est également très susceptible à l'infection par *S. mansoni*. Même si elle ne permet pas la récupération d'un aussi grand nombre de vers adultes que le hamster, elle demeure un modèle très utilisé et étudié en laboratoire.

Le **lapin** et le **cobaye** sont peu utilisés car même si les vers adultes sont de taille normale, ils ne pondent pas ou très peu d'œufs. Cependant, Pearce *et al.* (1983) ont montré que ce modèle développait une importante résistance à la réinfection associée à une pathologie limitée avec néanmoins une ponte d'œufs non viables et non excrétés dans les fécès.

Le **rat**, hôte semi-permissif, est un modèle de plus en plus étudié. En effet, les formes larvaires accomplissent leur cycle évolutif jusqu'au stade de migration hépatique mais dès la 4^{ème} semaine, le rat est capable de se débarrasser des vers ainsi complètement éliminés à la 6^{ème} semaine. Ensuite, le rat développe une résistance à la réinfection (Smithers *et al.*, 1965).

Enfin, le **singe Rhésus** (*Macaca mulatta*) et le **babouin olive** (*Papio anubis*) sont tout deux des hôtes très susceptibles à l'infection par *S. mansoni*.

1.5 Biologie du parasite

1.5.1 Métabolisme général du schistosome

Le schistosome est un parasite sanguicole principalement hématophage. La femelle consomme environ 1,4 millions d'hématies par jour, soit dix fois plus que le mâle. Les globules rouges sont lysés et l'hémoglobine libérée est dégradée par une hémoglobinase (Davis *et al.*, 1987) et la cathepsine B (Götz & Klinkert, 1983), permettant ainsi au parasite de subvenir à leurs besoins anaboliques en acides aminés. Chez le schistosome, les mécanismes de détoxification des composés endogènes ou exogènes restent encore méconnus. La fonction d'excrétion des déchets est principalement assurée par les protonéphridies qui constituent un système de tubules s'ouvrant sur un néphridiopore. Ce système est probablement impliqué dans l'élimination des déchets issus du métabolisme de l'azote.

Les enzymes de détoxification exprimées par le parasite interviennent dans la protection contre les dérivés oxydants générés par les radicaux libres issus du métabolisme cellulaire ou émis par le système immunitaire de l'hôte (Callahan *et al.*, 1988). Ainsi, ont été isolées chez *S. mansoni* deux glutathion S-transférases de 26kDa et 28kDa, (Trottein *et al.*, 1990; Balloul *et al.*, 1987a), dont la dernière a fait l'objet d'une étude plus détaillée grâce à son potentiel vaccinal et sera présentée ultérieurement. Ont été également caractérisées une glutathion peroxydase (Williams *et al.*, 1992), ainsi que des superoxyde dismutases (Simurda *et al.*, 1988; Da Silva *et al.*, 1992).

Le schistosome est également un grand consommateur de glucose qu'il stocke sous forme de glycogène. Les vers adultes vivant dans le système circulatoire dégradent les sucres par la voie de fermentation et produisent du lactate. Quant aux stades dits "libres" (miracidium et furcocercaire), la production d'énergie métabolique se réalise par voie aérobie en dégradant le glycogène endogène via le cycle de Krebs et qui aboutit à la production de CO₂. Les schistosomules vont passer ensuite très rapidement de ce métabolisme aérobie à une fermentation lactique. Chez l'hôte intermédiaire, le mollusque, les sporocytes sont des anaérobies facultatifs. Leur métabolisme est ajusté selon le mode de vie de leur hôte.

Certaines enzymes du métabolisme glucidique ont été décrites chez *S. mansoni*, c'est le cas de la G3PDH ou glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Goudot-Crozel *et al.*, 1989) ainsi que la lactate déshydrogénase et la triose-phosphate isomérase (Shoemaker *et al.*, 1992b), pour lesquelles des formes membranaires ont été décrites.

1.5.2 Protéines structurales, de choc thermique et les glycoprotéines

- Les protéines de structure:

Pearce *et al.* (1986) ont caractérisé une molécule de 97kDa, la Sm 97, qui a été ensuite identifiée à une paramyosine (Lanar *et al.*, 1986).

Cette protéine a une structure en hélice- α et constitue le coeur des filaments de myosine. D'autres molécules de structure, la myosine, la tropomyosine et l' α -tubuline ont également été identifiées chez *S. mansoni* (Newport *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 1989; Duvaux-Miret *et al.*, 1991). Un homologue de la chaîne lourde de la β -myosine, la molécule irv-5 a été identifiée et s'est révélée être un candidat vaccinal majeur (Amory-Soisson *et al.*, 1992).

Les protéines de structure ont également été décrites comme impliquées dans l'immunité anti-schistosome.

- Les protéines de choc thermique:

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

- Les glycoprotéines :

L'importance des épitopes de nature glycosidique dans les infections par les helminthes et particulièrement dans la schistosomiase, a été largement décrite. Des études à partir d'infections expérimentales et humaines par *S. mansoni*, couplées à l'utilisation d'anticorps monoclonaux ont permis de caractériser une glycoprotéine de 38 kDa (Dissous *et al.*, 1982; 1984) présente à la surface des schistosomules. Cet antigène fortement immunogénique s'est révélé posséder un épitope (protecteur) commun non seulement avec un oligosaccharide de *Biomphalaria glabrata*, mais aussi avec l'hémocyanine d'un mollusque marin (*Megathura crenulata*) ou KLH (pour "Keyhole Limpet Haemocyanin")

(Dissous *et al.*, 1986). Or il a été décrit que les structures oligosaccharidiques pouvaient jouer un rôle essentiel dans l'adaptation osmotique des microorganismes (Miller *et al.*, 1986). Il est donc tentant d'interpréter cette conservation de l'épitope glycanique de la 38kDa au cours de l'évolution, en terme d'adaptation du schistosome aux brusques modifications d'osmolarité, notamment entre le stade larvaire aquatique et le stade schistosomule dans les tissus de l'hôte définitif.

1.5.3 Les protéases et inhibiteurs de protéases

Ce thème fera l'objet d'un chapitre ultérieur.

1.5.4 Génome du schistosome

Le génome nucléaire du schistosome comprend environ $2,7.10^8$ pb (Simpson *et al.*, 1982). Il est composé de 4 à 8% de séquences hautement répétées et de 60% de séquences présentes en copie unique. Il est particulièrement riche en bases A et T (66%). Les schistosomes possèdent 7 paires de chromosomes autosomes et une paire de chromosomes sexuels (ZZ pour le mâle et ZW pour la femelle). Par la technique de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), on ne distingue pas de polymorphisme entre les souches d'une même espèce isolées de zones géographiques distinctes (Simpson *et al.*, 1995).

Les connaissances sur le génome du schistosome sont assez fragmentaires. Cependant, au vu du cycle complexe du parasite, impliquant de nombreux changements morphologiques, physiologiques et biochimiques, il est admis que le génome du schistosome doit être particulièrement adaptatif, en terme de régulation de l'expression des gènes, et de réponse aux différents stress.

En dehors des gènes constitutifs, on peut donc s'attendre à l'existence de deux groupes de gènes: un premier groupe régulé par le stress (thermique, osmotique ou oxydatif) et un second régulé au cours du développement du parasite.

Cette régulation peut se traduire tout d'abord en termes d'organisation des gènes. Ainsi il a été décrit chez *S. mansoni* la présence d'introns de très petite taille (entre 30 et 50pb) (Craig *et al.*, 1989; Duvaux-Miret *et al.*, 1991; Roche *et al.*, 1994). A l'opposé, certains gènes du schistosome présentent des introns d'une taille supérieure à 3kb. C'est le cas de la glutathion-péroxydase (Roche *et al.*, 1994), de l'HGPRTase (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase) (Craig *et al.*, 1989) et de la glutathion S-transférase Sm28 (Mc

Nair *et al.*, 1993). Enfin d'autres gènes tels que ceux codant pour des protéines de la coquille d'œuf (Henkle *et al.*, 1990; Bobek *et al.*, 1988; 1989) ou celui de la hsp 70 (Neumann *et al.*, 1992), ne possèdent pas d'intron.

Bien que les très petits introns décrits ne présentent pas les 11 pyrimidines successives nécessaires au mécanisme d'épissage décrit chez les eucaryotes, les séquences consensus de jonction (GT en 5' et AG en 3') existent. D'autre part, des mécanismes d'épissage alternatif ont été décrits (Davis *et al.*, 1988; Shoemaker *et al.*, 1992a) ainsi que des mécanismes d'épissage en *trans*.

Peu d'études concernent la régulation de l'expression des gènes du schistosome par des facteurs de transcription. Cependant, les régions promotrices de plusieurs gènes ont montré des séquences homologues à des motifs de reconnaissance de facteurs de transcription décrits chez les eucaryotes (Faisst *et al.*, 1992). L'évaluation fonctionnelle des différents sites décrits est actuellement limitée par l'absence de lignée cellulaire de schistosome. Cependant, Khalife *et al.* (1995) ont montré, dans un système hétérologue, que le site AP1 situé dans la région 5' du gène de la calréticuline était fonctionnel *in vitro*. Par ailleurs, Zemzoumi *et al.* (1995) ont, d'une part, montré l'interaction de facteurs nucléaires de *S. mansoni* avec la CCAAT box décrite sur le gène de la Sm28GST et, d'autre part, cloné la sous-unité NF-YA du facteur liant cette CCAAT box (Zemzoumi *et al.*, 1996). L'implication des deux CCAAT box et du site AP1 dans l'activité promotrice de ce gène a été confirmée *in vitro* (Serra *et al.*, 1996).

2. Régions endémiques

2.1 Distribution mondiale

Les schistosomiases sont endémiques dans 74 pays et territoires sur les continents africain, américain et asiatique. 600 millions de personnes sont exposées au risque d'infection et 200 millions sont infectées. Les schistosomes étant exigeants vis-à-vis de leurs hôtes intermédiaires mollusques d'eau douce, les zones du globe susceptibles d'abriter une endémie bilharzienne (figure 3) sont celles qui offrent simultanément au moins une espèce de mollusque vecteur compatible, des conditions d'hygiène humaine déficientes ainsi que des conditions hydriques convenables (eau douce, température supérieure à 20°C).

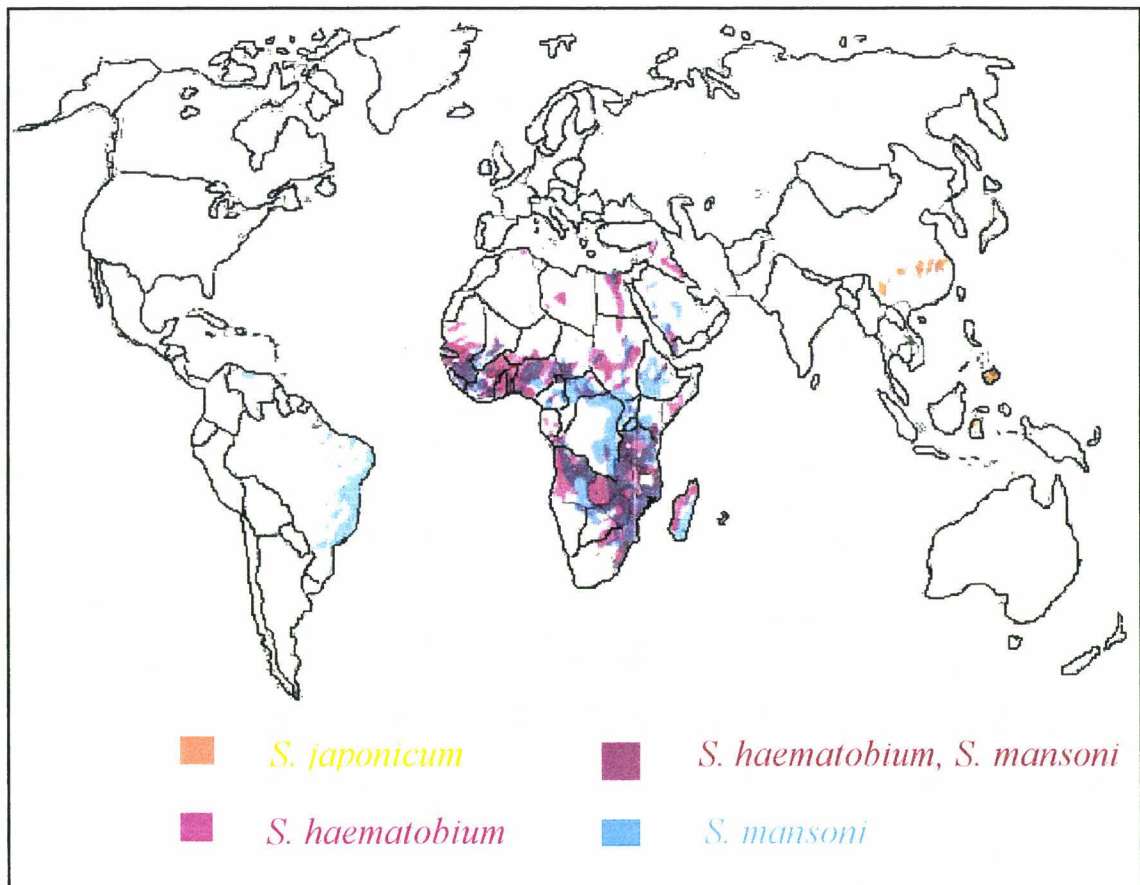


Figure 3 : Répartition géographique des différentes espèces de schistosomes (d'après l'Organisation Mondiale de la Santé, 1998)

S. haematobium est endémique dans 54 pays d'Afrique et de Méditerranée orientale et on estime à 90 millions le nombre de personnes infectées. *S. mansoni* concerne 53 pays situés en Afrique, dans la péninsule arabique, en Amérique du Sud et dans les Caraïbes. Les deux espèces sont observées simultanément dans 41 pays d'Afrique et de la Méditerranée orientale.

S. japonicum et *S. mekongi* sévissent dans 7 pays d'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental. L'espèce *japonicum* est notamment présente en Chine, aux Philippines, au Japon et en Indonésie, alors que *S. mekongi* a été identifié au Cambodge et au Laos (presqu'île du Mékong).

S. intercalatum est quant à lui, un parasite strictement africain. Sa présence a été détectée au Tchad, en Ouganda, au Zaïre, au Gabon et au Cameroun.

2.2 Distribution dans les pays

A l'intérieur d'un pays, la schistosomiase peut avoir une distribution fort inégale. Dans certains pays, c'est la quasi totalité de la population qui est exposée, comme en Egypte, par exemple, où les réseaux d'irrigation mis en place pour accroître la production vivrière ont intensifié la transmission sur toutes les terres irriguées par le Nil. Dans de nombreux autres pays, la prévalence et la gravité de l'infestation varient selon les foyers, notamment liés aux cultures de riz et de canne à sucre (Niger) ou à de nombreux petits barrages installés dans certains villages. De plus, *S. mansoni*, *S. haematobium*, et *S. intercalatum* coexistent dans plusieurs pays d'Afrique centrale et occidentale. Cette cohabitation peut avoir plusieurs conséquences importantes (Tchuem Tchuente *et al.*, 1996). Tout d'abord, elle peut exercer une influence sur l'épidémiologie du parasite. Ainsi, l'existence d'un mécanisme de compétition entre deux espèces de parasites capables d'infecter le même hôte peut entraîner un phénomène d'exclusion. Un facteur important limitant la distribution de *S. intercalatum* en Afrique pourrait provenir d'une telle exclusion entre cette espèce et *S. mansoni* (Tchuem Tchuente, 1995) ou *S. haematobium*. D'autre part, cette compétition entre les différentes espèces pourrait en partie expliquer la localisation différente des schistosomes africains chez leur hôte humain: *S. mansoni* est retrouvé dans l'intestin, *S. haematobium* dans la vessie et *S. intercalatum* dans le rectum.

2.3 Dynamique des populations de schistosomes

La dynamique des populations parasites est complexe et n'est pas régie par de simples règles de proportionnalité. Des facteurs liés à l'hôte, par exemple le comportement et le statut immunitaire des populations humaines, déterminent, conjointement à des facteurs écologiques comme la densité et le taux d'infestation des populations de gastéropodes, hôtes intermédiaires, l'importance et la distribution de la population parasite dans les communautés humaines.

De plus, il apparaît de nouveaux foyers endémiques dus au développement de l'irrigation, à la construction d'innombrables petits réservoirs, au développement d'aquaculture et enfin le flux migratoire même des populations humaines a également modifié la répartition géographique des aires d'endémies; on assiste donc à une épidémiologie en constant remaniement.

On connaît en effet, de nombreux exemples, partout dans le monde, où la construction de barrages a provoqué l'introduction ou la propagation de la schistosomiase. Le nombre de retenues d'eau de grandes dimensions, construites chaque année, intéresse en grande partie le continent africain, mais le nombre de lacs artificiels ne cesse d'augmenter au Brésil et au Venezuela et l'on observe également la construction de grands barrages en Asie. D'aussi nombreuses constructions font peser une lourde menace en santé publique du fait de l'extension des maladies à transmission hydrique ou autres endémies telles que le paludisme et les filarioses. Au Ghana, par exemple, le barrage de la Volta a donné naissance à la plus grande retenue d'eau artificielle au monde, ce qui augmenta jusqu'à 90% la prévalence de l'infestation à *S. haematobium*, jusqu'alors de 5 à 10% dans le bassin de ce fleuve.

De même, l'aménagement du delta et de la basse vallée du fleuve Sénégal pour la culture de la canne à sucre a permis la multiplication de *Biomphalaria* dans les canaux d'irrigation. La bilharziose intestinale, jusque là inconnue, s'est alors développée d'une manière explosive: à Richard-Toll, le dépistage des premiers cas a été réalisé en 1988, et 30 mois plus tard, 60% de la population était atteinte.

Additionné à tous ces facteurs, le flux migratoire des populations va également modifier la répartition géographique des aires d'endémies. Le déplacement de population de réfugiés par exemple a des répercussions importantes sur la distribution et la transmission de la maladie. Là où de nombreux réfugiés viennent s'installer en zone rurale

ou à la périphérie des villes, de graves problèmes de santé publique apparaissent. C'est ainsi que *S. mansoni* a été introduit dans le nord-ouest de la Somalie par des réfugiés venus d'Ethiopie.

3. Pathologies associées à la schistosomiase

La schistosomiase est provoquée par cinq espèces de parasites présentés précédemment. Chacune d'elles peut donner naissance à une maladie aiguë ou chronique dont la symptomatologie clinique est extrêmement variable. Les manifestations cliniques sont associées à l'intensité de l'infection, à la souche du parasite, à la fréquence des réinfections, au statut immunitaire ainsi qu'à des facteurs génétiques de l'individu infecté. Les prévalences d'infection les plus élevées et l'intensité des infections les plus importantes sont observées chez les enfants âgés de 5 à 15 ans, le nombre d'œufs excrétés et l'intensité des lésions diminuant au cours du temps (Larivière, 1993). Néanmoins, d'après des études échographiques sur une population infectée par *S. mansoni*, il s'avère que les adultes (40 à 49 ans) excréant le moins d'œufs sont également ceux qui ont la plus forte prévalence de fibrose hépatique avancée (Wiest, 1996).

3.1 Manifestations cliniques

L'infestation par *S. haematobium* se manifeste par des troubles urinaires (hématurie) pour 70% des sujets parasités d'une localité où la maladie est endémique. La gravité de ces troubles dépend principalement de l'intensité de l'infection. Chez les sujets modérément ou massivement infestés, on observe très souvent, particulièrement chez les enfants, des lésions très importantes des voies urinaires pouvant aboutir à une uropathie obstructive. Les granulomes bilharziens autour d'un œuf constituent une réaction précoce aiguë, déterminant, par exemple, des ulcérations urothéliales. En phase de chronicité, généralement chez des sujets plus âgés, on observe plus fréquemment une fibrose et une calcification urétrales et vésicales. Certaines lésions des voies urinaires sont réversibles chez l'enfant et cèdent au traitement, mais chez l'adulte, les lésions plus importantes, avec calcifications vésicales, ne régressent pas toujours.

En ce qui concerne l'infection par *S. japonicum* et *S. mekongi*, la maladie clinique en phase aiguë, ou fièvre de Katayama, qui suit l'invasion par les furcocercaires, se caractérise par une organomégalie, de la fièvre et une éosinophilie.

S. intercalatum est moins bien connu que les autres schistosomes et est considéré comme l'espèce la moins pathogène pour l'homme bien que responsable d'infection en Afrique centrale et occidentale. Les lésions intestinales se limitent au rectum et au sigmoïde. On observe parfois des granulomes périovulaires dans la région portale du foie et une hypertrophie du lobe gauche accompagne les infections massives. La fibrose hépatique et l'hypertension portale sont inconnues dans cette schistosomiase.

*3.2 Cas de la bilharziose intestinale à *S. mansoni**

Les principales répercussions en santé publique sont associées aux infections chroniques, qui conduisent à des troubles intestinaux et à une atteinte hépatosplénique.

La **phase d'infestation** par pénétration transcutanée de cercaires lors d'un bain en eau contaminée d'un sujet naïf se manifeste par une réaction cutanée allergique appelée "dermatite du nageur". Puis, au bout de quelques semaines ou mois (phase de migration des schistosomules), la **phase d'invasion** se manifeste par des réactions immuno-allergiques. Apparaissent alors des troubles souvent attribués à une fatigue: fièvre associée ou non à des symptômes tels que l'urticaire, l'oedème, les sueurs, la toux ou des troubles digestifs. A ce stade, on observe une hyperéosinophilie sanguine mais le diagnostic ne peut être affirmé que par analyse sérologique. Sans traitement, cette phase peut persister plusieurs semaines, alors qu'elle régresse rapidement sous thérapie spécifique. Enfin, l'installation des vers adultes dans leur site définitif et la ponte des œufs 2 mois minimum après infestation peuvent engendrer des manifestations cliniques plus tardives; c'est la **phase d'état**. Les formes les plus bénignes se manifestent par une gêne intestinale (forme chronique intestinale) due à la présence des œufs. Dans les régions à faible prévalence, les manifestations cliniques sévères ne concernent qu'une proportion relativement faible des patients.

Là où la maladie a une prévalence élevée, on observe chez les sujets parasités des douleurs abdominales, une asthénie et des diarrhées sanglantes dues au passage des œufs au travers de la muqueuse intestinale. Le dépôt des œufs dans les tissus entraîne une réaction

inflammatoire conduisant à la formation d'un granulome. Celui-ci est composé en majorité d'éosinophiles et en proportion plus faible de lymphocytes T et B, de macrophages, de mastocytes, de fibroblastes (Weinstock & Boros, 1993). L'évolution progressive de cette réponse granulomateuse est à l'origine d'hypertension portale et de cirrhose hépatique. Une circulation collatérale se met en place avec apparition de varices oesophagiennes dont la rupture peut conduire à d'importantes hémorragies. L'hypertension peut être responsable d'une fuite du plasma sanguin dans la cavité abdominale (formation d'ascite) ou dans les tissus (oedèmes).

3.3 Le diagnostic

Le diagnostic de la schistosomiase peut se faire par des techniques parasitologiques, immunologiques ou indirectes. Le choix d'une technique parasitologique pour le diagnostic dépend de l'objectif, en effet, une méthode qualitative suffit à repérer les sujets infectés lors d'une campagne de dépistage à grande échelle.

La technique quantitative de filtrations des urines pour *S. haematobium*, dans le cadre d'une schistosomiase urinaire, suffit à mettre en évidence les œufs du parasite. Dans le cas de la schistosomiase intestinale, l'examen direct d'un fragment de matières fécales est peu sensible; mieux vaut, pour repérer toute la gamme des helminthes et des protozoaires parasites de l'intestin, utiliser une technique d'enrichissement (méthode de Kato ou frottis épais sous cellophane-sédimentation, MIF (mercurothiolate-iode-formol)-concentration). Par ailleurs, l'observation d'une hématurie macroscopique est une méthode simple pour affirmer une infestation massive à *S. haematobium* chez les enfants en zone d'endémie.

Ainsi, ces techniques permettent le dépistage de l'infection ou l'évaluation de son intensité: infection massive au-delà de 50 œufs de *S. haematobium* par 10 ml d'urine ou 800 œufs de *S. mansoni* par gramme de matières fécales.

L'épreuve sérologique actuellement disponible repose sur la détection d'anticorps et ne permet pas de distinguer une infection évolutive d'une infection antérieure ou d'une réinfection. La mise en évidence et le titrage d'antigènes circulants de schistosomes, dans le sang ou les urines, éliminent néanmoins certains inconvénients des autres techniques et

offrent des perspectives intéressantes pour les études épidémiologiques et les programmes de lutte.

Enfin, l'imagerie médicale telle que l'échographie permet la visualisation et la détection plus aisée des remaniements hépatiques ou vésicaux, mais son coût élevé et son absence dans des infrastructures locales limite son usage.

3.4 Schistosomiasés et co-infections

Dans les pays en voie de développement, les schistosomiasés sont fréquemment associées à d'autres infections, aggravant ainsi le tableau clinique.

3.4.1 Schistosomiase et cancer

Si la schistosomiase est associée à plusieurs cancers, il y a tout lieu de penser, d'après des observations épidémiologiques, que les schistosomes ne sont que des agents co-cancérogènes. Néanmoins, *S. haematobium* est associé au développement d'une certaine forme de cancer vésical, ceci d'après des études expérimentales réalisées sur des primates (Mostapha *et al.*, 1995).

3.4.2 Hépatite virale

Dans plusieurs pays (Egypte, Koweït et Soudan), il a été constaté que les antigènes du virus de l'hépatite B (HBV) étaient nettement plus fréquents dans le sang des patients hospitalisés parasités par *S. mansoni*, spécialement en cas d'atteinte hépatosplénique, que chez les témoins exempts de schistosomiase. Il semble, d'après certaines études que l'interaction entre l'hépatite B et l'infestation à *S. mansoni* détermine des troubles hépatiques chroniques plus graves et nécessite plus souvent une hospitalisation.

3.4.3 Infections bactériennes

L'association fréquente de salmonellose et de schistosomiase est connue de longue date et l'on sait que ces bactéries disparaissent complètement après le traitement contre la schistosomiasé. La présence simultanée de la bactérie et du parasite détermine une fièvre prolongée, une hépatosplénomégalie importante, une éosinophilie ainsi que la présence

durable de salmonelles dans les hémocultures. Le traitement efficace de la schistosomiase suffit parfois à guérir aussi la salmonellose, mais il arrive qu'une antibiothérapie soit indispensable.

3.4.4 Virus de l'immunodéficience humaine

Jusqu'ici, l'association de la schistosomiase et de l'infection par le VIH a été rarement signalée. Néanmoins, l'observation d'une réactivité immunologique croisée vis-à-vis d'un facteur infectieux du virion du VIH-1 (vif) (Khalife *et al.*, 1990) et d'un antigène de surface de *S. mansoni* est un argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle la schistosomiase, qui détermine elle aussi une altération sensible de la fonction immunitaire, pourrait modifier la sensibilité du malade au VIH et inversement.

4. Lutttes contre les Schistosomiases

Les divers aspects sur lesquels on peut mettre l'accent dans une stratégie visant à réduire la morbidité pourraient être l'éducation pour la santé, le diagnostic, le traitement des cas et la promotion de l'approvisionnement en eau saine et d'un assainissement efficace. Si l'on se donne pour objectif de limiter la transmission, il faut normalement alors inclure la destruction des gastéropodes, hôtes intermédiaires, la modification de l'environnement. Les méthodes appliquées dans le cadre de ces stratégies ne sont ni indépendantes ni propres à une stratégie particulière; toutes contribuent, si elles sont parfaitement gérées et mises en œuvre selon un calendrier optimal, à réduire à la fois la morbidité et la transmission. Enfin, les stratégies de prophylaxie médicale, associant approche vaccinale et chimiothérapie viennent compléter les multiples approches visant à limiter la maladie.

4.1 L'éducation pour la santé, approvisionnement en eau et assainissement

L'éducation pour la santé a pour objectif de promouvoir et de renforcer des comportements favorables à la santé, avec la participation tant de chaque individu que de la collectivité. L'objectif de cette dernière est de faire comprendre à tout un chacun que son propre comportement, principalement les pratiques concernant l'utilisation de l'eau et le refus de faire appel aux services de dépistage existants ou de suivre le traitement médical prescrit est un facteur décisif dans la transmission et la manifestation de la maladie.

Un programme d'éducation pour la santé a davantage de chances d'être efficace s'il comporte des objectifs définis et réalistes. L'Organisation Mondiale de la Santé a publié un ouvrage visant à aider les pays concernés à élaborer un programme d'éducation pour la santé dans la lutte contre la schistosomiase (1990).

Les techniques de communication qui sont simples, ne heurtant pas la culture locale et tenant compte de la façon dont la maladie est perçue dans la collectivité, sont a priori les plus efficaces. La participation communautaire est essentielle dans tout programme de

lutte. Une stratégie globale, incluant à la politique d'assainissement, d'une part le dépistage et le traitement des populations infectées et, d'autre part, une éducation sanitaire des populations infectées, a déjà prouvé son efficacité à Porto Rico et en Arabie Saoudite. Mais en raison du coût de cette stratégie et des dispositions très difficiles à mettre en place sur le terrain, elle n'a pu s'étendre à tous les pays concernés par la schistosomiase (Capron, 1993).

Un approvisionnement abondant en eau saine contribue, parallèlement à l'assainissement, à réduire la prévalence de la schistosomiase et à en atténuer la gravité. Les procédés retenus doivent avoir pour objectif d'améliorer la salubrité de l'eau et de réduire au minimum les contacts avec une eau contaminée. Il faut pour cela adopter une approche globale qui prenne en compte l'approvisionnement en eau, l'évacuation des excréments et des eaux de pluie, le drainage des eaux domestiques ainsi que les installations pour la toilette et la lessive. Malheureusement, dans de nombreux pays en développement, l'approvisionnement en eau dans les zones rurales et urbaines soulève des difficultés pour la mise en place des installations et de leur entretien.

4.2 Lutte anti-vectorielle

Cette lutte vise à interrompre le cycle du parasite en intervenant au niveau du mollusque-hôte intermédiaire. La lutte contre les gastéropodes est l'une des méthodes de choix pour enrayer la transmission de la schistosomiase; elle repose sur l'utilisation de molluscicides, chimiques ou végétaux, ou d'agents biologiques et sur l'aménagement de l'environnement.

4.2.1 Molluscicides chimiques et végétaux

L'intérêt des molluscicides dans la lutte contre la schistosomiase dépend des conditions épidémiologiques et écologiques locales, ainsi que des ressources humaines et financières disponibles. L'utilisation de molluscicides dans toute une zone, généralement associée à l'exploitation d'un grand réseau d'irrigation, est une méthode coûteuse. L'utilisation peut se limiter à l'intérieur de collectivités où la schistosomiase a une prévalence élevée, cependant les contacts humains avec les eaux contaminées se faisant sur

une vaste étendue, il est difficile de bien choisir les endroits et le calendrier de l'utilisation des molluscicides.

Ainsi, aucun molluscicide n'a constitué une réelle innovation. Néanmoins, un seul produit, le Niclosamide, est massivement utilisé dans les programmes de lutte. Si en Egypte le sulfate de cuivre est encore utilisé, les sels de cuivre ont été largement abandonnés.

Ce procédé reste néanmoins peu spécifique et doit être renouvelé fréquemment pour empêcher une éventuelle recolonisation des sites par le mollusque. Cette stratégie, par les risques écologiques qu'elle suscite et par son coût extrêmement élevé, est en réalité difficilement envisageable, même pour une application très locale. Actuellement, des études se poursuivent pour que l'emploi de ces produits puisse se faire à grande échelle, sans entraîner aucun risque écologique.

En ce qui concerne les molluscicides végétaux et malgré l'abondance des travaux de recherche, aucun produit de ce type n'a été utilisé à grande échelle dans un pays d'endémie.

4.2.2 Lutte biologique

L'utilisation de prédateurs de mollusques a parfois permis de lutter contre les bulins; cependant leur utilisation dans certains foyers a été catastrophique, entraînant une élimination de nombreuses espèces sans avoir aucun effet sur celle visée (Combes *et al.*, 1992).

Des compétiteurs biologiques tels que des mollusques non vecteurs ont été expérimentalement introduits dans certains foyers, mais cette méthode, malgré quelques essais encourageants (Porto Rico, Antilles), est limitée par leur inefficacité dans certains écosystèmes.

Ainsi, l'introduction de nouvelles espèces de gastéropodes ou le recours à toute autre méthode de lutte biologique n'ont été recommandés dans aucune autre région.

4.2.3 Aménagement de l'environnement

Localement certaines actions ont été menées afin de modifier le biotope naturel des mollusques (vase). Ainsi, la construction de canaux d'irrigation cimentés, l'assèchement de marécages et l'élimination de la végétation des plans d'eau ont entraîné une diminution du

nombre de mollusques. Ainsi, l'aménagement de l'environnement en Chine, au Japon et aux Phillipines a joué un rôle important dans la lutte contre *S. japonicum*.

4.3 Prophylaxie médicale

4.3.1 Chimiothérapie

L'objectif principal de la chimiothérapie, dans la lutte contre la schistosomiase est de prévenir ou de réduire la morbidité. Cependant, les bilharzioses n'ont jamais été très faciles à traiter car les premiers médicaments ont souvent été très toxiques et peu efficaces.

A l'heure actuelle, le traitement de la schistosomiase se réalise par l'utilisation du **praziquantel (PZQ)**, il est efficace, en une ou deux prises, sur toutes les espèces de schistosomes. C'est dire son intérêt en présence d'une infection mixte ou d'un cas réfractaire aux autres médicaments, tels que le métrifonate (Bilarcil ®), actif sur *S. haematobium*, et l'**oxamniquine**, active sur *S. mansoni*.

Le **PZQ** (Biltricide ®) est très actif sur une série de trématodes, dont la totalité des espèces de schistosomes pathogènes pour l'homme. Il est bien absorbé par voie orale; il subit un métabolisme de premier passage et 80% de la dose se retrouve dans les urines, sous forme de métabolites, dans un délai de 24 heures. Cependant, les schistosomes ne métabolisent pas le PZQ. En raison de son action anti-inflammatoire non spécifique, le PZQ entraîne une régression des lésions viscérales peu développées. Il provoque chez le parasite *in vitro* une contraction musculaire paralysante, une dépolarisation membranaire et un influx de calcium suivi par une rupture du tégument du ver adulte entraînant une mort rapide du parasite. Ainsi, immédiatement après exposition, il se contracte, se détache des vaisseaux sanguins où il est fixé et se désagrège progressivement. Il agit également, à un moindre degré, sur les schistosomules et les œufs en transit dans les tissus. Le PZQ est efficace tant en phase aiguë qu'en cas d'atteinte hépatosplénique importante, le nombre d'œufs dans les selles et les urines diminue de façon considérable, même si la guérison n'est pas obtenue.

Le PZQ semble modifier le profil des antigènes de surface du schistosome, exposant notamment certaines enzymes (la phosphatase alcaline pour *S. mansoni* et la glutathion S-

transférases de 26 kDa pour *S. japonicum*) qui deviennent alors plus accessibles au système immunitaire (Fallon & Doenhoff, 1994; McTigue *et al.*, 1995).

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

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

D'autre part, une étude récente visant à établir les différences génétiques existantes entre les souches de *S. mansoni* résistantes et susceptibles au PZQ a permis de mettre en évidence une expression nettement plus importante de l'ARNm codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome-c oxydase dans la souche résistante alors que l'activité y est plus faible par rapport à la souche sensible (Pereira *et al.*, 1998). Cette différence n'est pas encore expliquée, néanmoins, cette étude révèle l'existence de modifications moléculaires entre les deux souches qui permettront de mieux comprendre les mécanismes de résistance au PZQ.

L'oxamniquine (Vansil ®, Mansil ®) est la deuxième molécule utilisée dans le traitement de la bilharziose. Elle possède une activité schistosomicide sélective et variable sur *S. mansoni*. Bien absorbée par voie orale, elle subit une transformation importante en

métabolites acides inactifs, qui sont éliminés dans les urines. Bien tolérée, elle a été largement utilisée dans les programmes de lutte en Amérique du Sud, avec de bons résultats. Elle a une action paralysante sur le ver, provoquant ainsi son reflux dans la circulation portale intra-hépatique où les mâles sont détruits. Les femelles semblent survivre mais cessent alors de pondre. Cette molécule est utilisée pour le traitement de la schistosomiase à *S. mansoni*, tant en phase aiguë qu'en cas d'atteinte hépatosplénique. L'utilisation de ce schistosomicide a l'avantage d'être quatre fois moins onéreuse que le PZQ.

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

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

4.3.2 Stratégie vaccinale

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

- ✓ Les schistosomes ne se multiplient pas dans les tissus de leur hôte définitif. Une immunité partielle non stérilisante, acquise de façon naturelle ou suite à une vaccination, peut donc avoir un impact considérable sur la charge en vers et donc sur l'incidence de la pathologie et la transmission de la maladie.

- ✓ Les œufs sont les principaux responsables de la pathologie. Ainsi, une immunisation qui réduirait la fécondité des vers femelles ou qui diminuerait la réaction granulomateuse autour des œufs, accompagnée ou non par une réduction du nombre de vers adultes, entraînerait une diminution de la morbidité des populations touchées, limiterait les formes aiguës de la maladie et contrôlerait sa transmission.

Sur la base de ces concepts, plusieurs stratégies de vaccination ont été établies; on

note parmi elles, dans le cadre d'un **vaccin vivant**, l'injection de cercaires atténuées (par irradiation) (Minard *et al.*, 1978; Bickle *et al.*, 1979). Ainsi, l'injection de cercaires irradiées permet d'induire des taux de résistance élevés associés à la production d'IFN γ qui active la cytotoxicité des macrophages à l'égard des schistosomules (James *et al.*, 1986) et qui initie des réactions inflammatoires au niveau du poumon bloquant ainsi la migration des schistosomules (Smythies *et al.*, 1992). Ce mode de vaccination protège rongeurs et primates (Coulson, 1997) néanmoins, chez la souris, les mécanismes cellulaires effecteurs impliqués contre le parasite au stade poumon sont plus efficaces lors d'une co-administration de cercaires atténuées avec l'interleukine 12 (IL-12) en tant qu'adjuvant (Wynn *et al.*, 1996). Néanmoins un vaccin basé sur des schistosomes vivants atténués n'est en pratique pas réalisable chez l'homme, il peut cependant servir de modèle pour définir des vaccins recombinants.

D'autres stratégies vaccinales ont été basées soit sur **l'injection avec ou sans adjuvant de préparations d'antigènes bruts** obtenues à partir d'œufs (SEA, Soluble Egg Antigen) ou de vers adultes (SWAP, Soluble Worm Antigen Preparation), soit sur l'immunisation avec **des antigènes purifiés ou recombinants**. Parmi les antigènes recombinants, seuls 6 ont été retenus par l'OMS comme candidats vaccinaux contre l'infection par *S. mansoni* (Bergquist, 1995) (Tableau 1), cinq d'entre eux sont intracellulaires et un seul est membranaire. Une propriété obligatoire dans la sélection d'antigènes est qu'ils doivent être capables de générer chez la souris une immunité qui conduit à une réduction supérieure à 40% de la charge parasitaire après une infection expérimentale.

Tableau 1: Antigènes de *Schistosoma mansoni* à potentiel vaccinal retenus par l'OMS. Caractéristiques et pourcentages de protection observés (d'après Bergquist, 1995).

Antigène	Expression au cours du cycle	Fonction	Protection (%)		
			Souris	Rat	Autre
Paramyosine (Sm97) (97 kDa)	Adulte et schistosomule	protéine du muscle	39		
IrV-5 (62kDa)	Adulte, schistosomule et œuf	protéine du muscle	60-80	95	25 (babouin)
Sm23 (23kDa)	Adulte, schistosomule et œuf	protéine membranaire	45-80		
Sm14 (14kDa)	Adulte et schistosomule	FABP (Fatty acid binding protein), protéine liant les acides gras	65		90-100 (lapin)
TPI (28kDa)	Adulte, schistosomule et œuf	enzyme impliquée dans le métabolisme glucidique	40-50		
Glutathion S-Transférase (Sm28GST) (28kDa)	Adulte, schistosomule et œuf	enzyme de détoxification	30-40	40-60	40 (babouin)

- La paramyosine:

Il s'agit d'une protéine de 97kDa isolée à partir d'antigènes de vers adultes. L'immunisation de souris à l'aide de la paramyosine recombinante en présence de BCG comme adjuvant, induit une protection de l'ordre de 39% (Pearce *et al.*, 1988).

- La protéine IrV-5 (irradiation-associated vaccine antigen):

Cette protéine de 62kDa, dérivé d'une molécule de 200kDa homologue de la myosine, a été isolée à partir d'antigènes de surface de schistosomules à l'aide de sérums provenant de souris vaccinées par des cercaires irradiées. Un taux élevé de protection (60 à

80%) est obtenu chez la souris après trois injections intra-péritonéales ou sous-cutanées de la protéine recombinante ainsi que chez le rat (Amory-Soisson *et al.*, 1992, 1993), mais les résultats obtenus chez le babouin sont beaucoup plus variables.

- **La Sm23:**

La structure proposée de cet homologue d'une super-famille de protéines membranaires de 23kDa suggère la présence de 4 domaines transmembranaires et de 2 domaines extracellulaires hydrophiles (Reynolds *et al.*, 1992). La Sm23 est un antigène protecteur puisque des expériences d'immunisation à l'aide d'un peptide synthétique contenant les épitopes de cellules B et T confèrent 45 à 80% de protection en terme de réduction du nombre de vers chez la souris.

- **La Sm14 ou FABP-14 (Fatty Acid Binding Protein):**

Cet antigène membranaire (Moser *et al.*, 1991), présent au stade schistosomule, protège la souris à 65% et le lapin à 95%. La Sm14 de *S. mansoni* présente de fortes homologues avec la protéine Fh12 de *Fasciola hepatica*, parasite responsable d'atteintes hépatiques. Ainsi, l'immunisation de souris avec la protéine Fh12 protège contre l'infection par *S. mansoni* (Tandler *et al.*, 1995). De telles réactions croisées permettent d'envisager une vaccination contre plusieurs parasites co-endémiques.

- **La Triose Phosphate Isomérase (TPI):**

Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme du glucose. Elle a été identifiée à l'aide d'un anticorps monoclonal qui reconnaissait un antigène de 28 kDa à tous les stades du développement parasitaire (Harn, 1985). Cette protéine a été clonée et la TPI recombinante présente une activité enzymatique. Chez la souris, les taux de protection varient de 30 à 60% (Shoemaker *et al.*, 1992b).

- **La Sm28GST:**

Le candidat vaccinal le mieux caractérisé, et avec lequel les études d'immunisations et de protections ont été les plus poussées dans le laboratoire, est une glutathion S-transférase de 28 kDa de *S. mansoni* (Capron *et al.*, 1995a).

La Sm28GST recombinante induit une immunité protectrice chez les modèles rat et

hamster (Balloul *et al.*, 1987a; Grezel *et al.*, 1993), chez le babouin (Balloul *et al.*, 1987b; Boulanger *et al.*, 1991) et chez la souris (Boulanger *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1993). Les taux de protection conférés contre l'infection varient de 50-70% chez le rat, de 30-45% chez la souris et 38% chez le babouin. Ces expériences d'immunisation chez les babouins et les souris à l'aide de la Sm28GST recombinante ont mis en évidence un effet protecteur différent, qui n'avait jusque-là encore jamais été observé: il s'agit d'une réduction de la fécondité des vers femelles qui se traduit par une diminution des œufs excrétés chez les animaux immunisés, et une réduction de la charge tissulaire en œufs (Boulanger *et al.*, 1991). Il a été démontré à l'aide d'anticorps monoclonaux que cet effet était associé à l'activité enzymatique de la Sm28GST (Xu *et al.*, 1991). Or cette activité s'est révélée être portée en partie par les domaines N- et C-terminaux de la protéine (Trottein *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1993). Ainsi, l'utilisation du peptide C-terminal (peptide 190-211), conjugué à l'ovalbumine, induit la production d'anticorps capables d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST. Ainsi, on observe une réduction partielle du nombre de vers suite à une infection expérimentale, et surtout, se traduit par une réduction marquée de la charge en œufs dans les tissus et de leur viabilité. La pertinence de ces observations lors d'une infection humaine est confortée par la capacité des IgA sériques d'individus infectés à inhiber la fécondité des couples de vers adultes maintenus en culture (Grzych *et al.*, 1993). La réponse cellulaire T contre la Sm28GST joue un rôle important de par son implication dans la réduction du nombre d'œufs dans le foie et dans la diminution de la pathologie hépatique (mesurée par le taux de collagène contenu dans le foie des souris infectées). Dans ce modèle, les souris immunisées avec une seule dose de rSm28GST développent des réponses CD4⁺ Th1 et CD8⁺ spécifiques de l'antigène, et les effets protecteurs peuvent être complètement abolis par l'administration d'anticorps anti-IFN γ (Pancre *et al.*, 1994). Cette cytokine semble donc être impliquée dans l'immunité protectrice obtenue après immunisation avec la rSm28GST.

Le clonage moléculaire des 28 GSTs de différentes espèces de schistosomes a permis de confirmer l'effet anti-fécondité et anti-viabilité des œufs. Les protections peuvent être également observées dans des systèmes hétérologues (*S. haematobium* versus *S. mansoni*). Les travaux ont encouragés l'initiation en phase I de la vaccination par la 28GST (Bihlvax). Le projet s'est essentiellement tourné vers la Sh28GST pour plusieurs raisons. L'acquisition de la résistance est bien corrélée à une baisse de la production

d'œufs, la méthode de quantification des œufs, dans les urines, est plus aisée et enfin la schistosomiase urinaire donne l'unique opportunité de suivre par une méthode non invasive l'évolution des lésions inflammatoires associées à l'infection.

Une des caractéristiques principales de toutes ces molécules sélectionnées en tant que candidat vaccinal potentiel est leur fort pouvoir d'immunogénicité (capacité de la molécule à induire une réponse anticorps spécifique ou d'engendrer tout autre type de réponse immune). Or selon Sher (1988) citant les propos plus anciens de Waksman, ne vaut-il pas mieux considérer en tant que cible vaccinale des molécules parasites contre lesquelles il n'existerait qu'une faible réponse voire aucune, plutôt que de regarder les antigènes reconnus par des animaux ou des patients infectés? Une molécule faiblement immunogène l'est précisément parce que d'une part, son rôle pour la survie du parasite est crucial et parce que d'autre part tout laisse supposer qu'elle serait sensible à une réponse immune (Doenhoff, 1998).

5. Réponse immune développée au cours d'une infection

La réponse immune développée par l'hôte a fait l'objet de nombreux travaux, tant dans le but d'élaborer une stratégie vaccinale que pour mieux comprendre les effets d'une infection par *S. mansoni*. La réponse immune a été particulièrement étudiée chez le rat, hôte semi-permissif, et chez la souris, hôte permissif. Quant aux travaux chez l'homme, ils consistent en des analyses épidémiologiques menées sur des populations vivant en régions d'endémies.

5.1 Immunité Concomitante

A des degrés divers, la plupart des espèces animales développent une résistance à la réinfection vis à vis de *S. mansoni*. Cette immunité est d'un caractère particulier puisqu'elle est dirigée contre les formes larvaires d'une nouvelle infection, alors même qu'elle est inefficace contre les vers adultes déjà présents dans l'organisme. La notion d'immunité concomitante a été proposée par Smithers et Terry (1969) pour décrire une immunité à la réinfection qui apparaît en présence d'une infection active. Des travaux réalisés *in vivo* (Smithers & Terry, 1967) ont permis de montrer que peu de temps après pénétration, les jeunes schistosomes acquièrent à leur surface des antigènes de l'hôte, ce qui les protègent contre une réponse immune qu'ils ont eux-mêmes déclenchée.

5.2 Immunité chez le rat, hôte semi-permissif

Le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) est un concept qui a suivi et a complété l'immunité concomitante. Les jeunes schistosomules sont susceptibles à une lyse qui fait intervenir des isotypes d'anticorps et types cellulaires particuliers. Ces cellules pro-inflammatoires intervenant sont les macrophages (Capron *et*

al., 1975), les éosinophiles (Capron *et al.*, 1981) et les plaquettes (Joseph *et al.*, 1983), les anticorps anaphylactiques sont de type IgG2a et IgE (Grzych *et al.*, 1982; Verwaerde *et al.*, 1987). Les interactions schistosomules-cellules effectrices via les anticorps nécessitent l'expression de récepteurs Fc à la surface des cellules. Ce phénomène de cytotoxicité est à la base de l'immunité à la réinfection décrite chez le rat. En effet, le rat est un hôte semi-permissif pour *S. mansoni*; le parasite n'y effectue pas un cycle complet (cf. § 1.4.2). Les vers n'atteignant pas leur maturité, ils ne pondent pas et sont, de plus, expulsés à partir de la quatrième semaine. Le rat devient alors fortement résistant à la réinfection (Kigoni *et al.*, 1986; Capron *et al.*, 1984). Il a été montré que des facteurs immunologiques pouvaient rendre compte du rejet des vers (Capron *et al.*, 1986) ainsi que du mécanisme de la résistance à la réinfection (Philips *et al.*, 1983).

De récentes études menées dans le laboratoire ont permis d'appréhender la nature de la réponse mise en jeu dans l'immunité anti-schistosome du rat (Cêtre *et al.*, 1998). Ainsi, la présence d'ARNm de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-5) (selon les profils caractéristiques décrits par Mosmann & Coffman, 1989) a été détectée par RT-PCR lors d'une infection primaire par *S. mansoni* et plus précisément avant le rejet des vers. Puis, ces résultats ont été confirmés par l'analyse de l'expression des cytokines au niveau protéique ainsi que par la nature des isotypes (IgG2a et IgG1) d'immunoglobulines synthétisées. Enfin, les mêmes approches ont permis d'étudier les mécanismes mis en jeu lors d'une réinfection. Ces derniers ont révélé également la présence de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-5) et une persistance du même profil isotypique tout au long de la cinétique de réinfection (Cêtre *et al.*, soumis pour publication).

5.3 Etudes immuno-épidémiologiques

Lors d'études épidémiologiques plusieurs facteurs rentrent en compte : **la prévalence** de l'infection qui représente la proportion d'individus infectés à un moment donné, **l'incidence** de l'infection qui représente la fréquence d'apparition de nouvelles infections et **l'intensité** de l'infection qui mesure la charge parasitaire chez un sujet ou un groupe d'individus.

De nombreux paramètres ne sont également pas à négliger tels que la **fréquence** de contact de l'individu avec l'eau, le sexe et l'âge de l'individu. En effet, les femmes pour les tâches

ménagères seront plus fréquemment en contact avec l'eau que l'homme et de plus, l'enfant qui joue dans l'eau sera plus fréquemment en contact que l'adulte.

Chez l'homme, la diminution de la prévalence et de l'intensité de l'infection avec l'âge, particulièrement après la puberté, prouve l'existence de l'acquisition d'une immunité (Butterworth *et al.*, 1985).

La réponse humorale a été décrite dans de nombreuses études immuno-épidémiologiques. Ainsi, le rôle des anticorps IgE dans l'acquisition d'une immunité protectrice a été confirmée. D'autre part, l'existence d'anticorps capables de bloquer les fonctions effectrices d'anticorps "protecteurs" a été suggérée.

Ainsi, des études menées en Gambie par Hagan *et al.* (1991), ont montré une corrélation négative entre l'intensité de réinfection par *S. haematobium* et des taux élevés d'IgE spécifiques. De plus, des études épidémiologiques menées sur des populations kenyanes (Dunne *et al.*, 1992) et brésiliennes (Rihet *et al.*, 1991, 1992; Demeure *et al.*, 1993) infectées par *S. mansoni* ont montré que la résistance à la réinfection dépendait du rapport entre les IgE spécifiques des antigènes parasitaires, protecteurs et les IgG bloquants. Les premières études réalisées au Kenya avaient révélé la présence d'autres anticorps (d'isotype IgM) capables de bloquer la cytotoxicité dépendante des éosinophiles médiée par les IgG. De plus, une corrélation positive entre l'intensité de réinfection et le taux d'IgM et IgG2 spécifiques d'épitopes carbohydrates présents dans les antigènes d'œufs a été observée (Khalife *et al.*, 1986; Butterworth *et al.*, 1987; Dunne *et al.*, 1988). Ainsi, l'immunité humorale protectrice chez l'homme est régie par une balance d'activité entre anticorps effecteurs et bloquants.

De plus, chez l'homme, des phénomènes d'ADCC mettant en jeu des IgG et des éosinophiles contre les schistosomules ont également été décrits (Butterworth *et al.*, 1974, 1975; Khalife *et al.*, 1989). Ces mécanismes d'ADCC contribuent, au moins en partie à l'établissement d'une résistance à l'infection qui n'est cependant pas véritablement efficace avant la puberté. En effet, la prévalence et la charge parasitaire atteignent des valeurs maximales chez les enfants entre 10 et 15 ans pour diminuer chez l'adulte.

La réponse cellulaire T impliquée dans la résistance à une infection humaine à *S. mansoni* a également été étudiée, et il semble qu'elle soit plutôt de type Tho/2 (Couissinier & Dessein, 1995). Ceci confirme donc la nature de la réponse humorale observée, dans la mesure où une production IgE et une hyperéosinophilie sont directement

contrôlées respectivement par l'IL-4 (Finkelman *et al.*, 1986) et l'IL-5 (Coffman *et al.*, 1989).

5.4 Immunité protectrice de la souris

La souris est un hôte permissif à *S. mansoni*, le parasite y effectue un cycle complet tel qu'il a été décrit dans la figure 1. Ainsi, il constitue un des seuls modèles pour l'étude de la schistosomiase notamment grâce à sa manipulation aisée et propice aux protocoles d'infestation ou de protection. La formation de granulomes semblables à ceux développés chez l'homme en fait, de surcroît, un bon modèle d'étude.

Il semble que l'immunité protectrice chez la souris fasse essentiellement appel à des mécanismes cellulaires indépendants d'anticorps. En effet, l'étude de la réponse cellulaire T au cours d'une infection expérimentale a permis d'observer durant la phase précoce de l'infection une réponse Th1 qui laisse place à un profil de cytokines de type Th2 induit par les œufs. Cette relation entre le dépôt des œufs et la réponse Th2 est suggérée par l'apparition simultanée d'IL-4 et d'IL-5 (Pearce *et al.*, 1991). Ces observations ont été confirmées lors d'une infection expérimentale monosexuée à *S. mansoni*, dans laquelle la production de ces cytokines n'est pas observée du fait de l'absence de production œufs (Grzych *et al.*, 1991).

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

5.5 Stratégies de contrôle de la réponse immune développées par le parasite

“ Les dialogues permanents entre un hôte qui développe des mécanismes de défense et un parasite aux subtiles stratégies de survie font de la relation hôte-parasite un concept fascinant. Mimétisme moléculaire, leurres de la signalisation, appropriation et captures de signaux et langage intégré sont autant de stratégies essentielles du développement d'un véritable parasitisme moléculaire ” (Capron, 1995).

5.5.1 Mimétisme

L'existence d'un mimétisme moléculaire aussi largement répandu et aussi divers dans son expression soulève plusieurs questions importantes. L'une d'elles concerne les significations évolutives de ce mimétisme. Il est, à cet égard, difficile de différencier le mimétisme moléculaire dans le contexte de convergences évolutives, notamment dans le cas où les deux organismes sont proches sur le plan phylogénétique tels que le schistosome et le mollusque. Pour témoigner de la diversité des structures concernées par cette stratégie de déguisement moléculaire, nous ne citerons que ces exemples: l'expression par le parasite de l' α_2 -macroglobuline (Damian *et al.*, 1973), d'oligosaccharides très conservés comme le glycane de l'hémocyanine de lamproie (KLH) (Dissous *et al.*, 1986; Grzych *et al.*, 1987) ou le trisaccharide Lewis X (Vellupillai *et al.*, 1994).

Enfin, nous ne pourrions terminer l'évocation du "langage moléculaire" du parasite sans citer la caractérisation d'un gène apparenté à celui de la POMC (Pro-OpioMélanoCortine) (Duvaux-Miret *et al.*, 1992) et la démonstration de la libération active d'ACTH (adrénocorticotropine), d' α -MSH (hormones de stimulation des mélanocytes) et de la β -endorphine.

5.5.2 Appropriation de signaux

L'une des conséquences naturelles de la capacité d'acquisition par le parasite de molécules de l'hôte est l'appropriation dans de nombreux cas de signaux et messages de la communication cellulaire rendue possible par l'expression chez les parasites de structures réceptrices qui leur correspondent. Ainsi, l'influence du TNF α sur la fécondité des vers femelles de schistosomes (Amiri *et al.*, 1992) suggère leur capacité à parasiter le réseau de cytokines. De telles observations plaident en faveur de la coévolution des parasites et de la réponse immune de l'hôte et en particulier de la production de cytokines (Sher, 1992).

5.5.3 Echappement à la réponse immune

L'une de plus remarquables capacités du schistosome est celle d'interférer directement dans les différents réseaux de la réponse immunitaire, par la libération de molécules dotées de propriétés immuno-modulatrices. Nous citerons la démonstration de la libération par le parasite d'enzymes protéolytiques qui clivent les IgG, juste après leur liaison aux récepteurs membranaires, entraînant ainsi la libération de peptides (Auriault *et al.*, 1982), capables d'inhiber de nombreuses fonctions macrophagiques et d'altérer profondément leurs capacités cytotoxiques. De plus, le schistosome est également capable d'affecter l'efficacité de la lyse médiée par la voie du complément en exprimant des facteurs tels que le SCIP-1 (Schistosome complement inhibitor), ou des protéases (Marikovsky *et al.* 1988b). L'expression de serpins (SERine Protease Inhibitor) permet également au parasite de neutraliser certains composants de la réaction inflammatoire tels que l'élastase de neutrophile inactivée par la Smpi56 (Ghendler *et al.*, 1994). Cet aspect d'échappement à la réponse immune sera exposé ultérieurement.

Au cours de ce chapitre intitulé “ Schistosomiase ou Bilharziose ” nous avons abordé les caractéristiques de cette infection parasitaire, les différents moyens de lutte développés contre cette endémie ainsi que la réponse immune engendrée par l’hôte et les mécanismes d’échappement développés par le parasite lui-même.

Ade nombreuses reprises le rôle des protéases du schistosome a été suggéré. En effet, ces molécules jouent un rôle fondamental pour la survie du parasite en assurant notamment l’invasion de l’hôte, sa migration et ses besoins nutritionnels. Outre ces activités protéolytiques, les protéases du schistosome sont impliquées dans des phénomènes d’échappement à la réponse immune. Aussi, nous nous sommes particulièrement attachés à l’étude de ces molécules, dont de nombreuses ont été caractérisées au cours du cycle évolutif du parasite. Ainsi, ce second chapitre abordera le rôle, la fonction et la régulation des protéases impliquées dans de nombreux processus biologiques décrits chez les mammifères. Puis nous étudierons l’intérêt de telles enzymes dans le monde parasitaire et plus particulièrement chez *S. mansoni*.

Les Protéases

1. Les protéases; définition, rôles et fonctions

1.1 Nomenclature

On regroupe sous le terme “protéase” à la fois les **exoprotéases** et les **endoprotéases**. Les exoprotéases ou peptidases sont des enzymes capables de cliver un ou deux acide(s) aminé(s) en fin de chaîne polypeptidique, tandis que les endoprotéases ou protéinases clivent au sein d’une chaîne polypeptidique (Baret, 1997). Cette classification présente l’avantage d’être claire et utile, néanmoins elle n’exclut pas la possibilité de trouver une endoprotéase à activité exoprotéasique et de mettre en évidence une activité endoprotéasique pour une exoprotéase dans le cas de substrat de faible poids moléculaire.

1.1.1 Les exoprotéases

Les exoprotéases peuvent être aisément séparées en deux sous-familles, selon qu’elles catalysent l’hydrolyse de la chaîne polypeptidique en N- ou C-terminal. Parfois, ces enzymes sont nommées selon l’acide aminé qu’elles clivent (“leucine aminopeptidase”). Elles sont spécifiques d’un seul ou, parfois de deux acide(s) aminé(s), ainsi elles portent le nom de “dipeptidyl peptidases”.

Les peptidases jouent notamment un rôle dans la digestion de peptides préalablement coupés par des endoprotéases.

1.1.2 Les endoprotéases

Les endoprotéases (tableau 2) sont divisées en 4 sous-familles dénommées par les acides aminés constituant leur site catalytique. Ainsi, on définit les **métallo**, **thiol** ou **cystéine**, **carboxy** ou **aspartyl** et les **sérine** protéases.

Tableau 2: Les endoprotéases

<i>Enzyme</i>	<i>Site actif</i>	<i>Fonction</i>	<i>Exemple</i>
Métalloprotéase	Présence d'un cation (métallique) divalent, au niveau du site actif, impliqué dans la liaison au substrat	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Localisation fonctionnelle extracellulaire ✓ Dégradation de la matrice extracellulaire (collagène ou élastine), remodelage tissulaire 	Collagénases Elastase de macrophage
Thiol ou cystéine protéase	Présence d'une cystéine impliquée dans la liaison au substrat	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Catabolisme protéique dans les systèmes lysosomaux 	Papaine Cathepsines B Caspases (mort cellulaire apoptotique)
Aspartyl ou Carboxy protéase	Deux acides aspartiques dans le site actif	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Action intracellulaire (lysosomes) et extracellulaire 	Cathepsines D, E Protéase du VIH
Sérine protéase	Présence d'une sérine (S) dans la triade d'acides aminés constituée d'une histidine (H), d'un acide aspartique (D) et de (S)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Coagulation sanguine et fibrinolyse ✓ Enzymes digestives ✓ Composantes de la réponse immune, cytotoxicité 	Facteur de coagulation, activateur de plasminogène Trypsine et chymotrypsine. Sérine protéases granulaires (NK, cellules T cytotoxiques), élastase de neutrophile et cathepsine G

La famille des métalloprotéases est nommée ainsi en référence au cation divalent présent au niveau du site actif et dont la fonction est la liaison au substrat. Les thiol ou cystéine protéases possèdent une cystéine en chaîne latérale impliquée dans la liaison au substrat. La nomenclature des aspartyl ou carboxy peptidases provient des deux acides aspartiques présents dans le site actif. Enfin, les **sérine protéases** doivent leur nom à l'un des trois acides aminés (histidine (H), acide aspartique (D) et sérine (S)) constituant le site actif. La sérine présente en chaîne latérale est indispensable à la liaison au substrat. Néanmoins, le site catalytique de ces enzymes est constitué d'une triade d'acides aminés

dont le rapprochement tri-dimensionnel contribue à la formation d'une "poche" catalytique (Kraut, 1977).

Les sérine protéases sont très largement répandues et constituent la classe d'endoprotéase la plus importante et possèdent des fonctions très variées. Ainsi, les sérine protéases interviennent dans la coagulation sanguine, l'activation du complément et la digestion, elles sont également retrouvées dans les produits de sécrétion de cellules inflammatoires comme l'élastase de neutrophile et les protéases de lymphocyte T cytotoxique. Les sérine protéases sont parfois divisées en sous-familles regroupant des enzymes homologues d'un point de vue de leur séquence, la plus importante étant la super famille des trypsines.

Cette nomenclature décrite n'est pas restrictive, aussi parfois est-il plus simple de nommer une protéase en fonction du substrat qu'elle peut dégrader. Ainsi, on parle "d'élastase" de neutrophile et de macrophage, enzymes capables de dégrader notamment l'élastine, alors qu'elles appartiennent respectivement à la famille des sérine protéases et des métalloprotéases.

Les deux protéases qui seront mentionnées au cours de cette étude sont l'élastase et la kallikréine, aussi, nous nous proposons d'en présenter les principales caractéristiques.

✓ Les élastases

Les élastases doivent leur nom à leur capacité à dégrader l'élastine, composant du tissu connectif de nombreux tissus et organes. Elle est le constituant majeur de la paroi des vaisseaux sanguins et assure l'élasticité des poumons, du cartilage et de la peau. Sa dégradation apparaît dans des phénomènes liés à la croissance, le remodelage tissulaire et au cours de la grossesse. Cependant, le taux de dégradation et de fragmentation de l'élastine est accéléré dans des pathologies telles que l'emphysème pulmonaire, l'athérosclérose et l'arthrite.

Chez les mammifères, il existe également au niveau pancréatique deux élastases (de type I et II) qui participent activement à la digestion intestinale. Egalement composantes de la réponse immune cytotoxique, il existe l'élastase de neutrophile (Janoff & Scherer, 1968) et de macrophage (Banda & Werb, 1981). L'élastase de neutrophile est une sérine protéase basique localisée dans les granules (Starkey, 1977), tandis que l'élastase de macrophage est

une métalloprotéase. Cette dernière se distingue des autres élastases de mammifère par sa résistance à un inhibiteur (α 1-proteinase inhibitor) mais également par sa capacité à le dégrader et l'inactiver.

✓ Les kallikréines

Les kallikréines sont des enzymes, appartenant à la famille des sérine protéases, d'origines diverses; il existe la kallikréine plasmatique et les kallikréines tissulaires, autrefois dénommées glandulaires puisque synthétisées par différentes glandes exocrines et endocrines, parmi lesquelles les glandes salivaires et le pancréas. La fonction principale des kallikréines est le clivage du kininogène qui conduit à la libération de bradykinine, décapeptide vasodilatateur et bronchoconstricteur. Néanmoins, les kallikréines tissulaire et plasmatique diffèrent par de nombreuses propriétés et demeurent pour cela distinctes. La kallikréine plasmatique est impliquée dans l'activation des cascades de coagulation et du complément, tandis que les kallikréines tissulaires sont impliquées dans des phénomènes plus complexes tels que l'activation hormonale (maturation de prohormones) (Clements, 1989). Il existe une famille de gènes codant pour les kallikréines; trois gènes chez l'homme, 13 chez le rat et 25 chez la souris parmi lesquels on compte plusieurs pseudogènes (Evans *et al.*, 1987; McDonald *et al.*, 1988; Muray *et al.*, 1990).

1.2 Rôles et Fonctions

Les protéases sont des enzymes qui possèdent un large spectre d'activité biologique. Il est difficile de décrire chacun des processus dans lesquels elles sont impliquées tant leurs rôles sont multiples et fondamentaux. Ainsi, ce paragraphe ne se veut pas exhaustif mais plutôt illustratif de l'implication des protéases dans de nombreux processus physiologiques.

1.2.1 La coagulation sanguine et fibrinolyse

La **coagulation** représente la seconde étape de l'hémostase qui aboutit sous l'action de la thrombine à la transformation du fibrinogène en fibrine; ce réseau de fibrine, venant

Classiquement, on décrit la cascade de coagulation en **deux voies exogène et endogène** (figure 4). L'activation du facteur X par les deux voies aboutit à la formation du complexe activateur de la prothrombine puis à l'activation de la prothrombine en thrombine et enfin à la formation de la fibrine. La voie endogène est ainsi dénommée car tous les facteurs impliqués sont présents dans le plasma, tandis que la voie exogène est déclenchée par l'exposition du facteur tissulaire (FT) immédiatement disponible en cas de lésion vasculaire.

Les facteurs de coagulation se répartissent en trois groupes : les zymogènes, les cofacteurs et les simples substrats tels que le fibrinogène. A l'exception du facteur XIII, précurseur d'une transglutaminase, ces zymogènes sont des précurseurs de sérine protéases. Ainsi leur activité protéolytique permet le clivage du facteur suivant, assurant ainsi l'élimination d'un peptide d'activation et libérant une enzyme active dont le nom sera alors suivi de la lettre " a " (FX --- FXa). Parmi ces zymogènes, quatre d'entre eux, les facteurs II, VII, IX et X présentent d'importantes homologues structurales et fonctionnelles et sont vitamine K dépendantes. Les facteurs V et VIII sont dépourvus d'activité enzymatique mais jouent un rôle catalyseur de certaines réactions enzymatiques.

Les mécanismes de contrôle de la coagulation sont sous la dépendance de plusieurs mécanismes impliquant la participation active d'inhibiteurs assurant de façon synergique l'inhibition des différentes enzymes et des cofacteurs activés. On peut classer ces inhibiteurs en trois groupes: les inhibiteurs de sérine protéases ou " serpines " qui feront l'objet d'un paragraphe ultérieur, l'inhibiteur de la voie endogène (TFPI Tissue Factor Pathway Inhibitor) et le système de la protéine C qui sera également présenté ultérieurement.

Le caillot de fibrine enfin constitué, il est alors nécessaire d'installer un système de contrôle ultime de l'hémostase, la **fibrinolyse**, dont le rôle est d'éliminer *in vivo* les dépôts de fibrine. Ce phénomène présente de grandes analogies avec la coagulation dans la mesure où il fait également intervenir des enzymes de type sérine protéases et des inhibiteurs de type serpines. Le processus fibrinolytique fait intervenir une enzyme protéolytique, la plasmine, qui est formée par l'activation du plasminogène, et qui est donc responsable de la transformation de la fibrine en fragments solubles ou produits de dégradation de la fibrine

(PDF); la modulation du système étant sous la dépendance de différents activateurs et inhibiteurs.

Parmi les activateurs de plasminogène, il existe le tPA (“tissue Plasminogen Activator”) synthétisé par les cellules endothéliales de nombreux tissus. La molécule présente deux domaines de liaisons à la fibrine, un autre domaine est porteur du site catalytique, néanmoins, contrairement aux zymogènes de la coagulation, le site actif du tPA est directement accessible sur la molécule native. Le plasminogène circulant n’est cependant pas activé car à l’état basal le tPA libéré en faible quantité par la cellule endothéliale est immédiatement neutralisé par son inhibiteur spécifique. Un autre activateur de plasminogène est désigné par la pro-urokinase, présent dans le plasma à très faible concentration. Elle présente des analogies structurales avec le tPA mais elle est dépourvue de sites de fixation à la fibrine.

Parmi les inhibiteurs de la fibrinolyse, il existe deux groupes différents selon leur site d’action: les inhibiteurs de l’activation du plasminogène (PAI pour “Plasminogen Activator Inhibitor”) et les inhibiteurs de la plasmine (ou antiplasmine). Ces derniers appartiennent également au groupe des serpins et sont essentiellement représentés par l’ α 2-antiplasmine et plus accessoirement par d’autres inhibiteurs de spécificité plus large tels que l’ α 2-macroglobuline et l’ α 1-antitrypsine.

1.2.2 La cascade du complément

Le système du complément est l’un des mécanismes effecteurs majeurs des processus inflammatoires. Les conséquences physiologiques de l’activation du complément sont l’opsonisation, l’activation des leucocytes et la lyse des cellules cibles. L’opsonisation est assurée par la fixation covalente de certaines protéines du complément à la surface activatrice, permettant aux cellules phagocytaires, qui ont des récepteurs pour ces protéines, de fixer et d’internaliser les particules opsonisées. La liaison des protéines du complément aux récepteurs membranaires correspondants provoque en outre l’activation des leucocytes. Enfin, l’activation du complément libère, par clivage protéolytique, des petits fragments qui diffusent facilement et se lient à des récepteurs spécifiques sur les polynucléaires et les macrophages, provoquant la mobilisation de ces cellules (chimiotactisme) et leur activation.

La troisième conséquence physiologique de l'activation du complément est la lyse par l'insertion d'un " canal hydrophobe " dans la couche lipidique membranaire conduisant à la mort osmotique de la cellule cible.

La cascade du complément interagit avec chacune des autres cascades enzymatiques majeures, celle de la coagulation, du système des kinines et de la fibrinolyse. En effet, la plasmine, engendrée lors de la fibrinolyse, est capable de convertir le premier composant du système de la voie classique d'activation du complément. L'inhibiteur du C1 (cf. § 1.3.3) inhibe non seulement le C1r et le C1s, mais également le facteur XIIa de la coagulation, la kallikréine du système kallikréine-kinine et la plasmine.

On distingue deux voies d'activation du complément (figure 6); la **voie classique**, activée par des complexes immuns, et la **voie alterne**, activée par les microorganismes. Les deux voies génèrent une C3 convertase qui clive le C3 en C3b. Le constituant majeur du complément est, en effet, le C3 dont l'activation par hydrolyse spontanée ou par clivage protéolytique par une C3 convertase, est l'étape clé du processus d'activation du complément. Le C3b induit, il active à son tour la séquence terminale lytique de C5 à C9. Les produits d'activation des protéines du complément stimulent le chimiotactisme et l'activation des leucocytes. Les anaphylatoxines (C3a et C5a) vont stimuler le chimiotactisme des neutrophiles et la dégranulation des basophiles et des mastocytes.

La **voie classique** est initiée par la liaison du C1q (sous-unité du C1 qui est constituée d'une molécule de C1q, de deux molécules de C1r et deux molécules de C1s) aux domaines de la région Fc des immunoglobulines (IgG ou IgM). Un changement de conformation du C1q va alors induire l'activation du C1r qui assurera par clivage protéolytique l'activation du C1s. Ce dernier induit à son tour le clivage du C4 (C4a et C4b). Ces deux activités protéolytiques sont de type sérine protéases. Le C4b lié aux surfaces agit alors comme un site de fixation du C2 qui, combiné au C4b, devient un substrat pour C1s et est alors clivé en C2b et C2a. Le complexe C4b2a représente la C3 convertase de la voie classique évoquée précédemment.

Dans la **voie alterne**, le C3b préexistant se lie au facteur B (FB) qui est clivé et qui perd alors un petit fragment Ba. Le fragment Bb reste lié pour former le complexe C3bBb, qui constitue la C3 convertase de la voie alterne. S'installe alors une boucle de rétroaction positive.

Les C3 convertases des deux voies peuvent fixer davantage de C3b pour donner naissance aux complexes enzymatiques qui activent le composant suivant de la séquence, le C5. Ainsi, on aboutit à la formation d'une C5 convertase et enfin au complexe d'attaque membranaire. Le C5b se fixe à C6 et C7 pour produire la molécule C5b67, complexe hydrophobe qui possède un site de liaison aux membranes. Ainsi, ce complexe se fixe sur les membranes des cellules dans le voisinage immédiat du site de la réaction. Le C8 se lie alors au C5b et s'insère dans la membrane où il peut ensuite polymériser un certain nombre de molécules C9 pour produire le complexe d'attaque membranaire.

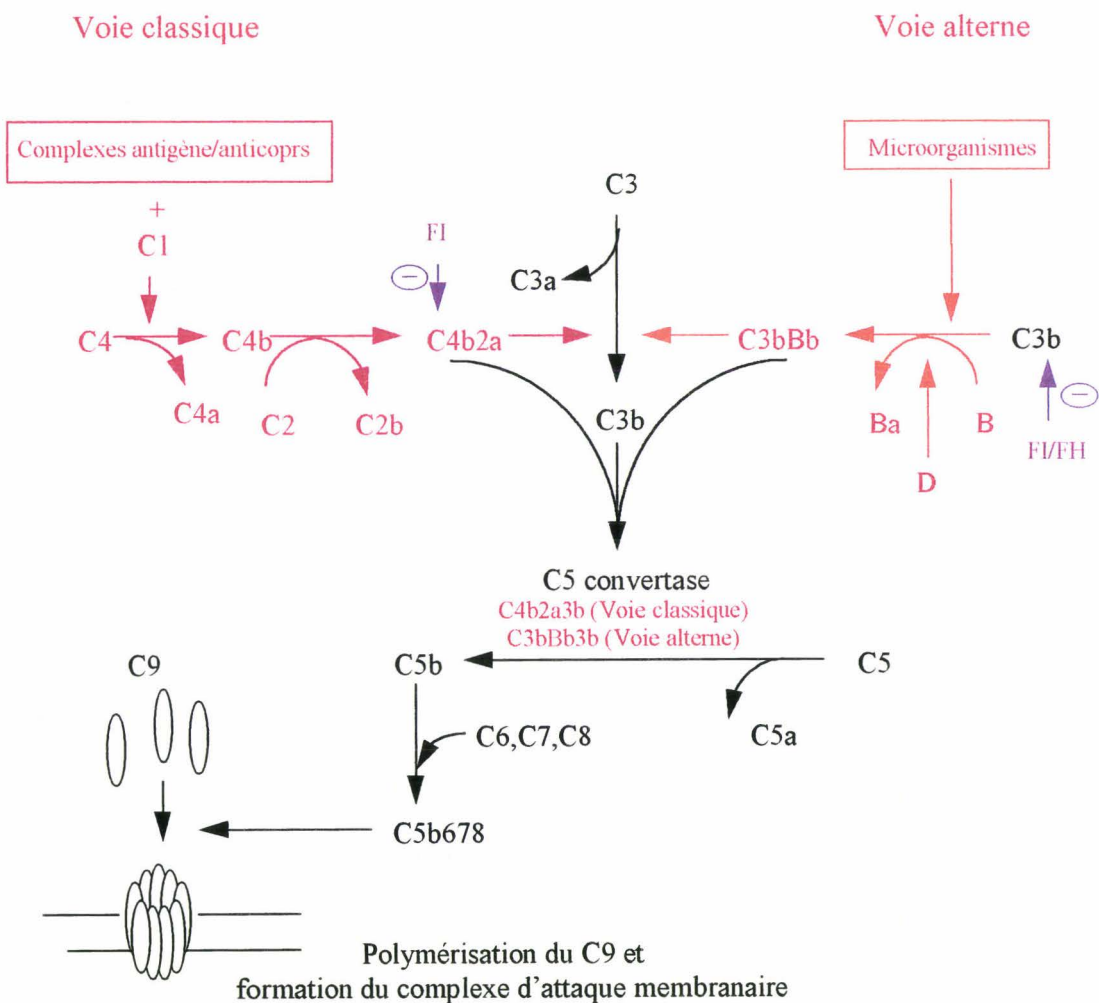


Figure 5: Cascades d'activation du complément.

La voie classique, déclenchée par la formation de complexes immuns, et la voie alterne, initiée par des microorganismes, génèrent une C3 convertase (C4b2a et C3bBb respectivement) qui clive le C3 en C3b. Celui-ci active à son tour la séquence terminale commune lytique de C5 à C9. Les composants C1r, C1s, C2, FB et FI présentent des caractéristiques structurales et/ou activité protéolytique de type sérine protéase.

La régulation de la voie classique passe par l'activation d'une part d'une serpine, l'inhibiteur du C1, qui se lie aux deux sérine protéases, le C1r et le C1s pour les inactiver, et d'autre part, par l'inhibition de la C3 convertase. Celle-ci est en effet rapidement inactivée par des protéines plasmatiques telles que le facteur I (FI), protéase également de type sérine protéase, et la protéine liant le C4, qui assurent la dissociation du complexe. La régulation de la voie alterne est, quant à elle, contrôlée par des protéines semblables ou identiques à celles qui inhibent l'activation de la voie classique. Le facteur H (FH), homologue de la protéine liant le C4, induit la dissociation de la C3 convertase et agit en tant que cofacteur pour le FI pour le catabolisme du C3b.

La classification des protéines du complément en super-familles est complexe, tant au niveau de la compréhension des relations fonctionnelles qui existent entre elles qu'au niveau structural. Néanmoins, le tableau 3 présente une classification simple des composants du complément en fonction de différentes analogies. A ceux-ci s'ajoutent les récepteurs spécifiques des fragments activés des protéines du complément, localisés sur les cellules effectrices. La liaison de ces fragments aux récepteurs permet l'activation de la cellule. Le CR1 ou CD35 ou "récepteur de l'adhérence immune" lie le C3b/C4b, le CR2 ou CD21 lie le C3bi et le CR3 ou CD11 est une molécule d'adhérence qui lie le C3bi.

Tableau 3: Regroupement des composants du complément en fonction des principales caractéristiques structurales.

<i>Composant du complément</i>	<i>Caractéristiques structurales</i>	<i>Molécules apparentées</i>
FI, C1r, C1s, FB, C2	Domaine catalytique de type sérine protéase	Trypsine et Chymotrypsine
C3, C4, C5	Groupement thioester interne (sauf pour C5)	α 2-macroglobuline
C6, C7, C8, C9	Molécules formant des pores	Polyperforine, protéines cationique des éosinophiles
CR3	Intégrines	LFA-1
C1inh	Inhibiteur de sérine protéase	α 1-antitrypsine, α 1-antichymotrypsine
FI, C1r, C1s, C6, C7, C8, C9	Séquences répétées du récepteur LDL	récepteur LDL
FH, CR1, CR2,	Homologies de séquence en acides aminés sur une " région consensus répétitive "	

Ainsi, l'activation et la régulation du complément font intervenir des activités protéolytiques de type sérine protéase et des activités inhibitrices assurées par des serpins (§ 1.3.3). Il était fondamental de présenter ce mécanisme de défense du système immunitaire, tant pour faciliter la compréhension des résultats obtenus dans ce travail, mais également pour illustrer les différents mécanismes dans lesquels sont impliqués les sérine protéases.

1.2.3 Réponse immune et réponse inflammatoire

Complétant l'illustration des protéases dans les mécanismes effecteurs des processus inflammatoires, de nombreux travaux ont suggéré que l'activité cytotoxique des protéases est indispensable aux mécanismes de cytotoxicité cellulaire (Altieri, 1995). La participation directe des protéases dans les processus de lyse a, en effet, été révélée lorsqu'une famille de sérine protéases stockée dans les granules sécrétoires des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules Natural Killer (NK) a été caractérisée (Masson & Tschopp, 1987; Bleackley *et al.*, 1988). Ces protéases sont exprimées de façon constitutive dans les cellules NK et de façon inductible dans les cellules T cytotoxiques où elles sont nommées **granzymes**. Les granules sécrétoires les stockant contiennent également des perforines. Le contenu de ces granules est libéré sur les cellules cibles et l'action simultanée de ces différents composants conduit à une lyse par lésions membranaires due à la formation de pores, et une fragmentation de l'ADN, qui provient d'une activation endogène des enzymes impliquées dans la mort cellulaire programmée (Altieri, 1995; Andrade *et al.*, 1998).

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

1.2.4 Les protéases et l'apoptose

L'apoptose est un processus morphologique et biochimique de mort cellulaire qui a lieu dans différents types de cellules au cours d'une grande variété d'événements physiologiques et pathologiques. De nombreuses études ont montré que des activités protéolytiques spécifiques appartenant à une famille de cystéine protéases médiaient cet événement (Salvesen & Dixit, 1997). Ces protéases sont nommées **caspases** et sont synthétisées sous forme d'un précurseur inactif et requiert un clivage protéolytique pour être activées. La caspase-3 est, par exemple, impliquée dans la fragmentation de l'ADN et dans

certains changements morphologiques de cellules en apoptose (Janicke *et al.*, 1998). Récemment, le rôle des sérine protéases et plus particulièrement de la granzyme B dans les phénomènes d'apoptose a également été suggéré (Andrade *et al.*, 1998).

1.2.5 Modelage tissulaire

L'implication des élastases dans le remodelage tissulaire a déjà été évoquée précédemment. A ces enzymes, il faut ajouter l'activité des métalloprotéases à zinc; en effet ces enzymes assurent plusieurs fonctions au niveau de la matrice extracellulaire, structure qui lie les cellules entre elles. En particulier, certaines d'entre elles peuvent détruire l'intégrité de la matrice en dégradant les macromolécules qui la constituent, comme le collagène ou l'élastine. Les métalloprotéases (MMP pour Matrix MétalloProtéinase) constituent une famille de protéases dont le rôle a été évoqué dans de nombreux processus tels que l'ovulation, le développement et la différenciation de l'embryon et dans le développement d'organes tels que les glandes salivaires et les ovaires (Birkedal-Hansen *et al.*, 1983).

1.2.6 La digestion intestinale

Chez les mammifères, le pancréas exocrine synthétise, stocke et sécrète environ 15 enzymes et proenzymes afin d'assurer la digestion intestinale. Parmi ces enzymes, on note la présence d'exoprotéases et d'endoprotéases telles que chymotrypsines A et B, des trypsines, d'élastases (de type 1 et 2) et la kallikréine.

1.3 Contrôle de l'expression et régulation de l'activité des protéases

1.3.1 Contrôle de leur expression

Certaines protéases sont régulées au niveau transcriptionnel par des cytokines pro- et anti-inflammatoires et /ou des facteurs de croissance, c'est le cas des métalloprotéases (Ries & Petides, 1995). Il existe, en effet, des éléments de réponse au niveau des régions promotrices capables de régir l'expression de l'enzyme.

Une autre forme de régulation de l'expression des protéases se situe au plan post-transcriptionnel. En effet, les protéases sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives (ou zymogènes), un clivage enzymatique, par d'autres protéases, est nécessaire pour libérer une enzyme active. Par ailleurs certaines enzymes, notamment retrouvées dans la cascade de coagulation, sont synthétisées sous forme d'une unique chaîne polypeptidique inactive, un clivage protéolytique est également nécessaire pour cliver cette chaîne et permettre la libération de deux chaînes; une lourde et une légère dont l'une porte l'activité enzymatique. Le site de clivage est conservé pour chaque protéase et dépend de l'enzyme qui procède au clivage.

1.3.2 Régulation de l'activité des protéases par d'autres protéases

La protéine C mentionnée précédemment est le zymogène d'une sérine protéase homologue aux sérine protéases vitamine K dépendante, intervenant dans la régulation de la coagulation. Son activation est assurée par la thrombine elle-même, qui assure ainsi sa propre auto-régulation. Cette activation nécessite la fixation au préalable de la thrombine avec la thrombomoduline. Une fois activée, la protéine C, en présence de son cofacteur, la protéine S, clive notamment le facteur VIIa, la cinétique de production de la thrombine devient alors très lente. Ainsi, la protéine C, à activité protéolytique de type sérine protéase, est capable de réguler l'activité protéolytique d'autres sérine protéases.

1.3.3 Régulation de l'activité des protéases par les inhibiteurs de protéases

La régulation de l'activité des endoprotéases est essentiellement assurée par des inhibiteurs (tableau 4) dont l'existence a déjà été mentionnée précédemment. Exceptée l' α 2-macroglobuline qui est capable d'inhiber les quatre sous-classes d'endoprotéases, les inhibiteurs sont spécifiques d'une classe donnée. Néanmoins, ils ne sont pas spécifiques d'une seule protéase et peuvent réguler l'activité d'autres enzymes appartenant à une même famille. L'interaction des *matrix metalloproteases* (MMPs) avec des inhibiteurs spécifiques ou TIMPs (pour Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) constitue un phénomène de régulation post-transcriptionnelle suggéré par Ries & Petrides (1995).

Les inhibiteurs de sérine protéases peuvent être regroupés en super-familles parmi lesquelles la super-famille des serpinines ("Serine Protease Inhibitor"). Les inhibiteurs de protéases représentent 10% des protéines plasmatiques totales et interviennent dans une grande variété d'événements fondamentaux (Travis & Salvesen, 1983).

Les inhibiteurs agissent en formant des complexes avec les protéases, en bloquant ou non le site actif. Ils agissent de façon compétitive en liant l'enzyme au domaine homologue à celui du substrat (domaine substrat-like). La réaction est stoechiométrique, c'est à dire que le complexe protéase/inhibiteur est équimolaire. Ce complexe se fixe sur des récepteurs spécifiques de l'inhibiteur (et plus précisément de la conformation que prend l'inhibiteur complexé à la protéase) présents à la surface de cellules phagocytaires. Il sera alors internalisé et détruit dans les lysosomes. De plus, il a été montré que la liaison du complexe α 1-antitrypsine/élastase de neutrophile à son récepteur active une voie de transduction du signal aboutissant à une augmentation de l'expression de l'inhibiteur et donc à une élimination plus rapide de la protéase (Perlmutter *et al.*, 1990).

Tableau 4 : Inhibiteurs de protéases plasmatiques.

La cible majeure, spécifique d'un inhibiteur, qui lui a valu son nom, est écrite en gras, néanmoins les inhibiteurs peuvent également inhiber d'autres enzymes, également citées.

<i>Inhibiteur</i>	<i>Enzyme Cible</i>	<i>Rôle</i>
inhibiteur de α 1-protéinase (α 1-PI)	Elastase de neutrophile et pancréatique, trypsine et chymotrypsine, plasmine, facteur Xa et XIa	Modelage de la matrice extracellulaire
antithrombine III	Thrombine , facteur IXa, Xa et XIa, plasmine, kallikréine plasmatique, trypsine et chymotrypsine	Contrôle de l'activité des sérine protéases de la coagulation sanguine
α 2-antiplasmine (α 2-AP)	Plasmine , trypsine et chymotrypsine, kallikréine plasmatique, thrombine, facteur Xa et XIa	Contrôle de la fibrinolyse
α 1-antichymotrypsine	Chymotrypsine-like protéase, chymase, cathepsine G (sérine protéase de neutrophile)	Modulation de la réponse inflammatoire
inhibiteur du C1 (C1-inhibitor: C1-Inh)	C1r et C1s activés, kallikréine plasmatique, facteurs XIa et XIIa, plasmine	Contrôle de l'initiation de la cascade du complément
α 2-macroglobuline	Protéases très variées et appartenant aux quatre sous-classes d'endoprotéases.	Contrôle de la coagulation, de la fibrinolyse
inhibiteur de α -cystéine protéinase (α -cysteine proteinase inhibitor)	Cystéine protéases: cathepsine H et L	

1.3.4 Conséquences d'une dérégulation de l'activité des protéases et/ou des inhibiteurs de protéases

Au vu des fonctions essentielles des protéases dans de nombreux processus physiologiques, on comprend aisément qu'un dysfonctionnement de leur activité, lié généralement à un déséquilibre de la balance protéase/inhibiteur, puisse avoir des conséquences catastrophiques.

Ainsi, une expression anormale de MMP ou de leur inhibiteur (TIMP pour "Tissue Inhibitor of Metalloprotease") engendre un large spectre de pathologies liées à la dégénérescence des tissus conjonctifs telles que les arthrites rhumatoïdes, les cancers invasifs et les scléroses (artériosclérose, emphysemes), mais aussi certains cas d'hypertension et de maladies respiratoires (asthme). En effet, la destruction du collagène et de l'élastine peut avoir des conséquences catastrophiques, car ces macromolécules assurent la charpente des tissus. Indirectement, la désagrégation de la matrice peut aussi favoriser la migration cellulaire au cours de processus très variés, qu'ils soient négatifs pour l'organisme (migration des cellules cancéreuses de leur site d'origine vers un organe: métastase) ou positifs (migration des leucocytes des vaisseaux jusque dans les tissus, en réponse à une infection ou à une lésion).

Une absence de protéase due à une anomalie génétique ou une protéase défectueuse peut également constituer des cas pathologiques très graves. Ainsi, l'hémophilie est une maladie hémorragique constitutionnelle de transmission récessive liée au sexe. Elle se caractérise par un déficit en facteur VIII pour l'hémophilie A (80%) et en facteur IX, qui est une sérine protéase, pour l'hémophilie B (20%). Le facteur VIII est en fait un complexe macromoléculaire qui joue le rôle de cofacteur (cf. fig. 4) et qui est constitué du facteur VIII lui-même et du facteur von Willebrand. Le facteur IX, qui présente une réelle activité protéolytique, est une glycoprotéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique sous sa forme native et de deux chaînes dans sa forme activée. Il joue un rôle d'enzyme activatrice du facteur X. Le gène codant pour le facteur IX est localisé sur le chromosome X (Xq 26-27).

2. Les protéases chez les micro-organismes

Impliquées dans un large spectre d'activités biologiques chez les mammifères, les protéases sont également bien représentées chez les micro-organismes; des bactéries aux helminthes, en passant par les virus et les protozoaires, elles effectuent de multiples tâches fondamentales.

La famille de protéases la plus décrite chez les protozoaires est de loin celle des cystéine protéases, la majorité ayant des homologues avec les cathepsines L de mammifères. Les métalloprotéases et les aspartyl protéases sont peu décrites. Néanmoins, on trouve chez les Trypanosomides des métalloprotéases de surface, mais aucune aspartyl protéase n'a été décrite. De telles enzymes ont cependant été identifiées chez *Plasmodium falciparum*. Chez ce dernier, deux aspartyl protéases sont au même titre que les cystéine protéases et les sérine protéases de bons candidats en tant que cible d'une chimiothérapie.

Chez les helminthes, les principales classes de protéases sont retrouvées mais peu d'enzymes sont complètement caractérisées. Une famille non usuelle de cystéine protéase connue sous le nom d'asparaginyl endopeptidase a été découverte chez le schistosome.

Ainsi au cours de ce chapitre, nous parcourrons le monde des micro-organismes en évoquant les différentes protéases décrites et leur éventuelle utilisation en tant que cible chimiothérapeutique.

2.1 Les protéases chez les bactéries

Les microorganismes expriment de nombreuses protéases afin de subvenir à leurs besoins; elles sont à la base de la pathogénicité car elles favorisent l'invasion et la migration du pathogène et sont parfois considérées comme facteur de virulence.

La virulence protéase-dépendante des bactéries repose sur l'activité propre de ces molécules. En effet, les protéases sont, par exemple, capables d'interagir avec les processus physiologiques de l'hôte, tels que les cascades kallikréine-kinine, du complément, de la coagulation et la fibrinolyse, en les activant. Les protéases bactériennes possèdent, en effet,

les mêmes spécificités de clivage que celles des mammifères et sont généralement plus actives que celle-ci. Cependant, elle ne sont pas affectées par les inhibiteurs de l'hôte, et on assiste alors à une protéolyse incontrôlée. Chez *Serratia marcescens*, il a été décrit néanmoins, qu'une protéase était capable d'interagir avec l' α_2 -macroglobuline formant ainsi un complexe stable internalisé via le récepteur de l'inhibiteur présent sur les fibroblastes et macrophages. Une fois dans la cellule, l'activité protéolytique graduellement régénérée engendre la destruction massive des protéines intracellulaires jusqu'à la mort de la cellule (Maeda *et al.*, 1987).

2.2 Les protéases dans le monde viral

Chez les virus et plus particulièrement chez le VIH (Virus de l'Immunodéficience humaine), les protéases sont particulièrement étudiées. Il existe dans le VIH une protéase dont l'homodimère possède une activité aspartyl protéase, typique des protéases retrovirales, tandis que le monomère est inactif. Les cibles de cette enzyme sont les polyprotéines *gag* et *gag/pol*, leur clivage protéolytique étant nécessaire à la formation des virions afin de les rendre matures (Kohl *et al.*, 1998). Le clivage de *gag* permet la libération de trois protéines nécessaires à la structure du virion et à l'emballage de l'ARN. Bien que les mammifères possèdent également des aspartyl protéases, elles n'ont pas d'activité sur le clivage de *gag*. En effet, trois des sites de clivage de la protéase du VIH ne sont pas connus chez les mammifères. Ainsi, une stratégie utilisant des inhibiteurs de protéase a été développée pour la lutte contre le VIH. Les quatre inhibiteurs de protéases, étudiés à l'heure actuelle, sont basés sur la séquence en acides aminés clivée par la protéase du VIH (Flexner *et al.*, 1998). Ils permettent de bloquer la maturation et le pouvoir infectieux des virions naissants. L'action antivirale principale des inhibiteurs de protéases est donc de prévenir la multiplication de l'infection, mais n'a aucun effet sur les cellules ayant intégré l'ADN proviral. Certes la monothérapie utilisant un inhibiteur de protéase réduit rapidement et profondément la charge virale, mais elle n'est cependant pas recommandée car des résistances peuvent apparaître. Leur utilisation engendre, de plus, des effets secondaires importants au niveau gastro-intestinal. Aussi, l'on combine à l'heure actuelle l'inhibiteur de protéase avec deux analogues de nucléosides; ceci provoque une baisse significative de la réplication virale, réduit la morbidité et prolonge la vie des patients infectés par le VIH.

2.3 Les protéases des Trypanosomides

Parasites protozoaires flagellés, on trouve chez les trypanosomides les genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. Les Leishmanies sont responsables de leishmanioses cutanée, muqueuse ou viscérale et les trypanosomes sont responsables de trypanosomiase africaine ou maladie du sommeil (*T. brucei*) et de trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas (*T. Cruzi*). Le cycle évolutif passe par un hôte vertébré (Homme) et un insecte piqueur. Les glossines, réduves et phlébotomes femelles se contaminent en piquant un hôte parasité respectivement par *T. brucei*, *T. cruzi* et *Leishmania*. La multiplication du parasite est assurée dans l'intestin de ces insectes, l'hôte vertébré est ensuite recontaminé lors d'une nouvelle piqûre.

2.3.1 Les cystéine protéases des Trypanosomides : facteurs de virulence ?

La majorité des protéases détectées chez *T. cruzi* et *T. brucei* et dans de nombreuses espèces de Leishmanies sont des cystéine protéases (North *et al.*, 1990a; McKerrow *et al.*, 1993). En effet, l'activité la plus détectée chez ces parasites est homologue à celle des Cathepsin L-like et les protéases sont alors désignées par cystéine protéase de type 1 (Coombs & Mottram, 1997).

Chez les Leishmanies, des cathepsines L-like (Type 2) (Mottram *et al.*, 1992; Traub-Cseko *et al.*, 1983) et cathepsines B-like (Type 3) (Bart *et al.*, 1995; Sakanari 1997) ont été décrites. La cystéine protéase de type 1 de *Leishmania* est principalement lysosomale (Pupkis *et al.*, 1986; Duboise *et al.*, 1994), néanmoins elle a également été détectée au niveau de la membrane plasmique et dans les poches du flagelle de *L. pifanoi* (Duboise *et al.*, 1994). La cystéine protéase de type 1 de *L. mexicana* est, quant à elle, polymorphique et régulée au cours du développement et présente un taux d'activité maximal au stade amastigote, stade présent dans les cellules hystiomonocytaires de l'hôte vertébré (Robertson & Coombs, 1990, 1994). Ces observations, en plus du fait que *Leishmania* ne peut infecter des macrophages et se développer en présence d'inhibiteurs de cystéine protéase (Coombs & Baxter, 1984), suggèrent que ces enzymes sont nécessaires à un parasitisme

intracellulaire.

La cystéine protéase de type 1 de *T. cruzi*, plus connue sous le nom de cruzipain ou cruzain (ou gp 57/51), est présente à chaque stade du cycle évolutif (Cazzulo *et al.*, 1989). De récentes études ont caractérisé chez celle-ci une activité kininogénase qui permet la libération de bradykinine, peptide proinflammatoire (Del Nery *et al.*, 1997). La cruzipain est également lysosomale mais peut se retrouver en surface à certains stades du développement du parasite (Bontempi *et al.*, 1989; Souto-Padron *et al.*, 1990; Mc Grath *et al.*, 1995; Tomas *et al.*, 1997). Les études sur les cystéine protéases sont nombreuses, mais il reste à savoir si ce sont de bons candidats pour une cible thérapeutique. En effet, plus de 100 gènes codent pour la cruzipain (Campetella *et al.*, 1992) et considérant l'hétérogénéité des séquences, il existe alors de nombreuses activités différentes. Peut-être est-il préférable de cibler une protéase moins abondante et plus spécifique ?

Les thérapies de lutte contre la maladie de Chagas ne sont, certes, pas satisfaisantes car elles présentent une toxicité significative. Néanmoins, une des nouvelles approches est basée sur le développement d'inhibiteurs de la cruzain. Ainsi, différents inhibiteurs de cystéine protéases ont été utilisés, ils montrent une inhibition de l'activité de la cruzain et préviennent ainsi la croissance et la différenciation de *T. cruzi* en culture (Harth *et al.*, 1993). Aujourd'hui, une nouvelle génération d'inhibiteur a été synthétisée, les modifications chimiques assurent une spécificité et une stabilité *in vivo* ainsi qu'une toxicité nettement diminuée. Cet inhibiteur induit une altération majeure des ultrastructures qui conduisent à la mort du stade intracellulaire amastigote identique à celle observée pour le stade extracellulaire épimastigote après exposition au même inhibiteur (Engel *et al.*, 1998). Le traitement de souris infectées avec un inhibiteur permet de sauver 5 souris sur 6 contre une infection létale (Engel *et al.*, 1998). L'étude de l'effet de cet inhibiteur au stade intracellulaire amastigote suggère que le cycle est interrompu à cause d'une inactivation du processus auto-catalytique de la cruzain au niveau de l'appareil de Golgi.

2.3.2 Les métalloprotéases de surface des *Trypanosomides*

La protéine de surface majeure du stade promastigote de *Leishmania* est une métalloprotéase à zinc (Russel, 1994; Bouvier *et al.*, 1995) ou encore appelée gp 63

(glycoprotéine de 63kDa). Le mécanisme d'action et la spécificité de substrat sont similaires à ceux décrits pour la famille des *Matrix MetalloProteinases* ou MMP, protéases inhibées par des agents chélateurs et par l' α 2-macroglobuline (Bouvier, 1995). La gp 63, active dans une large gamme de pH, dégrade des composants de la matrice extracellulaire tels que le fibrinogène. Elle est exprimée très fortement en surface du promastigote, au contraire, au stade amastigote, elle est exprimée faiblement et n'agit qu'à pH très acide. L'homologie avec des MMP de mammifères suggère son implication dans l'invasion et les métastases chez l'hôte (McMaster, 1994). La gp 63 est un des antigènes majeurs reconnus par l'hôte mammifère, elle est capable d'induire une immunité protectrice contre une infection par *Leishmania* (Abdelhack *et al.*, 1995) et peut également jouer un rôle en partie dans la modulation de la réponse immune. Elle est capable de dégrader différentes molécules et d'assurer la maturation du C3 du complément (Russel, 1987).

Actuellement, les études s'orientent vers le concept de cible chimiothérapeutique et le développement d'inhibiteurs spécifiques de la gp63 ou de MMP (Beckett *et al.*, 1996).

2.4 Les protéases de *Plasmodium*

Plasmodium falciparum est l'agent responsable du paludisme. Le cycle biologique est complexe et comprend une reproduction sexuée chez un hôte principal vertébré et une reproduction asexuée chez un hôte secondaire vertébré. Ce sont les formes érythrocytaires du parasite qui sont à l'origine des symptômes cliniques du paludisme et qui représentent la cible choisie par de nombreux laboratoires pour un vaccin anti-palustre. Une étape clé du cycle intra-érythrocytaire de *Plasmodium* correspond à l'invasion des globules rouges par une forme libre du parasite, le mérozoïte.

Il a été décrit qu'une sérine protéase pouvait permettre la pénétration de ces formes dans les érythrocytes de l'hôte (Braun-Breton *et al.*, 1992; Braun-Breton & Pereira da Silva, 1993). Ce serait une enzyme ancrée par un glycosylphosphatidylinositol ou GPI, qui n'est active qu'après solubilisation par une phospholipase C parasitaire. Elle permet ainsi la formation de la vacuole parasitophore (Roggwiller *et al.*, 1996). Le libération des mérozoïtes des érythrocytes serait assuré par une sérine protéase de type urokinase. Il apparaît qu'elle se fixe à la surface des érythrocytes infectés et joue un rôle d'activateur de

plasminogène, la plasmine ainsi générée médie la rupture de la cellule. (Roggwiller *et al.*, 1997). Les activateurs de plasminogène semblent très importants dans le processus d'invasion de différents pathogènes voire même de parasites (Lottenberg *et al.*, 1994). De plus, le processus d'invasion d'autres parasites tel que l'entrée dans les érythrocytes de *Plasmodium* est inhibée par des inhibiteurs de cystéine protéase ce qui suggère le rôle de telles enzymes dans l'invasion de la cellule hôte (Coombs *et al.*, 1997).

D'autre part, le parasite présente deux aspartyl protéinases (plasmepsines) qui joueraient un rôle dans la digestion de l'hémoglobine. L'inhibition d'une plasmepsine engendre la mort du parasite en culture suggérant ainsi un rôle essentiel de cette enzyme (Francis *et al.*, 1994). A l'instar de l'aspartyl protéase du VIH, l'enzyme de *Plasmodium* est disponible sous forme recombinante (Dame *et al.*, 1994). Il semblerait alors possible d'utiliser la même approche de modélisation pour développer des inhibiteurs spécifiques.

2.5 Les protéases chez les Helminthes

Les protéases sécrétées par les formes infestantes du schistosome sont des sérine protéases et seront plus amplement présentées dans le chapitre suivant. Le rôle de l'une d'entre-elles, l'élastase de *Schistosoma mansoni*, dans le processus d'invasion a clairement été démontré (Newport *et al.*, 1988).

Les cystéine protéases sont essentiellement décrites chez les vers de filaires, de schistosomes et chez *Fasciola*. Des enzymes de *Brugia* et *Onchocerca* ont été clonées et produites pour cribler des inhibiteurs, certains d'entre eux ont montré une activité anti-protéase *in vitro* (Wasilewski *et al.*, 1996). Chez le schistosome, un inhibiteur a montré *in vitro* une inhibition de la dégradation de l'hémoglobine et une baisse du nombre de vers et de la production des œufs *in vivo* (Wasilewski *et al.*, 1996). Chez *Fasciola hepatica*, la production d'œuf est réduite par un anticorps dirigé contre une cystéine protéase (Smith *et al.*, 1994a) suggérant ainsi qu'un inhibiteur peut avoir un effet identique.

Les schistosomes contiennent d'autres cystéine protéases dont la séquence primaire et les propriétés biochimiques ressemblent aux cathepsines B de mammifère (Dresden & Deelder 1979), aux cathepsines L (Smith *et al.*, 1994b), aux cathepsines D (Becker *et al.*, 1995) et

aux cathepsines C (Butler *et al.*, 1995).

D'autre part, il existe chez les schistosomes une asparaginyl endopeptidase (cf. § 3.2) (Davis *et al.*, 1987), appartenant à la famille des cystéine protéases. Cette enzyme se distingue cependant de la super-famille des papaines (Barett & Rawlings, 1996). Elle a été initialement identifiée par homologie de séquence avec une asparaginyl endopeptidase décrite chez une graine de légumineuse; *Canavalia ensiformis* (Takeda *et al.*, 1994). Chez *S. mansoni*, l'activité a été bien détectée dans des extraits de vers adultes (Dalton, 1995b).

2.6 Les protéases: candidats pour une cible chimiothérapeutique ?

Les protéases sont considérées comme cibles potentielles d'une chimiothérapie dans de nombreuses pathologies incluant aussi bien les cancers, les maladies auto-immunes que les maladies infectieuses virales ou bactériennes. Le but principal est d'obtenir de bons inhibiteurs de l'activité enzymatique dans l'espoir que cette inhibition puisse être utilisée sur le plan thérapeutique. Depuis quelques années, l'approche consiste à modéliser d'un point de vue structural l'inhibiteur alors que quelques années auparavant l'on combinait synthèse chimique et criblage biologique de façon répétitive. Ainsi, l'inhibiteur d'une protéase du VIH est avec succès utilisé aujourd'hui en tri-thérapie dans le traitement contre le SIDA.

Il est nécessaire de valider une cible chimiothérapeutique avant d'obtenir de bons inhibiteurs. La validation se réalise selon trois points: (1) des manipulations génétiques doivent démontrer le caractère essentiel de la cible pour le parasite, (2) démontrer qu'une lignée parasitaire résistante aux inhibiteurs résulte d'une modification de l'enzyme cible, (3) démontrer la corrélation directe entre l'inhibition de la cible et l'inhibition du développement du parasite. La plus convaincante des approches est de réaliser des gènes *knock-out* codant pour la cible potentielle et de montrer que cela modifie le pouvoir infectieux du parasite. Ces méthodes ont débuté chez les parasites, mais malheureusement il n'est possible de déléter spécifiquement des gènes par recombinaison homologe que chez très peu d'espèces (les trypanosomides, *Toxoplasma* et plus récemment *Plasmodium*). La difficulté de cultiver les helminthes *in vitro*, le long temps de génération, ainsi que la difficulté à sélectionner les mutants porteurs de recombinaison homologe sont autant de problèmes empêchant la mise

au point de cette approche. Néanmoins, le plus fascinant des résultats a été obtenu chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, chez qui un système d'insertion par le biais du transposon Tc1 a permis l'isolement aisé de mutants présentant le gène délété (Zwaal *et al.*, 1993).

3. Les protéases de *Schistosoma mansoni*

Chez *Schistosoma mansoni*, de nombreuses protéases ont été décrites (tableau 5) mais peu sont complètement caractérisées. Aussi, nous présenterons au cours de ce chapitre les différentes protéases décrites au cours du cycle évolutif du parasite en mentionnant leurs activités et leurs intérêts tant pour le parasite que pour son hôte.

3.1 Stades larvaires : Invasion et migration

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

Des premiers travaux ont montré qu'une activité protéolytique sécrétée par les glandes acétabulaires de la cercaire était impliquée dans la pénétration de la peau de l'hôte (Stirewalt, 1974). En 1982, Landsperger *et al.* (1982) ont purifié une sérine protéase d'environ 25 kDa à partir d'extraits de cercaires, puis l'élastase de 30 kDa a été purifiée à partir des sécrétions de cercaires, et caractérisée (Mc Kerrow *et al.*, 1985). Elle possède une large spécificité de substrat incluant la kératine (Tzeng *et al.*, 1983), la fibronectine, la laminine, le collagène de type IV, l'élastine et des protéoglycanes (McKerrow *et al.*, 1985). L'ADNc codant pour cette élastase a été cloné et séquencé, et la comparaison avec la taille de l'ARNm a permis de déduire que cette enzyme est synthétisée sous forme d'une pré-proenzyme (Newport *et al.*, 1988b). La séquence d'acides aminés déduite indique que cette protéase appartient à la famille des sérine protéases, et à la sous famille des chymotrypsines.

De plus, elle présente de fortes homologues avec les élastases pancréatiques I et II de rat. Des études complémentaires ont permis d'appréhender les mécanismes de régulation mis en jeu lors de l'expression de l'élastase au cours du cycle évolutif de *S. mansoni* (Pierrot *et al.*, 1995; 1996).

L'importance de cette élastase dans la pénétration des cercaires a été démontrée par les travaux de Cohen *et al.* (1991) et de Ring *et al.* (1993), qui montrent qu'un inhibiteur synthétique spécifique du site actif de l'élastase (modélisé en trois dimensions par ordinateur) pouvait bloquer la pénétration des cercaires dans la peau de souris, sans affecter leur mobilité.

D'autres protéases ont été caractérisées aux stades larvaires et semblent impliquées dans leur migration au sein de l'hôte. C'est le cas de deux sérine protéases de 28 et 60 kDa caractérisées par Marikovsky *et al.* (1988a). Ces deux protéases ont également une large spécificité de substrat: caséine, gélatine, fibronectine. Elles participent à la perte du glycocalyx et facilitent la migration des schistosomules. La protéase de 28 kDa a été localisée chez la cercaire dans les glandes pré- et post-acétabulaires, et par technique d'immunofluorescence, elle a été détectée dans le glycocalyx; après transformation en schistosomule, la protéase est alors détectée sur la membrane du schistosomule (Marikovsky *et al.*, 1990). Récemment, Ghendler *et al.* (1996) ont montré que cette protéase existe sous deux formes: une forme soluble (s28) et une forme membranaire (m28), liée par l'intermédiaire d'un ancrage lipidique via le glycosyl phosphatidyl inositol. Cette enzyme de 28kDa est impliquée dans la résistance à la lyse par le complément (cf. § 3.6).

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

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

Tableau 5: Protéases décrites chez *Schistosoma mansoni*.

<i>Nom ou masse moléculaire</i>	<i>Famille de protéases</i>	<i>Stade</i>	<i>Fonction supposée</i>	<i>Référence</i>
leucine amino peptidase (nd)	exopeptidase	œuf	✓ libération du miracidium	Xu & Dresden, 1986
I (25kDa)	cystéine	œuf		
II (30kDa)	cystéine	œuf	✓ cathepsine L-like sortie du système vasculaire	Sung & Dresden, 1986
III (nd)	cystéine	œuf		
(19kDa)	cystéine	miracidium	✓ infection et maintien dans le mollusque	Yoshino <i>et al.</i> , 1993
(36kDa)	cystéine	miracidium		
(25kDa)	sérine	cercaire	✓ chymotrypsine-like; invasion	Landsperger <i>et al.</i> , 1982
élastase (30kDa)	sérine	cercaire	✓ pénétration dans les tissus de l'hôte définitif	McKerrow <i>et al.</i> , 1983; 1985; Newport <i>et al.</i> , 1988b
(47kDa)	sérine	cercaire	✓ invasion	Chavez-Olortegui <i>et al.</i> , 1992
m28 et s28 (28kDa)	sérine	schistosomule	✓ perte du glycocalyx, migration-entrée dans le système vasculaire	Marikovsky <i>et al.</i> , 1988a
(60kDa)	sérine	schistosomule	✓ perte du glycocalyx, migration-entrée dans le système vasculaire	Ghendler <i>et al.</i> , 1996 Marikovsky <i>et al.</i> , 1988a
métalloprotéase (nd)	métallo	schistosomule	✓ nutrition	Keene <i>et al.</i> , 1983
"hémoglobine" = Sm32 (32kDa) (★) = asparaginyl endopeptidase	cystéine	adulte	✓ rôle dans les modifications post-traductionnelles	Davis <i>et al.</i> , 1987
Sm31 =cathepsine B (31kDa)	cystéine	adulte	✓ dégradation de l'hémoglobine, migration dans le sang	Dalton <i>et al.</i> , 1995a Klinkert <i>et al.</i> , 1989 Götz & Klinkert, 1993
Cathepsine L1 (35kDa)	cystéine	adulte	✓ dégradation de l'hémoglobine	Smith <i>et al.</i> , 1994
Cathepsine L2 (35kDa)	cystéine	adulte	✓ migration des œufs dans le ver femelle	Michel <i>et al.</i> , 1995
Carthepsine C (nd)	cystéine	adulte	(nd)	Butler <i>et al.</i> , 1995
Calpaine (75kDa)	cystéine	adulte	✓ métabolisme, renouvellement de la membrane	Andresen <i>et al.</i> , 1991 Karcz <i>et al.</i> , 1991

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

3.2 Protéases du ver adulte: Métabolisme et survie

Plusieurs protéases de la famille des cystéine protéases ont été identifiées chez les vers adultes comme participant à la nutrition des schistosomes. En effet, lorsque les schistosomules quittent les poumons puis migrent dans le foie, ils subissent une maturation sexuelle et deviennent adultes. Ils perdent alors de leur mobilité et commencent à se nourrir à partir des érythrocytes de l'hôte. De nombreux auteurs se sont intéressés à caractériser la(les) protéase(s) impliquée(s) dans cette dégradation, aussi de nombreuses protéases capables de dégrader l'hémoglobine ont été caractérisées, même si une certaine confusion existe encore quant à attribuer le rôle d'"hémoglobinase" à l'une ou l'autre d'entre-elles. En effet, en 1987, Davis *et al.* (1987) caractérisent ce qu'ils appellent alors une "hémoglobinase" car cette fraction purifiée chez les vers adultes présente une activité vis-à-vis de l'hémoglobine. Puis, Klinkert *et al.* (1987; 1989) caractérisent et clonent deux cystéine protéases nommées Sm31 et Sm32, la Sm32 correspondant en fait à la copie complète de l'ADNc de l'"hémoglobinase" décrite précédemment. Quant à la Sm31, elle présente des homologies avec des protéases de mammifères et particulièrement avec des cathepsines B. La nature de la Sm31 a été confirmée en 1993 par Götz & Klinkert (1993) qui ont cloné et exprimé cette protéine en cellules d'insectes. La Sm31 recombinante ainsi obtenue est capable de cliver non seulement un peptide substrat spécifique des cathepsines B, mais également l'hémoglobine. Dorénavant nommée cathepsine B, cette protéase a été exprimée en levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et l'étude fonctionnelle de cette enzyme a permis de confirmer sa capacité à dégrader l'hémoglobine (Lipps *et al.*, 1996). Quant à la Sm32, également exprimée en cellules d'insectes (Götz & Klinkert, 1993), elle ne présente pas d'activité vis-à-vis de l'hémoglobine, ce qui va à l'encontre du rôle d'"hémoglobinase" supposé jusqu'alors. La question quant à la nature de cette protéase n'a été résolue que plus tard, lorsqu'une homologie de séquence avec une asparaginyl endoprotéase a été observée (Dalton *et al.*, 1995a). La Sm32 est donc effectivement une cystéine protéase d'une famille de protéase décrite essentiellement chez les légumineuses. Depuis, l'activité asparaginyl endoprotéase a été effectivement caractérisée dans les vers adultes de *S. mansoni*, et il a été suggéré que la Sm32 pourrait jouer un rôle dans les modifications post-traductionnelles, régulant ainsi l'activité d'autres molécules (Dalton *et al.*, 1995b), notamment des cathepsines (Dalton & Brindley, 1996a).

Ainsi, plusieurs cathepsines ont été identifiées chez *S. mansoni*, outre la cathepsine B (ou Sm 31), deux cathepsines L (cathepsine L1 (Smith *et al.*, 1994) et cathepsine L2 (Michel *et al.*, 1994)), ont été caractérisées et semblent impliquées également dans le métabolisme du parasite. Ces deux protéases présentent 44% d'homologie au niveau protéique, la cathepsine L2 possédant le plus fort degré d'homologie avec la cathepsine L humaine (52%). De plus, des différences observées entre ces deux cathepsines au niveau du site actif, de la région correspondant au propeptide ainsi que leurs sites potentiels de glycosylation suggèrent que ces deux enzymes présentent des fonctions différentes pour le schistosome (Dalton *et al.*, 1996). De plus, ces deux enzymes possèdent des localisations différentes: la cathepsine L1 est localisée dans l'intestin, alors que la cathepsine L2 est majoritairement présente chez la femelle, au niveau de structures associées au système de reproduction; son rôle dans la migration des cellules vitellines ou des œufs chez le schistosome femelle a été suggéré (Michel *et al.*, 1995).

Une autre cystéine protéase, vraisemblablement impliquée dans le métabolisme des vers adultes a également été caractérisée: il s'agit de la calpaine (ou CANP pour "Calcium Activated Neutral Proteinase"), clonée simultanément par deux équipes (Andresen *et al.*, 1991; Karcz *et al.*, 1991).

Des activités exoprotéasiques, parmi lesquelles une leucine amino peptidase (Auriault *et al.*, 1982a), ont été identifiées chez les vers adultes et les schistosomules; cependant, leur rôle dans le maintien des vers dans le système vasculaire reste à définir.

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

3.3 Œufs : Extravasation, excrétion et éclosion

La transmission de la bilharziose repose notamment sur la capacité des œufs à être excrétés de l'hôte définitif vers le milieu extérieur. Pour cela, bien que ne possédant aucun moyen de se déplacer, les œufs doivent franchir plusieurs barrières. En effet, les œufs produits par les vers femelles, sont déposés à l'intérieur des vaisseaux et sont parfois entraînés par le flux sanguin dans de fins capillaires où ils restent bloqués et déterminent la formation du granulome bilharzien. Cependant, une partie d'entre eux s'extravase et traverse la paroi de l'intestin, duquel ils seront excrétés. Les protéases, combinées à des contractions musculaires des tissus de l'hôte sont fondamentales dans ce processus. Ainsi, différentes activités protéolytiques ont été identifiées dans les œufs.

On note principalement des cystéine protéases, décrites initialement par Asch & Dresden (1979) puis caractérisées par Sung & Dresden (1986). Ces trois cystéine protéases, dont deux sont majoritaires, présentent une activité cathepsine L-like et leur rôle dans la sortie des œufs du système vasculaire a été suggéré.

En 1968, une activité collagénase-like avait également été décrite dans les œufs mais ne fut jamais plus caractérisée ensuite (Kloetzel, 1968).

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

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

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

La figure 6 tente de clarifier la complexité observée dans la synthèse des protéases de *S. mansoni* au cours du développement. Cependant, il faut noter que l'absence d'expression sur cette figure n'indique pas forcément l'absence réelle d'expression par le parasite, pour beaucoup l'étude à d'autres stades que ceux figurés n'a pas été réalisée. Néanmoins, on note l'absence d'élastase au stade adulte, alors que l'ARNm correspondant y est détecté, l'expression stade spécifique de l'élastase a été suggérée par Pierrot *et al.* (1996).

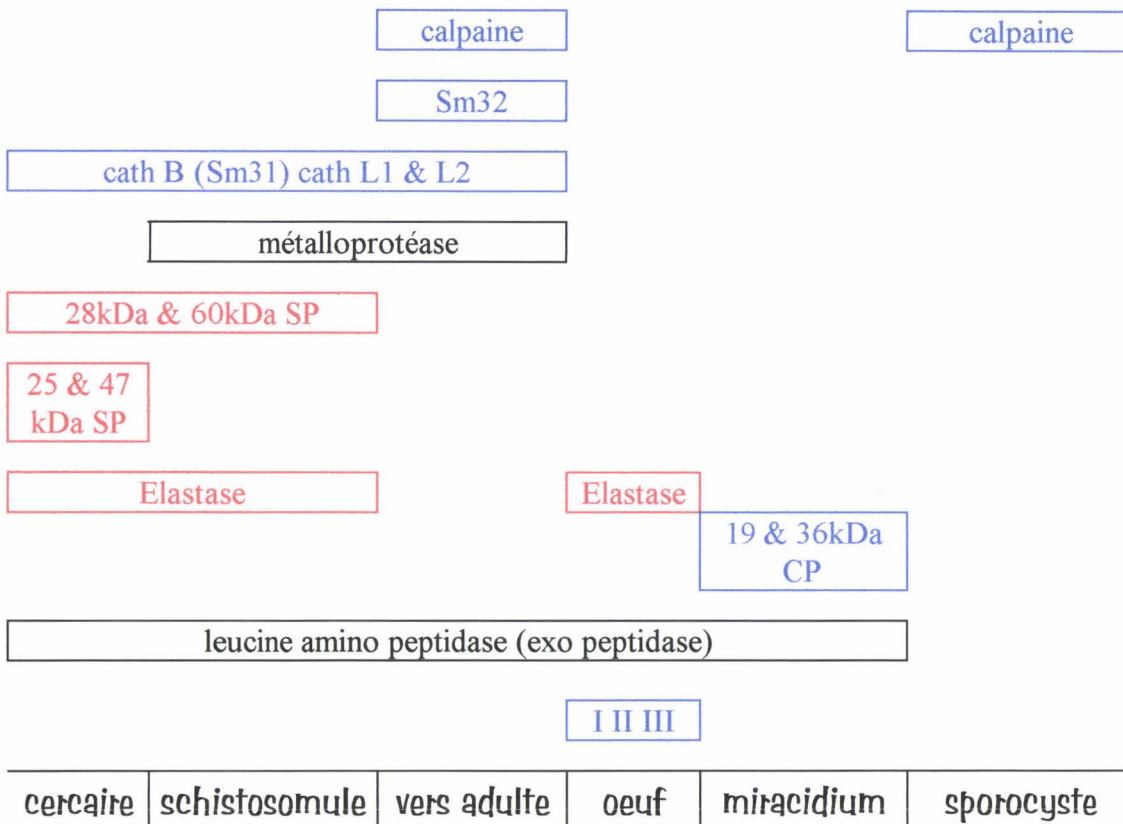


Figure 6: Expression des protéases de *S. mansoni* au cours du développement. Représentation schématique basée sur la détection d'activités protéolytiques spécifiques et/ou de la protéine (élastase). Les sérine protéases sont représentées en rouge et les cystéine protéases en bleu.

3.5 Immunogénicité des protéases de *S. mansoni*

En surface ou excrétées/sécrétées dans le milieu extérieur, on peut s'attendre à ce que les protéases de *S. mansoni* soient fortement immunogéniques car elles peuvent être en contact avec le système immunitaire de l'hôte. Peu de travaux se sont consacrés à cette étude, et les protéases dont l'immunogénicité a été testée sont les Sm31/32 et l'élastase de cercaires.

Les Sm 31 et Sm 32 ont été initialement caractérisées suite à l'observation de leur potentiel en sérodiagnostic. En effet, plusieurs études ont montré la présence d'anticorps dirigés contre ces deux protéases dans des sérums d'infection. Concernant la Sm 31, Ruppel *et al.*

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

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

également participer à ce phénomène en complexant l'élastase, ce qui entrainerait une disparition rapide de ces complexes par endocytose via le récepteur pour l' α 1-antitrypsine (Modha & Doenhoff, 1994).

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

3.6 Régulation de la réponse immunitaire de l'hôte par les protéases de S. mansoni

Les protéases sont souvent impliquées dans des phénomènes de régulation ou de modulation des réponses immune et inflammatoire (§1.2.3). Des protéases de *S. mansoni* ont également été impliquées dans de tels phénomènes, même s'il est souvent difficile d'une part d'associer précisément ces observations à l'une ou l'autre des protéases décrites auparavant et, d'autre part d'évaluer l'importance de ces mécanismes pour le parasite.

3.6.1. Echappement à la réponse immune

Les protéases interviennent dans l'échappement à la réponse cytotoxique développée contre le parasite et d'autre part, sont capables de se "dissimuler" en évitant ainsi toute réponse dirigée contre elles-mêmes.

Ainsi, il a été montré que les protéases du schistosome étaient capables de cliver les IgG de l'hôte fixées par leur fragment Fc à la surface des schistosomules (Auriault *et al.*, 1980; 1981a; 1981b). De plus, les peptides libérés par ce clivage possèdent la capacité à inhiber *in vitro* non seulement l'activité anti-schistosome des macrophages, mais également l'activité phagocytaire non spécifique de ces cellules. Cette action est observée uniquement lorsque le clivage des IgG est réalisé par les protéases parasitaires. Par la suite, un peptide (TKP) capable de reproduire l'effet inhibiteur des différentes activités macrophagiques a été

caractérisé (Auriault *et al.*, 1983a; 1985). L'ensemble de ces travaux suggère que le parasite peut non seulement détourner la réponse immune de l'hôte en dégradant une composante essentielle de celle-ci mais également utiliser à son profit les produits de cette dégradation.

Par ailleurs, les protéases de *S. mansoni* semblent également impliquées dans la régulation du complément, autre composante de la réponse immune de l'hôte. En effet, Marikovsky *et al.* (1988a) ont montré que la sérine protéase de 28 kDa, caractérisée chez les schistosomules, pouvait dégrader les composants C3, C3b, et C3bi du complément (cf. §1.2.2). Le C3bi, déposé à la surface du schistosomule, est le ligand du CR3 des cellules effectrices et notamment des éosinophiles (Capron *et al.*, 1987). Son clivage va permettre de protéger la larve contre la mort médiée par les leucocytes. De plus, cette protéase ainsi que la 60 kDa caractérisée par les mêmes auteurs, sont impliquées dans la perte du glycocalyx. Elles clivent donc des molécules de surface du schistosomule qui sont susceptibles d'activer le complément. Ainsi, alors que les cercaires et les schistosomules nouvellement transformés sont sensibles à l'action du complément, ils deviennent rapidement résistants (Marikovsky *et al.*, 1988b).

L'interaction des protéases de *S. mansoni* avec les inhibiteurs de l'hôte peut également apparaître comme un moyen pour le parasite d'échapper à la réponse de l'hôte. En effet, il a été montré que les protéases de *S. mansoni* interagissaient avec des inhibiteurs de sérine protéase de l'hôte tels que l' α 2-macroglobuline (Damian *et al.*, 1973), la contrapsine (Modha *et al.*, 1988) et l' α 1-antitrypsine (Modha & Doenhoff, 1994a). Les protéases impliquées dans cette interaction ne sont plus immunogènes; ainsi l'injection de trypsine complexée à la contrapsine (serpine de souris) n'induit pas la production d'anticorps dirigés contre la trypsine alors qu'il existe une réponse contre l'inhibiteur et contre le complexe inhibiteur/protéase. Un autre exemple de formation de tels complexes concerne l'élastase (Modha & Doenhoff, 1994b) et a déjà été décrit comme pouvant expliquer la faible immunogénicité de cette protéase (cf § 3.5).

En outre, le schistosome synthétise lui-même un inhibiteur de sérine protéases, la Smpi 56, dont la cible est soit la 28kDa caractérisée chez les schistosomules, soit l'élastase (Ghendler *et al.*, 1994). Cet inhibiteur pourrait également intervenir dans une régulation non spécifique de la réponse immune car il peut inhiber *in vitro* l'élastase de neutrophiles.

3.6.2 Rôles des protéases dans la potentialisation de la réponse immune

Parallèlement aux phénomènes de régulation ou d'échappement à la réponse immune décrits précédemment, il semble que les protéases parasitaires soient également capables d'augmenter cette réponse immune. En effet, Auriault *et al.* (1982b) ont montré que les produits relargués par le schistosomule (SRP pour "Schistosomula Released Products") possèdent la capacité à augmenter l'activité des éosinophiles humains et de rat. Plus particulièrement, ces auteurs ont observé l'augmentation de la cytotoxicité des éosinophiles dépendante d'anticorps vis à vis des schistosomules, ainsi que l'augmentation de l'expression des récepteurs Fc. Par la suite, les facteurs responsables de cette action ont été identifiés à des protéases, une activité collagénase semble être impliquée (Auriault *et al.*, 1993b).

La même démarche a permis également d'impliquer les sérine protéases de *S. mansoni* dans l'augmentation de la réponse IgE chez le rat. Dans un premier temps, Auriault *et al.* (1984) ont montré que l'injection de SRP à des rats induisait une importante réponse IgE cytotoxique. Par la suite, le rôle des sérine protéases a été suggéré par les travaux de Verwaerde *et al.* (1986) qui montrent qu'une réponse IgE spécifique est augmentée *in vivo* par la co-injection de SRP, et inhibée en présence d'inhibiteurs spécifiques de sérine protéases. La caractérisation moléculaire des protéases impliquées a été réalisée et a permis d'identifier deux sérine protéases dans le SRP : une majeure de 27.5 kDa et une mineure de 29kDa, toutes deux également présentes à la surface des larves de *S. mansoni* (Verwaerde *et al.*, 1988).

*Cadre
et
Objectifs*

La Bilharziose ou Schistosomiase représente la seconde grande endémie parasitaire après le paludisme. La morbidité observée dans cette affection chronique et débilitante est essentiellement liée à l'étonnante fécondité des vers femelles dont les œufs pondus par centaines chaque jour sont déposés dans de nombreuses muqueuses et tissus. Divers aspects visant à réduire la morbidité tels que l'éducation pour la santé, le diagnostic, la promotion de l'approvisionnement en eau saine et un assainissement efficace ont été développés. Les médicaments existants actuellement, parmi lesquels le praziquantel, l'un des plus actifs, ne préviennent pas la réinfection, ont peu d'effet sur les formes hépatospléniques sévères de la maladie et n'affectent guère la transmission. La lutte contre les gastéropodes, hôtes intermédiaires ainsi que la modification de l'environnement ont été envisagés. Enfin, la recherche d'un vaccin efficace demeure aujourd'hui l'une des priorités de nombreux organismes internationaux dans la lutte contre la schistosomiase.

Cette stratégie doit passer par l'identification d'antigènes susceptibles d'induire une protection, par la caractérisation des composantes de la réponse immune qu'il convient d'induire par la vaccination mais aussi par la caractérisation de molécules capables de moduler cette réponse.

Dans ce contexte, l'étude des protéases de *S. mansoni* trouve tout son intérêt. En effet, de nombreux travaux ont permis de montrer le rôle fondamental de ces molécules dans la survie du parasite tout au long du cycle évolutif: elles interviennent dans la digestion de la peau de l'hôte facilitant ainsi la pénétration des cercaires, puis les schistosomules et les schistosomes sont aidés dans leur migration puis leur nutrition par des protéases capables de dégrader, pour certaines des macromolécules tissulaires de l'hôte, ou pour d'autres, l'hémoglobine. Enfin, les protéases sont impliquées dans l'extravasation et l'éclosion des œufs, permettant la libération du miracidium. Outre leur activité protéolytique, les protéases présentent un intérêt significatif dans la réponse immune. En effet, elles participent aux phénomènes d'échappement à la réponse immune mis en œuvre par le parasite, en détruisant les immunoglobulines d'isotype IgG fixées à la surface des larves (Auriault *et al.*, 1981a) ou en intervenant dans la résistance au complément (Marikovsky *et al.*, 1988b). De plus, l'interaction des protéases de *S. mansoni* avec un inhibiteur de protéase de l'hôte peut également constituer un mécanisme d'échappement.

D'autre part, les protéases semblent impliquées dans la modulation de la réponse immune de l'hôte en sa faveur. Ainsi, il a été montré dans le laboratoire (Verwaerde *et al.*,

1986, 1988) que la régulation de la synthèse de immunoglobulines IgE *in vitro* et *in vivo* dépendait de la présence de l'activité sérine protéase. Dans ce contexte, deux sérine protéases présentes dans les produits relargués par les schistosomules (SRP) ont été identifiées comme étant responsables de cet effet. Or une réponse IgE est considérée comme composante essentielle de la défense de l'hôte lors d'une parasitose à *S. mansoni*.

Devant les multiples intérêts que présentent les protéases et plus particulièrement les sérine protéases de *S. mansoni*, nous nous sommes attachés dans le laboratoire à la caractérisation dans un premier temps de l'élastase, puis, dans un second temps, nous avons développé une stratégie d'identification de nouvelles sérine protéases.

L'élastase de *S. mansoni*, a été décrite chez la cercaire, forme larvaire infestante de l'hôte définitif (McKerrow *et al.*, 1985). Il s'agit d'une sérine protéase de 30kDa, sécrétée, qui agit en dégradant l'élastine de la peau, assurant ainsi la pénétration de la larve. Cette protéine intervient donc à une étape cruciale du cycle parasitaire et semble être un candidat de choix dans le cadre d'une stratégie de chimio- ou immunothérapie. Ainsi, Cohen *et al.* (1991) ont montré qu'un inhibiteur spécifique du site actif de l'élastase peut bloquer la pénétration des cercaires dans la peau. Dans le laboratoire des études complémentaires ont permis de mieux caractériser par des approches moléculaires et immunologiques l'expression « stade-spécifique » de cette protéase (Pierrot *et al.*, 1996). Ainsi, la régulation de l'expression de la protéine semble apparaître aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. L'étude des régions promotrices du gène a révélé, en effet, la présence de séquences consensus pour des facteurs de transcription décrits chez les eucaryotes, potentiellement régulés par des cytokines inflammatoires (Pierrot *et al.*, 1995). Les études concernant la potentialité de cette protéase en tant que modulateur de la réponse immune ont été gênées par une absence d'activité de l'enzyme recombinante. Aussi, nous nous sommes attachés au cours de ce travail à l'expression de l'élastase recombinante en cellules d'insectes et à la caractérisation partielle de l'activité enzymatique détectée.

Cette étude constitue la seconde partie de notre travail qui débuta par l'identification et la caractérisation d'une nouvelle sérine protéase de *S. mansoni*.

Devant la conservation des séquences protéiques du site actif des ces protéases, nous avons pu, en effet, développer un stratégie visant à identifier de nouvelles sérine protéases de *S. mansoni*. Ainsi, nous avons utilisé des oligonucléotides dégénérés basés sur

les séquences consensus du site actif de ces enzymes afin d'initier de multiples réactions de PCR.

L'obtention d'une nouvelle séquence codant pour une sérine protéase de *S. mansoni* nous a conduits à caractériser davantage cette enzyme afin de mieux appréhender son rôle dans la relation hôte-parasite.

Ainsi, la première partie de ce travail concernera la caractérisation de cette nouvelle sérine protéase au niveau moléculaire, par l'étude des séquences nucléique et protéique, puis par l'étude de l'expression de la protéine native au cours du cycle évolutif du parasite. Enfin, nous aborderons la stratégie de purification de la protéine native mise au point à partir d'extraits solubles de vers adultes.

Dans un second temps, nous analyserons les résultats de l'expression de l'élastase de *S. mansoni* produite en cellules d'insectes.

Matériels

et

Méthodes

1. Matériels

1.1 Souches Parasitaires

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

Les expériences d'infestation expérimentale sont réalisées à l'aide de cercaires de la souche Guadeloupe de *S. mansoni* (fournie par le Prof. Jourdane, Université de Perpignan).

1.2 Souches bactériennes et cellulaires

✓ Cellules

Tableau 6: Souches cellulaires utilisées pour l'expression de la « chaîne légère » de SmSP1 et de l'élastase en cellules d'insectes.

<i>Nom</i>	<i>Caractéristiques</i>
Sf 9	Lignée dérivée d'ovaires (Ovary, fall armyworm) de <i>Spodoptera frugiperda</i> . ATCC CRL-1711.
High Five™	Lignée dérivée d'œufs de <i>Trichoplusia ni</i> . BTI-TN-5B1-4.

✓ Bactéries

Tableau 7 : Souches bactériennes utilisées.

<i>Nom</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Utilisation</i>
JM 109	<i>E. coli</i> e14 ⁻ (mcrA), rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17 (r _k ⁻ , m _k ⁺), sup E44, rel A1 D(lac-pro AB), [F' tra D36, pro AB, lac I ^q ZΔM15]	Souche utilisée pour le sous-clonage
M15	[pREP4]: NaIs Strs Rifs lac- ara- gal- mtl- f- recA ⁺ uvr ⁺ .	Expression protéique en système procaryote
P2392	LE392 (P2 lysogen): e14 ⁻ (mcrA), hsdR514, supE44, supF58, LacY1 ou Δ(lacIZY)6, gal K2, gal T22, metB1, trpR55,	Criblage de la banque génomique construite en λEMBL3
XL1Blue	rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17, sup E44, rel A1, lac, [F'proAB, lacI ^q lacZΔM15, Tn10(tet ^r)]	Criblage de banques cDNA construites en λZAP
NM 538	r _k ⁻ , supE supF hsdR	Criblage de la banque génomique construite dans NM1149

1.3 Vecteurs

1.3.1 Vecteurs phagiques

Tableau 8 : Vecteurs phagiques utilisés dans la construction des banques de *S. mansoni*.

<i>Nom</i>	<i>Banque</i>	<i>Caractéristiques</i>
λEMBL3	Banque génomique	<i>sbhI</i> λ1° <i>b189</i> (polycloning site <i>int29 ninL44 trpE</i> polycloning site) KH54 <i>chiC srI</i> λ 4° <i>nin5 srI</i> λ5°.
NM 1149	Banque génomique	Phage, dérivé de λgt10, utilisé pour la fabrication d'une sous-banque contenant des fragments (de 6 et 10 kb) issus d'une digestion <i>Eco</i> RI de l'ADN génomique de vers adultes de <i>S. mansoni</i> .
λZAP	Banque cDNA	<i>λsbh I</i> λ1°, <i>chiA</i> 131(T amp ColE1 ori <i>lacZ'</i> T3 promoter-polycloning site- T7 promoter I) <i>srI</i> λ3° <i>cI ts 857, srI</i> λ4° <i>nin5 srI</i> λ5° Sam 100

1.3.2 Vecteurs d'expression

Tableau 9 : Vecteurs utilisés pour l'expression de la SmSP1 et/ou l'élastase de *S. mansoni*.

<i>Nom</i>	<i>Caractéristiques et Utilisation</i>
pQE-30 (Qiagen)	Expression en système procaryote. Vecteur d'expression de protéine fusionnée à 6 histidines (Qiagen), utilisées lors de la purification par chromatographie de résine de chélate chargée en Nickel (Qiagen). Transformation de la souche bactérienne M15. Résistance à l'ampicilline. Expression protéique inducible par l'IPTG (0.5mM).
pAcGP67, B (Pharmingen)	Expression en système eucaryote. Vecteur contenant la séquence de sécrétion de la gp67 (glycoprotéine de l'enveloppe de AcNPV (cf.§1.4)) en amont du site de polyclonage. Expression de la protéine sous la dépendance du promoteur de la polyhédrine.

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

Tableau 10 : Vecteurs utilisés pour le séquençage.

<i>Nom</i>	<i>Caractéristiques</i>
PCR TM II	Sous-clonage direct de fragments obtenus par PCR (TA Cloning, Invitrogen).
PUC18- <i>Eco</i> RI ou <i>Hind</i> III	Plasmide PUC 18 (Pharmacia, Suède) digéré par <i>Eco</i> RI ou <i>Hind</i> III utilisé pour le sous-clonage d'inserts obtenus après digestion enzymatique de l'ADN phagique.

1.4 Expression protéique en système eucaryote

Baculovirus, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) (BaculoGold[®], Pharmingen, CA, USA) infectant les cellules d'insectes Sf9 et HF.

1.5 Animaux

lapins: néo-zélandais.

rats: Fischer F344 (Iffa Credo, France) ou LouM de 6 semaines.

souris: Balb/c (Iffa Credo, France).

1.6 Milieux et Tampons

Tableau 11 : Milieux utilisés.

<i>Nom</i>	<i>Composition</i>
LB	10g Bacto Tryptone, 5g Yeast extract, 10g NaCl, qsp 1l
LBA	LB + Ampicilline 50mg/l
LBT	LB+ Tétracycline 6,25mg/l
SOB	20g Bacto Tryptone, 5g Yeast extract, 520mg NaCl, 180mg KCl, qsp 1l + MgCl ₂ 210mM extemporanément
SOC	SOB + glucose 20mM
MEM	Minimal Eagles Medium (GIBCO), pénicilline 1.10 ³ U/l, streptomycine 50mg/l
NZY	NZY Broth 21g/l (GIBCO)
TOP NZY	NZY+ bacto agar 0.7%
SM	5.8g NaCl, 2g MgSO ₄ 7H ₂ O, 50ml Tris HCl 1M pH 7.5, gélatine 2%, qsp H ₂ O 1l

Tableau 12 : Tampons utilisés.

<i>Nom</i>	<i>Composition</i>
20XSSC	NaCl 3M, Na ₂ citrate 2H ₂ O 0.3M pH 7.2
Tampon de dénaturation	NaOH 0.5M, NaCl 1.5M
Tampon de neutralisation	Tris 0.5M pH 7.2, NaCl 1.5M
PBS	NaCl 137mM, KCl 2.7mM, NaHPO ₄ 7H ₂ O 4.3mM, KH ₂ PO ₄ 1.4mM
Tampon de migration gel agarose	TAE 1X
TAE 50X	242g Tris Base, 57.1 ml acide acétique glacial, 37.2 g Na ₂ EDTA 2H ₂ O
Tampon électrophorèse (SDS PAGE)	6g Tris-Base, 28.8g Glycine, 2g SDS, qsp H ₂ O 2l
Tampon de transfert (Western blot)	Tris-Base 20mM, Glycine 150mM; méthanol 20%, SDS 0.1%
TFB	1.21g RbCl, 0.12g MnCl ₂ 2H ₂ O, 0.14g CaCl ₂ 2H ₂ O, 0.08g H ₂ CoCl ₃ , qsp 99ml + 1ml
KMES	MES 1M ajusté à pH 6.3 avec KOH
TE 1X	Tris 10mM pH 7.4, 0.1mM EDTA, pH8 qsp H ₂ O 1l
TBS	NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM pH 7.4

2. Méthodes

2.1 De la PCR au sous-clonage

2.1.1 Polymerase Chain Reaction ou PCR

Différentes matrices (produits de "Transcription Reverse" d'ARN, RT, de vers adultes, banque ADNc λ Zap, ADN génomique de cercaires) ont été amplifiées par PCR à partir d'oligonucléotides dégénérés basés sur les séquences consensus du site actif des sérine protéases. Celui-ci est constitué en N-terminal par une histidine (CAC) et en C-terminal par un résidu sérine (AGT/C ou TCi) (Sakanari *et al.*, 1989). La troisième base des codons des oligonucléotides dégénérés est remplacée par une inosine (i).

Tableau 13: Séquence des oligonucléotides dégénérés basées sur les séquences consensus du site actif des sérine protéases.

<i>Oligonucléotides</i>	<i>Séquence</i>
5' (sens)	1: 5'- TGG GTi GTi ACi GCi GCi <u>CAC</u> TG -3'
3' (antisens)	2: 5'- AG iGG iCC iCC i <u>CT</u> ATC iCC -3'
	3: 5'- AG iGG iCC iCC i <u>GA</u> ATC iCC -3'
	4: 5'- AG iGG iCC iCC i <u>CT</u> GTC iCC -3'
	5: 5'- AG iGG iCC iCC i <u>GA</u> GTC iCC -3'

La réaction de PCR a été réalisée sur 40 cycles comprenant chacun 3 étapes: **dénaturation** de la matrice double brin une minute à 94°C, **hybridation** des oligonucléotides (amorces) à 45°C (le Tm des oligonucléotides étant supérieur ou égal à cette température), puis synthèse (**élongation**) du second brin d'ADN par la Taq

Polymérase (Promega) pendant une minute. Le premier cycle comporte une dénaturation plus longue (6 minutes à 94°C) et le dernier cycle est bouclé par une extension de 7 minutes à 72°C. Les réactions ont été réalisées à l'aide d'un appareil programmable (DNA Thermal cycler - Perkin Elmer).

Lors du séquençage complet du clone génomique ou de RT-PCR, les réactions ont été réalisées de la même façon, mais avec un temps d'extension variant de 1.30 min à 10 min. Les oligonucléotides utilisés sont présentés dans le tableau 14. Dans ce tableau figurent également les oligonucléotides qui ont permis d'initialiser le séquençage du clone génomique. Les oligonucléotides qui ont permis l'amplification de la " chaîne légère " de la SmSP1 ont été supplémentés de sites enzymatiques, ainsi l'orientation dans le plasmide fut directionnelle.

Tableau 14: (Page ci-après) Séquences des oligonucléotides utilisés en RT-PCR et/ou dans la stratégie de séquençage complet du gène codant pour SmSP1 .

Les séquences soulignées sont les séquences correspondantes au site enzymatique ajouté pour faciliter le clonage directionnel du fragment codant pour la chaîne légère de SmSP1. Les oligonucléotides UP et RP sont respectivement les " Universal et Reverse primers ".

<i>Nom</i>	<i>Séquence</i>	<i>Orientation</i>
UP	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	Antisens
RP	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'	Sens
F	5'-CTT TTG AGC AAG TTC AGC CTG GT-3'	Antisens (λ gt10 F)
PC 1	5'- CGC CAA TGA CAT AGC ACT -3'	Sens
PC 2	5'- CCT GTA TTA TGT GTA TCT CCC -3'	Antisens
PC 3	5'- TGT ATT CAA CCA ATG CCA-3'	Sens
PC 4	5'- CTT GGC AAG CAT CAA TTC-3'	Antisens
PC 5	5'-GCG ATG GTT TGT AGA CGT TGG AAG AT-3'	Sens
PC 6	5'-GTA TCC AGC ACA AAA GCT TGC TTT AT-3'	Antisens
PC 7	5'- CCA GCT TGA ACT GTT TGA -3'	Antisens
PC 7'	5'- TCA AAC AGT TCA AGC TGG -3'	Sens
PC 8	5'-ACT CTC ATA GTA GTT CCC-3'	Sens
PC 9	5'- CCC TTG GAT ACA ATT ACT -3'	Sens
PC 9'	5'- AGT AAT TGT ATC CAA GGG-3'	Antisens
PC 10	5'- GAT CAC ATG ACA GCC TAC AC -3'	Sens
PC 11	5'- GTT TAT GGA TAA CGG AGG -3'	Sens
PC 11'	5'- CCA AGC ACC TTT TGG AGC CGG TTG G -3'	Antisens
PC 12	5'- ATC GAA TTA TTG GTG AAT AAT AC -3'	Sens
PC 14	5'- CTA ACT AAT CTC TCT TAT GTG -3'	Sens
PC 16	5'-CAA AAA ACT TGA ATA CCA GTC AGA AAA CAT AGC C -3'	Antisens
PC 17	5'- CGG TCA GTT TAT GAT AAC GAA-3'	Sens
PC 18	5'- GGC CGT GTG GTC AAT GGC-3'	Sens
PC 19	5'- CTG TTA ACG TCA ACT GCC TTT TAA TTC CCG AT -3'	Sens
PC 20	5'- ACT TAC GCC TGT TAC CTC TCG CCG -3'	Antisens
PC 21	5'- GAC GGC AAT TGA TTT TGA TTG TGA -3'	Sens
PC 23	5'- TTC GGG TTT TAA TGG ATC TTA CAG A-3'	Antisens
PC 24	5'- GTG GTC AAT GGC CAA CCG GCT CCA AAA GGT GC -3'	Sens
BPC 24	5'- AAC TGG <u>GGA TCC</u> GTG GTC AAT GGC CAA CCG GCT CCA AAA GGT -3'	Sens (Présence d'un site <i>Bam</i> HI)
SPC 16	5'- TGA AAA <u>CCC GGG</u> TTA CAA AAA ACT TGA ATA CCA GTC AGA AAA CAT AGC C-3'	Antisens (Présence d'un site <i>Hind</i> III)
So 5'	5'- AAC GGG GTA GCA TAA CTT TCC AGT AGT TAA TTC -3'	Sonde antisens
So 3'	5'- ACA TGT AAA AAT GTT TAA TAT TCA ACA GGA TGT -3'	Sonde sens
LDL 1	5'- GTC ACT CAT CAT TCG AAT GGA AA -3'	Sens
LDL 2	5'- TGG ATT TTC TGA TTG CTC AGG TTC AGA AGA -3'	Sens
LDL 3	5'- TGT CCA ACA TCC CAA TGT ATA TTG -3'	Sens

2.1.2 Reverse Transcription-PCR ou RT-PCR

La RT-PCR est une transcription reverse d'ARN suivie d'une réaction de PCR.

✓ Extraction d'ARN

L'ARN total d'œufs, de cercaires et de vers adultes est préparé selon la technique de Chirgwin *et al.* (1978) à l'aide d'une solution d'isothiocyanate de guanidium 4M; la purification est réalisée sur gradient de chlorure de césium. L'ARN est ensuite précipité avec 2.5 volume d'éthanol 100% et 0.1 volume d'acétate de sodium 3M pH5.2, puis resuspendu dans de l'eau et quantifié par mesure de l'absorbance à 260nm puis conservé à -20°C.

✓ Reverse Transcription-PCR

10 µg d'ARN sont rétrotranscrits à l'aide d'un oligo(dT) en présence de reverse transcriptase Mu-MLV (Superscript II, Gibco) 1h à 37°C dans un volume final de 25 µl. La réaction est arrêtée après 3 minutes à 92°C. Les réactions de PCR sont réalisées sur 1 µl de cette matrice à partir d'amorces oligonucléotidiques spécifiques présentées précédemment.

2.1.3 Sous-clonages

Les clonages des fragments amplifiés par PCR ont été effectués dans pCRTMII (TA Cloning) après incubation du vecteur et de l'insert (rapport molaire 1/5) une nuit à 14°C en présence de la T4 DNA ligase (Gibco). Les clonages des fragments issus de digestions enzymatiques de l'ADN phagique sont réalisés de la même façon dans les vecteurs pUC-18 digéré par *Eco RI* ou *Hind III*.

Le clonage en vecteur d'expression pQE 30 du fragment obtenu par PCR, à l'aide des oligonucléotides dégénérés, s'est effectué après digestion de l'insert, cloné en TA Cloning, par les enzymes *Sac I* et *Xho I* et digestion du vecteur par *Sac I* et *Sal I* (les sites *Xho I* et *Sal I* étant compatibles).

En vue de l'expression en cellules d'insectes de la SmSP1 de *S. mansoni*, le

fragment BPC24/SPC16, obtenu par RT-PCR a été cloné dans le vecteur pAcGP67B après digestion du fragment et du vecteur par les enzymes *Bam* HI et *Sma* I. Ce même vecteur a également été utilisé pour le sous clonage de l'élastase sous sa forme mature initialement cloné en vecteur pQE30 et libéré après digestion par les mêmes enzymes (Pierrot *et al.*, 1996).

2.1.4 Transformation bactérienne

Les bactéries, JM109 (vecteur de clonage) et les M15 (vecteur d'expression), sont d'abord cultivées pendant une nuit en milieu LB et en LBK respectivement. Le lendemain, les cultures sont diluées au 1/100e dans 15ml de milieu SOB et mises sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO de 0,45 à 550nm. Les cultures sont alors centrifugées à 2500 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot est repris dans 10ml de TFB. Une nouvelle centrifugation est donnée à 2500 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot est repris par 2ml de TFB. Puis, on ajoute stérilement et successivement 84µl de DMSO, 84µl de DTT et enfin 84µl de DMSO en prenant la précaution de placer la culture sur glace entre chaque étape.

A ce stade, les bactéries sont dites compétentes. 210µl de cette culture seront mis en contact avec le plasmide ligué et laissés sur glace pendant 30 minutes. Un choc thermique d'une minute et demi à 42°C puis de 2 minutes sur glace assurera la transformation des bactéries et donc la pénétration des plasmides. Une incubation pendant une heure à 37°C après ajout de 800µl de SOC permettra une régénération des bactéries. La culture de JM109 sera étalée sur boîtes LBA XGal, la culture de cellules M15 sur LBAK, les boîtes sont alors laissées une nuit à l'étuve à 37°C. L'analyse des bactéries recombinantes se réalise après extraction de l'ADN plasmidique et digestion enzymatique de celui-ci pour s'assurer de la présence de l'insert cloné. L'ADN plasmidique purifié peut servir alors de matrice pour le séquençage de l'insert.

2.2 Du criblage de banques au séquençage complet du gène

2.2.1 Préparation de cellules compétentes

Les cellules P2392 et NM538, utilisées pour le criblage des banques génomiques, sont mises en culture à 37°C sur la nuit dans 15ml de NZY. Les cellules XL1 Blue, utilisées pour le criblage de banques cDNA, sont mises en culture dans du LBT. Le lendemain, les cultures sont diluées au 1/50e dans 15ml de milieu supplémenté en MgSO₄ 10mM. Les cultures sont remises sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO de 0,5 à 600nm pour les P2392 et les NM538 ou de 0.7 pour les XL1 Blue. Après centrifugation, le culot de cellules P2392 est repris dans 4ml de MgSO₄ 10mM et remis en culture une heure à 37°C, temps au bout duquel les cellules sont compétentes. Lors de leur utilisation, celles-ci seront diluées au 1/5e dans du MgSO₄ 10mM. Tandis que les culots de XL1 Blue et de NM 538 sont repris dans un demi volume de MgSO₄ 100mM et les cellules sont alors utilisées directement. 100 µl de chacune des souches seront mis en contact avec 100 µl de phages dilués pendant 30 min à 37°C avant d'être coulés dans du TOP NZY sur les boîtes contenant la gélose NZY.

2.2.2 Le criblage de banques

Les banques de *S. mansoni* sont étalées à confluence sur boîtes de pétri (milieu NZY + TOP NZY). Lorsque les plages de lyse atteignent environ 1mm de diamètre les empreintes sont prises. Pour cela, des membranes de nitrocellulose (Millipore) sont placées quelques minutes sur les boîtes, puis ces membranes sont incubées 2 min en tampon de dénaturation, 5min en tampon de neutralisation et 30 secondes en tampon de rinçage (Tris 0,2M, pH7,5, 2xSSC). Les membranes sont ensuite fixées 2h à 80°C, puis hybridées avec une sonde radioactive.

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

2.2.3 Préparation de sondes radioactives

Le marquage des sondes correspondants au fragment de 467 bp initialement obtenu à l'aide d'oligonucléotides dégénérés ou au fragment PC16/PC17 obtenu par RT-PCR a été réalisé suivant le protocole du kit Megaprime (Megaprime™ DNA labelling systems, Amersham). Le fragment (40ng) est marqué avec 50µCi de [α -³²P] dCTP. selon la méthode du "multi-amorçages au hasard".

Un oligonucléotide (50') a également été utilisé en tant que sonde pour hybrider l'ADN phagique; il a été marqué suivant le protocole du kit "Ready to Go-polynucleotide Kinase" (Pharmacia). 10 pmoles d'oligonucléotides sont ainsi marqués au [γ -³²P] dATP. La sonde est ensuite purifiée sur colonne (Sephadex™G50, Pharmacia) afin d'éliminer les nucléotides marqués libres.

2.2.4 Hybridation des membranes

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

2.2.5 Préparation de l'ADN phagique

Un clone positif est étalé sur 10 boîtes (NZY+TOP NZY) à raison de 50 000 plaques de lyse par boîte. Le lendemain la gélose est récupérée en grattant délicatement celle-ci à l'aide d'un scalpel. La gélose isolée est ensuite recouverte de milieu SM (50ml pour 3 boîtes) en présence de chloroforme (10% final) et incubée à 37°C pendant 15 min afin de permettre l'éluion du phage dans le milieu. L'éluat est ensuite obtenu après centrifugation à

4 000tr/min pendant 10 min à 4°C.

La culture est ensuite incubée en présence de RNase et DNase à 1mg/ml final pendant 30 minutes à température ambiante. Puis, on ajoute 1M final de NaCl au milieu et le tout est laissé 1 heure dans la glace. Le surnageant est ensuite récupéré après centrifugation à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Enfin, 10% final de PEG 8000 sont ajoutés au surnageant et laissés incubés sur glace 1 heure minimum. Après centrifugation à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C, le culot est ensuite repris dans 2 ml de milieu SM. Le PEG et les débris sont alors extraits de la préparation après 3 "lavages" avec du chloroforme (V/V). La phase aqueuse est ensuite ultracentrifugée à 30 000tr/min (rotor SW55Ti) pendant 2 heures afin de récupérer les bactériophages, ceux-ci sont ensuite repris dans du SM et incubés une nuit à 4°C. Le lendemain, la préparation est incubée 1 heure à 56°C en présence de protéinase K (50mg/ml), de SDS 0,5% et d'EDTA 20mM. Puis deux extractions au phénol/chloroforme et une au chloroforme sont réalisées avant précipitation à l'acétate de sodium (0,3M pH7) en présence de 2 volumes d'éthanol 100%. L'ADN phagique est ensuite isolé après centrifugation à 12 000g 15min à 4°C, puis lavé à l'éthanol 70%. Celui-ci est alors repris dans de l'eau et déposé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET).

2.2.6 Séquençage

Seront séquencés les fragments clonés issus de PCR ou issus de produits de digestion de l'ADN phagique. Le séquençage a lieu à partir d'amorces spécifiques du vecteur de sous-clonage ("Universal et Reverse primers") ou à partir d'oligonucléotides, spécifiques de l'insert clonés, présentés dans le tableau 14.

Les réactions de séquence se réalisent suivant la méthode de Sanger, à l'aide du kit de séquençage (Terminator reaction Cycle Sequencing Ready, ABI Prism, PE, Applied Biosystems), et sont déposées sur le séquenceur automatique ABI 377 (Perkin Elmer). Les séquences obtenues sont ensuite analysées à l'aide des programmes "Swiss-Prot and NBRF-PIRTM-protein databases" et "GenBank" (DNA Star, Madison, WI, USA). L'analyse des structures secondaires de la séquence codant pour SmSP1 a été réalisée grâce à un programme décrit par Rost *et al.* (1994).

2.3 Etude de l'expression génique de *SmSP1*

2.3.1 Préparation d'ADN génomique

L'ADN génomique de *S. mansoni* est préparé à partir du stade cercaire, forme larvaire isolée, donc supposée non contaminée par l'hôte (définitif ou intermédiaire). Les cercaires sont broyées en une fine poudre dans de l'azote liquide. Cette poudre est ensuite traitée 3h à 37°C en tampon Tris 10mM pH7,5, EDTA 0,1M, SDS 0,5% additionné de protéinase K à 100µg/ml. Après addition de NaCl à 0,1M, on effectue les extractions successives suivantes: phénol, phénol-chloroforme, puis chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol 100%, traité une nuit à 37°C en Tris 10mM pH 7.5, EDTA 1mM puis 30 minutes à 37°C en présence de RNase à 50µg/ml. Après une extraction au phénol-chloroforme, l'ADN est précipité puis resuspendu en Tris 10mM pH 7.5, EDTA 1mM, et enfin quantifié par mesure de l'absorbance à 260nm et conservé à 4°C.

2.3.2 Southern blot

Les produits de digestion de 3µg d'ADN génomique de cercaires par différentes enzymes de restriction (*Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III) sont déposés sur gel d'agarose 0.8%. Après migration, le gel est traité 2 fois 20 minutes en tampon de dénaturation, puis 30 minutes en tampon de neutralisation. Un transfert par capillarité est ensuite effectué sur membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) dans un bain de 20xSSC. La membrane est fixée 2 heures à 80°C puis hybridée selon le protocole décrit dans le § 2.2.4.

2.3.3 Northern blot

L'extraction d'ARN total de différents stades du parasite a été réalisée selon le protocole présenté dans le § 2.1.2, puis les ARN messagers sont ensuite isolés après passage au travers d'une colonne poly(dT) selon le protocole préconisé dans le kit " mRNA Purification kit " (Pharmacia). 5µg d'ARNm sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 1.2% (10x MOPS, 18% formaldéhyde). Le gel est ensuite transféré par capillarité sur membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) après un bain d'une heure dans du 20xSSC.

La membrane est ensuite fixée 1 heure à 80°C et hybridée comme il a été décrit dans le § 2.2.4.

2.4 Expression de SmSP1 en système procaryote et caractérisation de la protéine native correspondante

2.4.1 Expression et purification de la protéine recombinante

Le fragment amplifié à l'aide des oligonucléotides dégénérés précédemment cloné dans le vecteur pCR™ II, fut ensuite sous-cloné en vecteur d'expression pQE 30 (§ 2.1.3). L'expression de la protéine recombinante se réalise suivant le protocole décrit dans QIAexpressionist (Qiaexpress™, Qiagen). Après un contrôle rapide de l'expression par microculture, la protéine exprimée est purifiée. La présence des 6 histidines en amont des sites de clonage permettra de purifier la protéine recombinante sur colonne de chélate chargée en nickel (colonne Ni-NTA resin - Qiagen). Les différentes étapes de purification sont ensuite déposées sur SDS PAGE 15%.

2.4.2 Obtention d'un antisérum et purification d'IgG

Des lapins néo-zélandais ont été immunisés à plusieurs reprises par injection sous-cutanée selon la technique décrite par Vaitukaitis *et al.* (1971) ou en intra-ganglionnaire avec la protéine recombinante en présence d'adjuvant complet de Freund (600µg ou 350 µg respectivement). Des rats LOU M ont également été immunisés (100µg/rat) en injection sous-cutanée. Après 4 semaines, les animaux ont été réinjectés avec une même quantité puis ont été saignés 15 jours plus tard au niveau du sinus orbital dans le cas des rats et au niveau d'une veine de l'oreille par aspiration sous vide pour les lapins. Puis, de nombreux rappels ont été réalisés tous les quinze jours. L'antisérum est obtenu par décantation et testé en western blot.

Les IgG de lapin anti-élastase et anti-SmSP1 sont purifiées à partir des sérums de lapin et de rats respectivement à l'aide d'acide caprylique selon le protocole décrit par

Steinbuch & Audran (1969): pour un volume de sérum sont ajoutés deux volumes d'acétate de sodium 60mM pH4,0. Sous agitation permanente, on ajoute ensuite goutte à goutte 0,75 ml d'acide caprylique dans le cas de sérum de lapin et 0.4 ml pour le sérum de rat. 30min après, une centrifugation à 5000g pendant 10min permet de récupérer le surnageant. Ce surnageant contient les IgG qui sont ensuite dialysées contre du PBS puis concentrées et purifiées par une précipitation au sulfate d'ammonium. La qualité des IgG est vérifiée par un test ELISA direct. 1mg/ml d'IgG sont ensuite marquées à la biotine selon le protocole décrit par le fournisseur (Calbiochem) pour être utilisées en ELISA par immunocapture.

*2.4.3 Préparation d'antigènes de *S. mansoni**

Les antigènes des différents stades ont été préparés pour la réalisation d'expériences de western blot et ELISA. Les œufs sont au préalable broyés en une fine poudre dans de l'azote liquide, puis cette poudre est traitée de la même façon que les autres stades : les parasites sont homogénéisés dans du PBS additionné de PMSF 0,5mM et EDTA 1mM. L'homogénat est broyé à l'aide d'un sonicateur 3 fois 30s (sonicateur labsonic U, B.Braun, industries Vasse) et centrifugé 2 fois 10 minutes à 10 000g à 4°C. Les surnageants sont récupérés et utilisés comme préparations antigéniques. Un dosage est réalisé afin d'évaluer la concentration en protéine (BCA protein assay, Pierce, USA). Ces préparations sont conservées à -80°C. Les milieux de culture des schistosomules, contenant les produits relargués (SRP pour "Schistosomula released products") sont également conservés à -80°C.

2.4.4 Western blot

Les préparations antigéniques ou la protéine recombinante correspondant à SmSP1 (rSmSP1) sont séparées sur SDS-PAGE 13% et transférées sur filtres de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Allemagne) pendant 3 heures à 60V, en tampon de transfert, (Towbin *et al.*, 1979). Les sites de fixation non spécifiques sont saturés dans une solution de PBS-lait 5% 2h à température ambiante puis les filtres sont incubés une nuit à 4°C avec le sérum dilué dans du PBS-lait 5%. Après 3 lavages en PBS-Tween-20 0,4% (PBS-Tween) les filtres sont incubés en présence d'un conjugué anti-IgG de lapin (Sanofi-Pasteur,

France) ou anti-IgG de rat (Sigma, USA) marqué à la peroxydase (1/500e et 1/100e respectivement) pendant 2 heures à température ambiante. Après trois lavages en PBS-Tween, la révélation s'effectue avec le substrat de la Horse Radish Peroxydase (4-chloro-1-naphtol, BIO-RAD) en présence d'eau oxygénée. La réaction est arrêtée avec de l'eau.

Le western blot a également été utilisé lors de l'étude de réactivité croisée entre l'antisérum dirigé contre la rSmSP1 et la kallikreine pancréatique de porc (Sigma). Pour cela, cette dernière fut déposée sur SDS-PAGE 13% et transférée selon la méthode précédemment décrite, les étapes suivantes étant identiques.

2.4.5 ELISAs

✓ ELISA par immunocapture

L'ELISA par immunocapture ou " sandwich " a été utilisé, d'une part, pour évaluer la présence de la protéine native correspondant à SmSP1 dans différents extraits antigéniques et d'autre part, pour étudier la présence de la chaîne légère de la rSmSP1 et l'élastase lors de leur expression en cellules d'insectes.

Des plaques 96 puits de microtitration (Immulon III, Dynatech Laboratories, USA) sont sensibilisées 3h à 37°C avec 100µl/puits d'IgG purifiées à 10µg/ml en PBS. Après 3 lavages en PBS contenant 0,1% de Tween-20 (PBS-Tween), les plaques sont saturées 1h à température ambiante avec 200µl/puits de PBS-gélatine 0,5%. 100µl/puits de dilutions (PBS-Tween) sérielles des préparations antigéniques, de SmSP1 ou d'élastase recombinante sont ajoutés et incubés une nuit à 4°C. Les plaques sont lavées de nouveau puis incubées 1h30 à 37°C en présence de 100µl/puits d'IgG spécifiques marquées à la biotine diluées au 1/2000e en PBS-Tween, puis 30 minutes à 37°C en présence de 100µl/puits de streptavidine marquée à la peroxydase (1/2500e) (Amersham, France). Après 5 derniers lavages, le substrat (ortho-phenylenediamine, Sigma) dilué à 1mg/ml en tampon Phosphate de sodium 0,1M pH5,5, contenant 0,03% d'eau oxygénée est ajouté et incubé à l'obscurité 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 100µl/puits d'HCl 2N et la densité optique (DO) est mesurée à 492nm. Les résultats sont exprimés en ng de protéine étudiée par mg de protéines totales ou en ng/ml de milieu dans le cas du dosage de la SmSP1 dans le SRP.

✓ ELISA direct

L'ELISA direct a été utilisé pour l'étude de l'immunogénicité de la SmSP1 au cours d'infection expérimentale par *S. mansoni* (§ 2.4.7). Des plaques de microtitration (NUNC-Immulon™, Polylabo, France) sont sensibilisées 3 h à 37°C avec 100µl/puit de protéine recombinante (rSmSP1) diluée à 10µg/ml dans du PBS. Après 3 lavages en PBS-Tween et une saturation d'1h à température ambiante avec 200µl de PBS contenant 0.5% de gélatine, les sérums de rats ou de souris dilués (1/100e) dans du PBS-Tween sont ajoutés et incubés une nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées comme décrit précédemment et incubées 1h30 à 37°C avec des IgG de chèvre anti-IgG de rat (1/10000°) (Sigma) ou anti- IgG mouse (1/20000e) (Sanofi-Pasteur, France) marquées à la peroxydase diluées dans du PBS-Tween-20. La révélation et la mesure des DO sont réalisées suivant le protocole décrit précédemment. Les résultats sont exprimés en DO en fonction des jours d'infection et/ou de réinfection.

2.4.6 Marquage métabolique et immunoprécipitation

Des vers adultes de *S. mansoni* (2 couples/ml) sont maintenus en culture dans du MEM contenant 0,02% gentalline-gentamycine en présence de sérum de veau foetal 10% sans methionine (GIBCO) pendant 1 h à 37°C dans un étuve à 5% CO₂. Puis, le milieu est renouvelé et additionné de ³⁵S-Met (50µci/ml) (Amersham), les parasites sont alors incubés pendant une nuit. Après plusieurs lavages en MEM, les vers adultes (environ 15 couples) sont homogénéisés dans un tampon de lyse (Tris 10mM, NaCl 0,15M, NP40 0.5%, EDTA 1mM, PMSF 0.5mM pH 7.4) et sont broyés à l'aide d'un sonicateur et centrifugés à 10 000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré et le marquage est estimé après précipitation au TCA (25%) 1h dans la glace. Avant l'immunoprécipitation les antigènes sont saturés sur la protéine G-agarose (Sigma) avec un sérum sain de rat en présence de TNTE (Tris 5mM, NaCl 0,15M, NP40 0,5%, EDTA 2mM, PMSF 0,5mM pH 7,4) pendant 2 h à 4°C sous agitation. Puis les échantillons sont incubés avec la protéine G-agarose préincubée avec le sérum sain ou anti-protéine recombinante dans du TNTE sur la nuit à 4°C. Les billes sont ensuite lavées et éluées, le surnageant est analysé sur SDS-PAGE 15%. Après traitement avec une solution " Amplify " (Amersham), le gel est séché et mis en

exposition sur un film KODAK BIOMAXTMMR à -80°C.

2.4.7 Localisation par immunofluorescence

Les vers adultes sont fixés dans une solution de PBS pH 7.4 contenant de la paraformaldéhyde 4%, puis sont inclus dans de la paraffine. Des coupes de 3µm sont effectuées, puis elles sont déparaffinées, réhydratées et incubées pendant 30 minutes dans une solution de Tris-HCl contenant 0.5% d'ovalbumine (OVA) et 5% de sérum de veau décomplémenté (TBS; 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.4). Une incubation avec le sérum de rat anti-rSmSP1 ou pré-immun dilué dans du TBS-0.5% OVA (1/100^e) pendant une nuit à 4°C fait suite. Après deux lavages en TBS-0.5% OVA, les coupes sont incubées avec des IgG de chèvre, couplées à la FITC, dirigées contre les IgG de rat (1/50^e) (Jackson Immunoresearch, USA) pendant 30 minutes à température ambiante. Après plusieurs lavages en TBS-0.5% OVA, les coupes sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Axioskop Zeiss, Germany).

2.4.8 Etude de l'antigénicité de la protéine native

✓ Infestation expérimentale

Les rats, préalablement endormis au Valium (100µl/ 250g) et à l'Imalgène (100µl/ 200g), sont infestés par voie transcutanée selon la technique des anneaux (Smithers & Terry, 1965) à raison de 1000 cercaires de la souche Guadeloupe par rat, puis réinfestés selon la même méthode 9 semaines après la première infestation. Les souris Balb/c sont, elles, préalablement endormies au pentobarbital (dilué au 1/20^e dans de l'eau physiologique (400µl/ 20g)) et infestées selon la même méthode avec 50 cercaires par souris.

✓ Sérums d'infection

Les animaux sont ensuite saignés toutes les semaines ou tous les 15 jours par ponction rétro-orbitale. L'analyse de la réponse anticorps dirigée contre la protéine recombinante rSmSP1 s'effectue par ELISA direct (§ 2.4.5).

2.5 Expression de la " chaîne légère " de SmSP1 et de l'élastase en cellules d'insectes et caractérisation de l'activité enzymatique

2.5.1 Cotransfection

Les cellules Sf9 sont cotransfectées, à une densité de 1.10^6 /ml dans du milieu Grace (Gibco BRL) additionné de sérum de veau fœtal à 10% (Boehringer), à l'aide du vecteur recombinant (3 à 5 μ g) (cf. § 2.1.3) et de 0.5 μ g d'ADN viral (Baculo Gold ® DNA, Pharmingen) dans un boîte de 25 cm² selon le protocole décrit. Cinq jours après incubation à 27,5°C, le surnageant infectieux est récupéré pour infecter de nouvelles cellules à une même densité dans une boîte de 75cm², dans du milieu XPRESS (BioWitthaker, Bioproducts). Le surnageant de culture est également récupéré 5 jours plus tard pour être ensuite cloné selon la méthode, préconisée par le fournisseur, de plages de lyse par " plaque-assay " .

2.5.2 Clonage

2 millions de cellules sont mises à adhérer dans des plaques 6 puits (MULTIWELL™, Becton Dickinson) et infectées par 500 μ l de dilutions successives (10^{-3} à 10^{-9}) de surnageant infectieux. Après une heure de contact à 27,5°C, le surnageant est éliminé, et les cellules infectées sont recouvertes d'agarose LMP (Low Melting Point, Euromedex) 2% préparé dans du milieu de Grace 5%. Les plages de lyse apparaissent après plus de 7 jours et sont alors repiquées par aspiration dans 1ml de milieu Grace. Les particules virales sont éluées après 4heures à 4°C. 500 μ l de ce surnageant serviront à infecter des cellules Sf9 comme décrit précédemment dans une boîte de 25cm² dans du milieu XPRESS.

2.5.3 Amplification virale et production de la protéine recombinante

Afin d'augmenter le titre viral, des passages successifs de 5 jours sont réalisés à partir d'une boîte de 25cm² puis 75cm² jusqu'à plusieurs boîtes de 175cm² après infection par

500µl de surnageant infectieux de la culture précédente. Le dernier surnageant infectieux servira de stock viral et sera titré, par la méthode des plages de lyse précédemment décrite. Le titre viral ainsi déterminé, nous permettra d'infecter à une bonne MOI (Multiplicity of Infection : rapport virus/cellule de 3 à 10) d'autres cellules Sf9 ou HF pour obtenir une production satisfaisante de la protéine recombinante. Puis le surnageant et les cellules sont récupérés 4 jours après infection (temps déterminé après étude cinétique) et la présence de la protéine recombinante est évaluée par ELISA immunocapture et l'activité enzymatique testée.

2.5.4 Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'élastase ainsi que de la chaîne légère codant pour SmSP1 sont évaluées en terme de dégradation de différents substrats. L'activité enzymatique a également été testée sur la protéine native correspondant à SmSP1.

✓ Azocoll

L'Azocoll correspond à du collagène imprégné d'une coloration rouge. L'hydrolyse de ce substrat induit la libération de peptides colorés proportionnelle à la concentration de l'enzyme.

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

✓ Autres substrats synthétiques

N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroaniline (Sigma)

N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Ala p-nitroaniline (Sigma)

N-Succinyl-Gly-Gly-Gly p-nitroaniline (Sigma)

N-Succinyl-L-Phe p-nitroaniline (Sigma)

Le développement d'une coloration jaune dont la DO est suivie à 410nm est la conséquence du clivage enzymatique de la chaîne polypeptidique qui libère la p- nitroaniline.

2.5.5 Purification de l'élastase recombinante

La purification a été menée à partir de l'élastase intracellulaire des cellules SF9. Ainsi, les cellules sont lysées dans un tampon Tris 10mM, NaCl 150mM, NP 40 0.5% pendant 30 minutes à 4°C (2.10⁸/ml).

Le surnageant est passé sur une colonne de p-aminobenzamidine, inhibiteur spécifique de sérine protéase, fixé sur sépharose (Sigma). Le lysat cellulaire est passé sur la colonne à un débit de 0.5ml/min à l'aide d'une pompe péristaltique à 4°C. Après plusieurs lavages en Tris HCl 50mM, NaCl 150mM pH8, l'élution a lieu avec un excès du même inhibiteur libre (10mM ou 30mM). Le complexe élastase/inhibiteur est dissocié par dialyses successives contre du Tris HCl pH8, puis concentré.

2.6 Mise au point de la purification de la protéine native correspondant à SmSP1

2.6.1 Préparation d'IgG spécifiques

Les IgG préparées selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.4.2 ont été purifiées par une chromatographie d'affinité. Pour cela, la rSmSP1 a été couplée à une matrice préactivée (NHS-activated Sepharose® 4 Fast Flow, Pharmacia) selon le protocole préconisé, la liaison se réalisant par le groupement NH₂ terminal des protéines. La réalisation de la chromatographie est suivie par FPLC (FPLC ® System, Pharmacia Biotech).

Les IgG spécifiques de la rSmSP1, fixées sur la colonne, sont alors éluées par passage d'un tampon acide (AcNa pH 4.6) et aussitôt neutralisées. Les IgG sont ensuite concentrées par ultrafiltration et leur spécificité est contrôlée en ELISA.

2.6.2 Couplage des IgG, préparation des matrices

Deux types de couplage ont été utilisés pour fixer les IgG sur une matrice.

Le premier couplage nécessite le traitement des IgG par le périodate (Sodium m-périodate ou Na_2IO_4). Ainsi, les IgG sont tout d'abord dessalées et dialysées dans un tampon acétate (Ac Na 60mM pH5.2) puis sont mises en contact avec 0.1 volume de Na_2IO_4 pendant 40 minutes à température ambiante puis sont de nouveau dessalées. Les anticorps ainsi préparés sont mis en contact avec la matrice (Hydrazide Avidgel, Interchim), préalablement équilibrée dans un tampon citrate 100mM, pendant 5 à 6 heures sous légère agitation. Après incubation, la matrice est lavée en tampon Tris HCl pH8 0.1M et conservée à 4°C.

Le second type de couplage est réalisé sur une matrice de sépharose préactivée (Séparose-CNBr, Sigma) et équilibrée en tampon phosphate 0.5M pH7.5. 600µl de gel sont alors mis en contact avec 3mg d'IgG totales préalablement dialysées contre le même tampon. La réaction se réalise à température ambiante sous légère agitation, elle est suivie par dosage de la DO du surnageant afin d'apprécier la quantité d'IgG fixées. Deux lavages de la matrice sont assurés par un tampon phosphate 0.5M pH7.5, puis par un tampon phosphate 0.5M pH7.5 + NaCl 1M. Le gel est ensuite incubé à température ambiante 2 heures avec 10 volumes d'éthanolamine 100mM pH7.5 afin de bloquer les sites libres activés. Après deux derniers lavages en PBS, les billes sont alors conservées à 4°C en présence de merthiolate 0.01% final, la matrice est stable pendant plusieurs mois.

2.6.3 Contrôle de la qualité de la colonne

100µl de chacune des matrices sont préincubés en tampon AcNa pH4.6 afin d'éliminer toute fixation non spécifique. Après deux lavages en PBS, chacune d'elle est mise en contact avec 75µg de rSmSP1 pendant 1h30 à température ambiante sous légère agitation. Après deux lavages en PBS, une première élution est réalisée en tampon PBS NaCl 0.5M dans 500µl, puis différentes éluions suivent à pH acide. Chaque lavage et éluat est concentré au TCA 20% pendant 1h à 0°C et analysé sur SDS-PAGE 15%.

2.6.4 Réalisation de la chromatographie d'affinité sur des extraits solubles de vers adultes ou SWAP

Les antigènes de vers adultes (SWAP pour Soluble Worms Antigens Preparation), préparés selon la méthode décrite dans le § 1.1, sont mis au contact des matrices. Le mode opératoire exécuté est identique à celui décrit dans le paragraphe précédent. L'activité enzymatique a été testée sur certaines fractions selon le protocole décrit dans le § 2.5.4.

Résultats

1. Identification de nouvelles sérine protéases de *S. mansoni*

1.1 Stratégie de PCR

Différentes stratégies ont été développées dans le but d'identifier de nouvelles sérine protéases de *S. mansoni*, et notamment une stratégie de PCR à l'aide d'oligonucléotides dégénérés (tableau 13) basés sur les séquences consensus du site actif de ces enzymes. Celui-ci est constitué de trois acides aminés (H, D et S) présents dans une séquence consensus (figure 7). Nous avons choisi d'utiliser des amorces dégénérées au niveau de l'histidine (CAC) et de la sérine (AGi ou TCi), acides aminés présents respectivement en C-terminal et N-terminal. Les séquences sont dérivés de celles décrites par Sakanari *et al.* (1989).

A

Trypsine de Rat	VSAAH C YKS	LNNDIMLI	DSCQGD S GGP
<i>TPA humain</i>	LSAAH C FQE	YDNDIALL	DACQGD S GGP
<i>Facteur IX humain</i>	VTAAH C VET	YNHDIALL	DSCQGD S GGP
<i>Sérine protéase de Anisakis simplex</i>	VTAAH C YKS	INNDIMIL	DSCQGD S GGP
<i>Elastase de S. mansoni</i>	LTAGH C VCS	SGPDIAIV	LPAPGD S GGP

B

	Val Thr Ala Ala His Cys	Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
1: 5'- TGG GTi GTi ACi GCi GCi <u>CAC</u> TG -3'		2: 3'- CCi CTA <u>TCi</u> CCi CCi GGi GA-5'
		3: 3'- CCi CTA <u>AGi</u> CCi CCi GGi GA-5'
		4: 3'- CCi CTG <u>TCi</u> CCi CCi GGi GA -5'
		5: 3'- CCi CTG <u>AGi</u> CCi CCi GGi GA -5'

Figure 7 : A : Alignement de séquences consensus du site actif (H, D et S) de différentes sérine protéases : trypsine de rat, activateur de plasminogène tissulaire (TPA) et facteur IX humain, sérine protéase de *A. simplex* (Sakanari *et al.*, 1989) et l'élastase de *S. mansoni*.

B : Séquences en acides nucléiques des amorces dégénérées choisies à partir des séquences consensus contenant l'histidine et la sérine.

Ainsi, nous avons amplifié différentes matrices telles que les produits de Transcription Reverse (ou RT) de vers adultes, une banque d'ADNc λ Zap et l'ADN génomique de cercaires. Le tableau ci-dessous résume les différentes réactions de PCR réalisées ainsi que les fragments qui ont été effectivement séquencés et analysés.

Tableau 15 : Récapitulatif des différentes PCR réalisées en vue d'identifier de nouvelles sérine protéases de *S. mansoni*.

<i>Matrice</i>	<i>Amorce 5'</i>	<i>Amorce 3'</i>	<i>Résultats</i>	<i>Remarques</i>
Banque d'ADNc (λ Zap)	1	2	-	
	1	3	-	
	1	4	-	
	1	5	-	
RT de vers adultes	1	2	-	Fragments séquencés (670pb et 1100pb) : aucune homologie.
	1	3	-	
	1	4	-	
	1	5	+	
ADN génomique de cercaires	1	2	+	Fragment séquencé (figure 9).
	1	3	+	Nombreux fragments non spécifiques.

Une amplification spécifique a été obtenue à partir de l'ADN génomique de cercaires à l'aide du couple d'oligonucléotides 1&2. La réaction de PCR a été déposée sur gel d'agarose 1% (figure 8) au côté des contrôles négatifs.

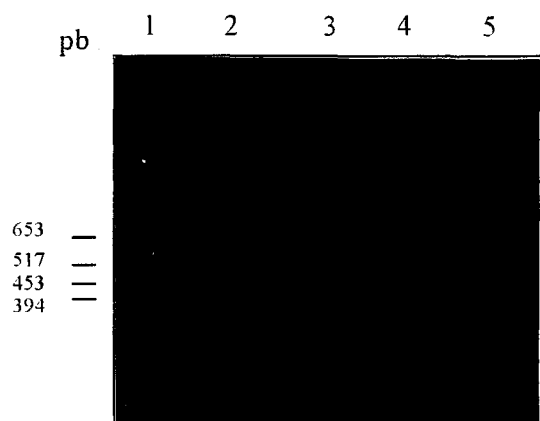


Figure 8 : Analyse sur gel d'agarose des produits de PCR menées sur ADN génomique de cercaires à l'aide des oligonucléotides dégénérés 1&2 (2). Les contrôles négatifs réalisés avec chacune des deux amorces seules ou à l'aide des deux amorces en absence de matrice ont été respectivement déposés en pistes (3), (4) et (5). En piste (1) est déposé un marqueur (VI) (Pharmacia).

1.2 Séquences nucléotidique et protéique

Le produit de PCR nommé SmSP1 présenté ci-dessus a été cloné et séquencé. Le séquençage a permis d'obtenir la séquence nucléotidique d'un fragment long de 467 pb (figure 9). Celle-ci est codante, en effet, il apparaît un cadre de lecture ouvert tout au long de la séquence, ceci suggère donc l'absence d'intron.

<u>TGGGTAATGACAGCTGCACACTGTATTCAACCAATGCCAGATCCAAAGCGATGGTTTGTA</u>	60
W V M T A A H C I Q P M P D P K R W F V	
GACGTTGGAAGATACTATAGAACTTTGGTGGTCTGAAGTTCAAAGAATAAACTTTCA 1	20
D V G R Y Y R N F G G P E V Q R I K L S	
CAAATTGTTATACACCCATCTTACAATAAAAAAATTTACGCCAATGACATAGCACTGTTA	180
Q I V I H P S Y N K K I Y A N D I A L L	
CGTCTACAAACTCCAGCTAATTTAGATAATCGTCAGGTACGACTTTCTCCAGTTCCACGT	240
R L Q T P A N L D N R Q V R L S P V P R	
AATCCTCATTTATCCGATTTATTAACAGATAATGTTTCAGTGCATGGTCGCTGGTTGGGGA	300
N P H L S D L L T D N V Q C M V A G W G	
GATACACATAATACAGGTTCAAATGATGTTCTAAGACAAGCAGTTCTTCCTGTCATTAAT	360
D T H N T G S N D V L R Q A V L P V I N	
TATGATCTTTGCAAATCATGGTATCAATATCTTAATAAAGCAAGCTTTTGTGCTGGATAC	420
Y D L C K S W Y Q Y L N K A S F C A G Y	
AAACAACGAGGAATTGATGCTTGCCAAGGTGATAGTGGGGGTCCTCT	467
<u>K Q R G I D A C Q G D S G G P L</u>	

Figure 9: Séquences nucléotidique et protéique du fragment de 467 pb ou SmSP1 amplifié à partir d'oligonucléotides dégénérés sur ADN génomique de cercaires. **H**, **D** et **S** constituent les trois acides aminés impliqués dans le site actif des sérine protéases. Les séquences soulignées sont apportées par les oligonucléotides dégénérés.

Ainsi, on retrouve dans la séquence en acides aminés déduite, soit 156 aa, l'histidine (H) et la sérine (S) dont la présence devra être confirmée puisque ces résidus sont apportés par les amorces dégénérées. En revanche, un autre acide aminé, l'acide aspartique (D) présent dans une région consensus conservée chez les sérine protéases, laisse entrevoir la présence de la triade d'acides aminés caractéristique du site actif des sérine protéases. Ce fragment a permis la synthèse d'oligonucléotides spécifiques de PC1 à PC6 dont les séquences sont présentées dans le tableau 14.

Ce fragment de 467pb sera utilisé dans un premier temps comme sonde pour cribler les différentes banques (cf. § 2.1) puis sera cloné dans un vecteur d'expression dans le but d'obtenir une protéine recombinante (cf. § 3.2.1).

1.3 Homologies de séquence

La séquence protéique déduite a été comparée à une banque de données et les homologies sont présentées dans la figure 10. Les protéines homologues concernent des sérine protéases impliquées dans la coagulation sanguine telles que l'activateur de plasminogène, la protéine C et la kallikréine plasmatique. Ainsi, l'activateur de plasminogène de chauve souris présente 42% d'identité du côté N terminal (position en acides aminés : 3 à 60 aa) et la protéine C humaine, 36% d'identité du côté C terminal (position 45 à 98 aa). Si l'on considère d'autre part les similitudes conservées (charges identiques symbolisées par deux points), le pourcentage d'homologies peut alors atteindre plus de 55%. Par ailleurs, la séquence en acides aminés présente sur toute sa longueur une homologie de séquence de 35% avec la kallikréine plasmatique de souris (MpKLLK). Il est important de noter la présence de la séquence consensus DIALL, mentionnée en figure 7 (et retrouvée dans l'activateur de plasminogène et le facteur IX humain), dans chacune des trois protéases homologues, celle-ci contient le troisième acide aminés (D) caractéristique des sérine protéases.

A			
<i>SmSP1</i>	TAAH C IQPMPDPKRWFVDVGRYYRNF G GGPEVQRIKLSQIVIHPSYNKKIYAN D IALLRLQTP	65	
	TAAH C :: :P P W : G : E :: ::IH Y: D IALL::LQTP		
<i>MpKLLK</i>	TAAH C FDGIPYPDVWRIYGGILSLSEITKETPSSRIKELIIHQEYKVSEGN D IALLIKLQTP	492	
<i>SmSP1</i>	ANLDNRQVRLSPVPRNPHLSDLLTDNVQCMVAGWGDTHNTG-SNDVLRQAVLPVINYDLCKSW	125	
	N .: Q .:. :P.::: .:. : T :C V:GVW T.: G ::::L:A.:P.: : C:.		
<i>MpKLLK</i>	LNYTEFQK P IC-LPSKADTNTIYT---NCWVTGWGYTKEQGETQNILQKATIPLVPNEECQKK	551	
<i>SmSP1</i>	YRDYVINKQMICAGYKEGGTDACKGDS GG GPL	155	
	Y :Y: NK. :CAGYK: G.DAC:GDS GG GPL		
<i>MpKLLK</i>	Y-QYL-NKASFCAGYKQ R GIDACQGD S GGP L	582	
B			
<i>SmSP1</i>	TAAH C IQPMPDPKRWFVDVGRYYRNF G GGPEVQRIKLSQIVIHPSYNKKIYAN D IALL	60	
	TAAH C :Q P:: V :GR YR G E Q : : : :IH :: Y N D IALL		
<i>VbTPA</i>	TAAH C FQERYPPQHRLRVVLGRTYRVKPGKEEQTFEVEKCIIEEFDDDTYN D IALL	324	
C			
<i>SmSP1</i>	HPSYNKKIYAN D IALLRLQTPANLDNRQVRLSPVPRNPHLSDLLTDNVQSMVAGWG	98	
	HP:Y:K N D IALL:L PA L : V : :L : :V:GWG		
<i>HuPC</i>	HPNYSKSTTD N D IALLHLAQPATLSQTIVPICLPDSGLAERELN Q AGQETLVTGWG	301	

Figure 10: Homologies de séquence entre SmSP1 et d'autres sérine protéases.
 (A) *MpKLLK* : Kallikréine plasmatique de souris, (B) *VbTPA* : Activateur de plasminogène de chauve souris (Vampire Bat : *Vb*), (C) *HuC* : protéine C humaine.

2. Etude du gène codant pour SmSP1

Au vu des résultats présentés précédemment, la stratégie de PCR nous a permis l'identification d'un fragment codant pour une nouvelle sérine protéase de *S. mansoni* dont il nous faut maintenant confirmer l'existence.

2.1 Southern Blot

Nous avons, dans un premier temps, voulu par Southern blot confirmer l'existence chez *S. mansoni* du gène codant pour cette nouvelle sérine protéase (SmSP1) et ainsi connaître le nombre de copies du gène codant pour la protéine SmSP1.

Ainsi, un Southern blot (figure 11) réalisé sur l'ADN génomique de cercaires digéré par différentes enzymes a permis de confirmer la présence d'un gène unique codant pour SmSP1 chez *S. mansoni*, puisque, en effet, une seule bande apparaît dans chacune des trois pistes.

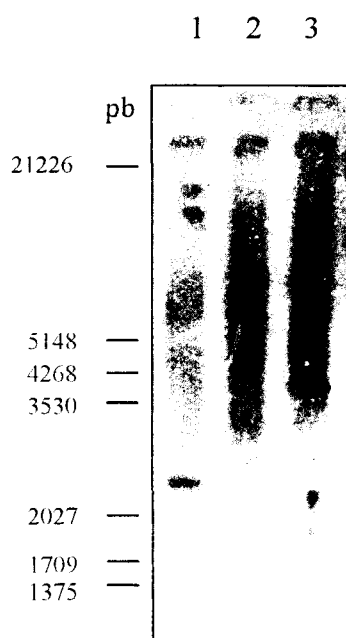


Figure 11 : Southern blot sur ADN génomique de *S. mansoni*. L'ADN génomique (1.5 µg) a été digéré par les enzymes de restriction *Acc I* (1), *Eco RI* (2) et *Hind III* (3) et hybridé avec le fragment de 467 pb présenté dans le § 1.2.

2.2 Obtention de deux clones génomiques

S'assurant ainsi, par Southern blot de la présence d'un gène unique codant pour SmSP1, nous avons entrepris le criblage de banques génomiques. Cette étude a fait suite aux multiples tentatives de criblages de banques d'ADNc qui n'ont malheureusement donné aucun résultat satisfaisant.

Le fragment de 467pb obtenu par PCR avec les oligonucléotides dégénérés nous a donc servi de sonde pour cribler une première banque génomique construite dans λ EMBL3. Un clone positif hybridant avec cette sonde fut isolé et étudié. La réalisation de Southern blot sur l'ADN phagique du clone digéré par différentes enzymes nous a permis de caractériser un fragment issu d'une digestion par *Hind* III. Ce fragment (H1) hybride avec la partie 3' de la sonde depuis le nucléotide 402 jusque 467. En effet, la séquence du fragment de 467pb de la figure 9 présente un site potentiel de clivage pour *Hind* III (AAGCTT) en position 402. Le fragment H1 a été cloné en vecteur pUC 18 digéré par *Hind* III et séquencé. Celui-ci a révélé et confirmé la séquence apportée par l'oligonucléotide dégénéré en 3'. Par ailleurs, aucun autre produit de digestion *Hind* III du clone étudié n'hybridait avec la partie 5' de notre sonde (position 1 à 402), aussi nous avons décidé de cribler une autre banque génomique.

La seconde banque étudiée, construite dans un vecteur phagique issu de λ gt10, nous a permis d'obtenir, après digestion par *Hind* III de l'ADN phagique, un autre fragment désigné par H2 qui hybride avec la région 5' (position 1 à 402) de notre sonde. Le séquençage partiel de ce fragment a également confirmé la présence de la séquence en 5' apportée par l'amorce dégénérée.

Nous avons donc deux clones génomiques, le premier, incomplet, n'a permis que l'étude de H1, tandis que le second a permis de poursuivre la stratégie de séquençage présentée dans le paragraphe suivant.

2.3 Stratégie de séquençage des clones génomiques

Dans un premier temps, les deux fragments H1 et H2 clonés et partiellement séquencés à partir de UP et RP (tableau 14) ont été complètement séquencés à partir d'oligonucléotides internes dont les séquences sont présentées dans le tableau 14 et les positions dans la figure 11. H1 est long de 1357pb et H2 de 2533pb. Les séquences de H1 et H2 confirment ainsi la séquence partielle initiale de SmSP1 présentée en figure 9.

La stratégie de séquençage (figure 12) du second clone s'est ensuite poursuivie, dans un premier temps du côté 3' par une réaction de PCR à l'aide d'un oligonucléotide présent à l'extrémité de H1 (So3') et un oligonucléotide présent sur le phage dans lequel est construite la banque (F). Le fragment de PCR désigné par So3'/F (1745pb) a été cloné et séquencé. Le côté 5' du clone génomique a été obtenu après digestion de l'ADN phagique et Southern blot à l'aide d'une sonde oligonucléotidique nommée So5'. Un fragment *Eco* RI hybridant avec la sonde a été cloné et séquencé. Ce fragment désigné par (E) est long de 1549pb.

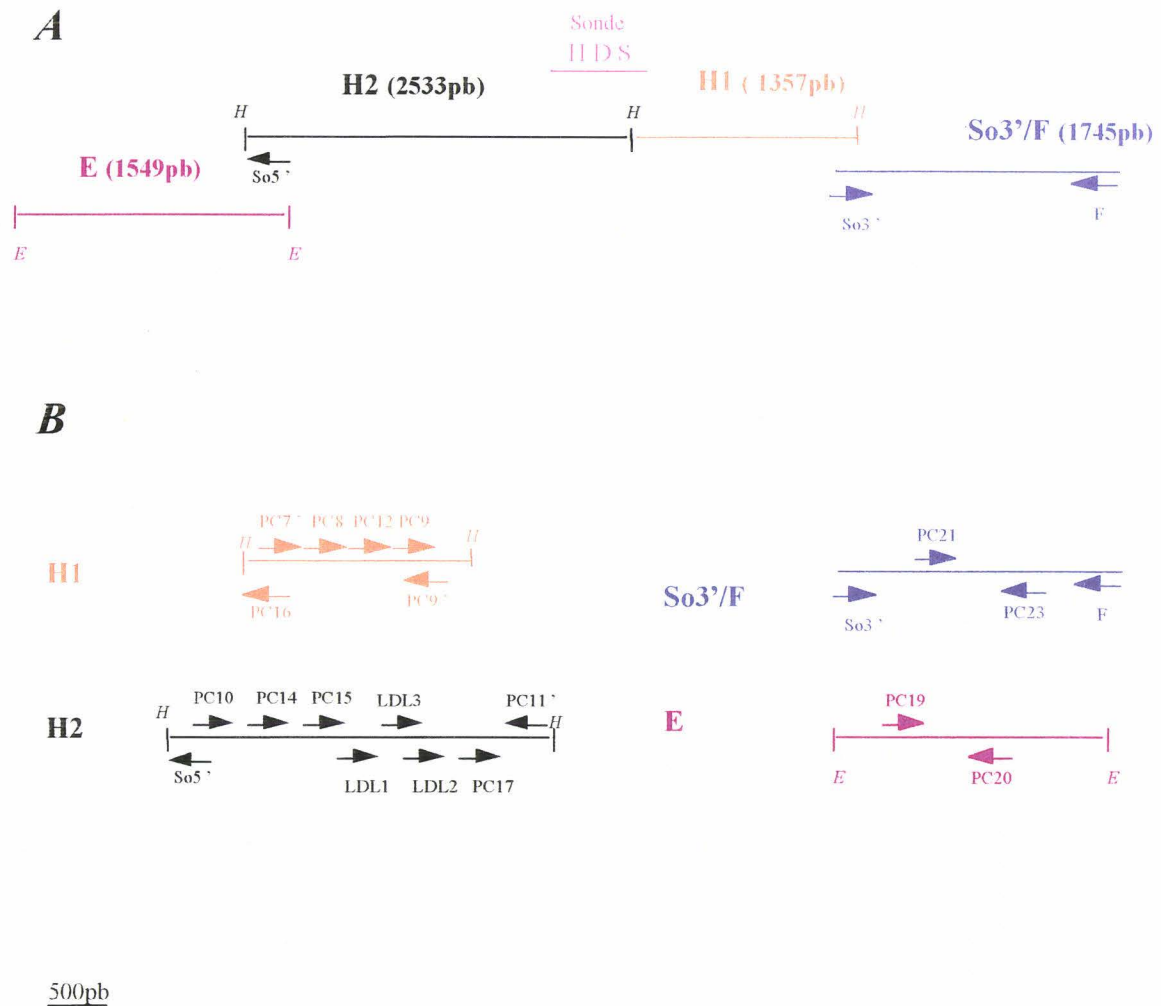


Figure 12 : **A** : Stratégie utilisée pour la caractérisation complète des deux clones génomiques obtenus après criblages de banques. Le fragment de 467 pb (H, D, S) utilisé en tant que sonde a permis d'obtenir H1 et H2 issus de deux clones différents. Le fragment So3'/F est issu d'une PCR sur l'ADN phagique du second clone. Le fragment (E) est issu d'une hybridation de la sonde So5' sur ADN phagique du second clone digéré par Eco RI. **B** : Description schématique des stratégies de séquençage des différents fragments. Chaque flèche symbolise une amorce pour la réaction de séquence exceptée So3', F et So5'.

2.4 Homologies de séquence en acides nucléiques

Les fragments H1, H2, E et So3'/F ont été comparés à une banque de données « GenBank » (DNA Star, Madison, WI, USA). Les homologies de séquences des fragments H1 et H2 seront présentées dans un paragraphe ultérieur. Les séquences nucléotidiques des fragments (E) et So3'/F ont été arbitrairement numérotés de 1 à 1745 pb et de 1 à 1549 pb respectivement.

A

SmN2	TCAACATTCACTGGTCGGACACTATCAGCAACAGTGTTTTATGGGAGAGAACAAACC	1822
(E)	TCAACAT CA TGG CGGA ACTATCAGCAACAG GTTTTATGG AGA ACAAACC TCAACATCCATTGGCCGGATACTATCAGCAACAGCGTTTTATGGTAGAAGACAAACC	758
SmN2	AGCTTCTCGCTGAAGAGGAAATTAGGAAAAGACATTAGAAGTGGATCCGACATACAT	1765
(E)	AGCTTC GCT AA A GA ATTAGGAAAAGAC TT GAAGTGGAT GACATAC T AGCTTCCAGCTAAACAAGATATTAGGAAAAGACGTTGGAAGTGGATAGGACATACTT	815
SmN2	TAAGGAAATCATCAAACCTGCATCACGAGGCAATCCCTAACTTGAATCTGGAAGGGA	1708
(E)	TAAGGAAATCA CAA TGCAT AC AGGCAATCC GGAAGGGA TAAGGAAATCACCAATGTGCATTACAAGGCAATCC-----GGAAGGGA	858
SmN2	AGTGGAAAAGAGGAAGGTCAAAGAACACATTACGCCGGGAAATTGAAGCAGATATGAA	1650
(E)	AGTGGAAAAGA GAAG C A AACACATTA GCCGG AAAT GAA CAGATATGAA AGTGGAAAAGAAGAAGACCATAAACACATTATGCCGGAAAATAGAAACAGATATGAA	916
SmN2	AAGGATGAATGTAACTGGAAAGAAGTGGAAATGATTGCCGAAGACAAAAGTGTGATGG	1591
(E)	AAGGATGAAAT AACTGGAAAGAAGTGGAAA GA GC A GACA AGT GATGG AAGGATGAATAACAAGTGGAAAGAAGTGGAAAGGAAGGCTCAGGACAGAGTTGGATGG	975
SmN2	AGAATGCTGGTGTGTGGCCTATGCTCCTCGTTGAGGAGTAACAGTCGTAAGTA	1539
(E)	AGAAT T GTG G GGC TATG TC TCG GAG GTAACAG CGTAAGTA AGAATANTAGTGAGCGGCTTATGNTCTTCGGCGAGAGGTAACAGGCGTAAGTA	1027

B

Sm α d-3	256 TAAACAGCAATGGGAAGATTCAAACAAACAATACAAAA	293
	TAAACA CAATGGGAAGATTCAAACAAACAATACAAAA	
SO3'/F	384 TAAACATCAATGGGAAGATTCAAACAAACAATACAAAA	347

Figure 13 : Homologies de séquence du fragment (E) et So3'/F, après comparaison avec la banque de données « GenBank » (DNA Star, Madison, WI, USA), n° accession du clone SmN2 : D87492, n° accession de Sm α d-3: X15621.

La figure 13A présente les homologies de séquences entre une portion du fragment (E) (nucléotides 702 à 1027) et une partie du clone SmN2 décrit par Tanaka *et al.* (1997). Le résultat présenté en figure 13B révèle la présence d'homologies entre une portion du fragment So3'/F (nucléotides 256 à 293) et un membre de la famille de Sm α (Sm α d-3) qui est constitué de courts éléments répétés décrit par Spotila *et al.* (1989). Il est à noter que les séquences homologues sont en position antisens par rapport aux séquences (E) et So3'/F.

2.5 Etude du cadre de lecture ouvert correspondant à SmSP1

Le cadre de lecture correspondant à la séquence partielle de SmSP1 précédemment décrite (figure 9) a été prolongé en 3' (fragment H1) de 44 aa jusqu'à un codon STOP (TAA), dont la présence est confortée par une séquence potentielle correspondant au site de polyadénylation 35 pb après ce codon STOP (AATAAAA) (résultats non présentés). En 5', le cadre de lecture est prolongé sur 289 aa (fragment H2) jusqu'à un codon STOP, mais sans présence de codon START défini (figure 14). Ainsi, le cadre de lecture ouvert est long de 489 aa. Nous confirmons la séquence complète obtenue à l'aide des amorces dégénérées (présentée en rouge dans la figure) et la prolongeons jusqu'au codon Stop. Nous avons, par la suite, procédé à la comparaison de ce cadre de lecture avec une banque de données et avons pu mettre en évidence des homologies de séquences avec le site catalytique des sérine protéases mais également avec d'autre protéine.

2.5.1 Homologies avec les sérine protéases

La comparaison avec une banque de données de ce cadre de lecture nous a permis d'identifier des protéines présentant de forte homologie au niveau de la structure primaire. Ainsi, la kallikréine plasmatique de souris est homologue à 34.5% et le facteur I, protéine impliquée dans la régulation du complément, présente un pourcentage d'homologie de 32% (figure 15). Il est important de noter que ces homologies ne concernent qu'une partie de SmSP1, de même elles ne concernent qu'un domaine de ces deux protéases : leur chaîne légère. En effet, ces deux enzymes sont synthétisées sous forme de proenzyme inactive et

d'une unique chaîne polypeptidique, un clivage protéolytique est nécessaire à l'activation de l'enzyme dont l'activité catalytique est codée par la chaîne légère. Les homologues présentées ne concernent donc que cette chaîne légère, ainsi, SmSP1 présente une séquence homologue à un domaine catalytique complet de type sérine protéase.

Ces deux sérine protéases sont activées après clivage protéolytique au sein d'une région consensus constituée d'acides aminés basiques et plus particulièrement après une arginine (R). Les homologues de séquence se terminent donc au niveau de ce site potentiel de clivage et l'on retrouve dans SmSP1 une séquence (RVVN) très hydrophobe contenant cet (R).

L'étude de la « chaîne légère » de SmSP1 fut approfondie à l'aide d'un programme (Rost *et al.*, 1994) basée sur l'alignement de structure protéique connue. Cette étude a permis l'analyse des structures secondaires de SmSP1 en comparaison avec différentes sérine protéases telles que l'élastase de porc et le trypsinogène bovin dont les structures tridimensionnelles sont connues. L'analyse a révélé que les principaux éléments impliqués dans la formation de structures secondaires sont correctement retrouvés chez SmSP1 (résultats non présentés). Ainsi, les résidus entourant les trois acides aminés impliqués dans le site actif (His, Ser, Asp) sont très conservés, ainsi que, de nombreux résidus cystéine, glycine et proline. En particulier, les résidus cystéine présents, dans la séquence SmSP1 aux positions 281, 297, 383, 413, 426, 437, 447 et 466 (figure 14) sont hautement conservés chez les sérine protéases. Par comparaison avec notamment le facteur I, les résidus cystéine 281 et 297, 383 et 447, 413 et 426, 437 et 466 sont potentiellement capables de former des ponts dissulfures assurant ainsi un repliement de la protéine semblable aux différentes sérine protéases étudiées.

Figure 14 : Page ci-après. Séquences nucléotidique et protéique du cadre de lecture ouvert codant pour SmSP1 après séquençage du clone génomique. La séquence obtenue à l'aide des oligonucléotides dégénérés qui a servi de sonde est présentée en rouge. Sont entourés les acides aminés impliqués dans le site actif (H, D, S), l'acide aminé (R) symbolise le site de clivage potentiel libérant une chaîne légère codant pour le domaine catalytique de l'enzyme (cf. § 2.5.1). Les flèches symbolisent l'emplacement et le sens des amorces utilisées dans une stratégie de RT-PCR (cf. § 2.6), les amorces « sens » sont par ordre LDL3 et PC17 et l'amorce « antisens » est PC16, la séquence soulignée est non codante.

TGATTATATCTATGCATGTTGTGGTATAATATACAGATACAAAATAGTTTGTCTATTATTGTACTA
 Stop L Y L C M L W Y N I Q I Q N S L S I I V L 21
 GTATTATGTAGATTTCATTGTTTAATATGTTTCCAATCTTTGATACTGAATGTGGTTCTACA
 V L C R F H C L I C F P I F D T E C G S T 42
 CCATTTATATTCAGTCCTAATGGAAATATTTATTCACATAAAGGTTATGAAAAACAATTGGCA
 P F I F S P N G N I Y S H K G Y E K Q L A 63
 TATGATGGATTGATTCAATGTTTTGGTTAATTCATGTTAATCCACAAGATCGTATTATTATT
 Y D G L I Q C F W L I H V N P Q D R I I I 84
 CAATCAGTTGATTTTGATCTAGCTGGTGATTCAATTCATGTGATGAAGATAGTTTAACTGTT
 Q S V D F D L A G D S I Q C D E D S L T V 105
 TATGAACCAGAAGATTATCAAGTTGACAATATAACATCTTCAGAAATTGATACATTACAGAAA
 Y E P E D Y Q V D N I T S S E I D T F T K 126
 AGAATTGGTAAATATCCATATTTGTGGATTGACAAGTTTTAGAGTATTATCTAGTTCCAATCAG
 R I G K Y P Y C G L T S F R V L S S S N Q 147
 TTATTTCTAGTATTTAAGGCTCGATCAGCTGGAAAACACAATGGTTTTAATCTACGTTATTCA
 L F L V F K A R S A G K H N G F N L R Y S 168
 GCTATAACAATAACTTGGCAAAGATAGTAGAATCTTCATCACAGTCTATTACAGTGAACAGG
 A I N N N L A K I V E S S S Q S I T V N R 189
 ACATGTCACCTCATCATTGCAATGGAAATGTCCAACATCCCAATGTATATTGAAAAATATGGAGA
 T C H S S F E W K C P T S Q C I L K I W R 210
 TGTGATGGATTTTCTGATTGCTCAGGTTGAGAAGATGAAATAAACTGTTTAAAGTCCACTTTCA
 C D G F S D C S G S E D E I N C L S P L S 231
 AAAATATCTCGTTTACATAGTAGACAAAAACGGTCAGTTTATGATAACGAAAGAAAACCTGGGGC
 K I S R L H S R Q K R S V Y D N E E N W G 252
 CGTGTGGTCAATGGCCAACCGGCTCCAAAAGGTGCTTGGGCTTTTATAGTTTCTTTACGTTTC
 R V V N G Q P A P K G A W A F I V S L R F 273
 TCCGGAAAACGGAGGACATGTTTGTGCAGGTAGCTTAATTAGCGCACAAATGGGTAATGACAGCT
 S G N G G H V C A G S L I S A Q W V M T A 294
 GCACACTGTATTCAACCATTTGCCAGATCCAAAGCGATGGTTTGTAGACGTTGGAAGATACTAT
 A (H) C I Q P M P D P K R W F V D V G R Y Y 315
 AGAAACTTTGGTGGTCCTGAAGTTCAAAGAATAAACTTTACAAAATTGTTATACACCCATCT
 R N F G G P E V Q R I K L S Q I V I H P S 336
 TACAATAAAAAAATTTACGCCAATGACATAGCACTGTTACGTCTACAACTCCAGCTAATTTA
 Y N K K I Y A N (D) I A L L R L Q T P A N L 357
 GATAATCGTCAGGTACGACTTTCTCCAGTTCCACGTAATCCTCATTATTTCGATTTATTAACA
 D N R Q V R L S P V P R N P H L S D L L T 378
 GATAATGTTTCAGTGCATGGTTCGCTGGTTGGGGAGATACACATAATACAGGTTCAAATGATGTC
 D N V Q C M V A G W G D T H N T G S N D V 399
 TCAAGACAAGCAGTTCTTCTCCTGTCATTAATTATGATCTTTGCAAATCATGGTATCAATATCTT
 S R Q A V L P V I N Y D L C K S W Y Q Y L 420
 AATAAAGCAAGCTTTTGTGCTGGATACAAACAACGAGGAATTGATGCTTGCCAAGGTGATAGT
 N K A S F C A G Y K Q R G I D A C Q G D (S) 441
 GGGGGTCTCTATTGTGTTACGTTGGGGGTTCAAACAGTTCAAGCTGGAATTGTATCATGGGG
 G G P L L C Y V G G S N S S S W N C I M G 462
 AAACGATTGTGCAAAACCAGGAATCCGGGAGTTTATACTAATGTGGCTATGTTTTCTGACTGG
 K R L C K T R N P G V Y T N V A M F S D W 483
 TATTCAAGTTTTTTGTAA
 Y S S F L Stop 489

A		▼	
<i>MpKLK</i>	ARIVGGTNSLGEWPQVSLQVKLVSONHMCSSIIIGRQWVLTAAHCFDGIYPDPVWRIYGGILNL		454
	:R:V.G :: G.W:. VSL: . : .H:C:GS:I: QWV:TAAHC:: :P P. W : G		
<i>SmSP1</i>	GRVVGQPAPKGAWAFIVSLRFS-GNGGHVCAGSLISAQWVMTAAHCIQMPDPKRWFDVVGRYYR		316
<i>MpKLK</i>	SEITKETPSSRIKELIIHQEYKVSEGNVDIALIKLQTPLNYTEFQKPIC-LPSKADTNTIYT---		515
	: . E... :::::IH..Y: . . DIAL::LQTP N :: Q ... :P::: ::: T		
<i>SmSP1</i>	NFGGPEVQRIKLSQIVIHPSYNKKIYANDIALLRQLTPANLDNRQVRLSPVPRNPHLSDLLTDNV		381
<i>MpKLK</i>	NCWVTGWGYTKERGETQNILQKATIPLVPNEECQKKYRDYVINKQMICAGYKEGGTDACKGDSGGP		581
	:C V:GWG T.: G :::: :A.:P:: : C:. Y :Y NK. :CAGYK: G.DAC:GDSGGP		
<i>SmSP1</i>	QCMVAGWGDTHTNG-SNDVSRQAVLPVINYDLCKSWY-QYL-NKASFCAGYKQRGIDACQGDSGGP		444
<i>MpKLK</i>	LVCKHSGRWQLVGITSWGEGCARKEQPGVYTKVSEYIDW		620
	L:C :G. G. .. :PGVYT:V: : DW		
<i>SmSP1</i>	LLCYVGGSSNSSSWNCIMGKRLCKTRNPGVYTNVAMFSDW		483
B		▼	
<i>Hu FI</i>	KRIVGGKRAQLGDLPWQVAIK--DASGITCGGIYIGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTFVDWIHP		384
	R:V.G:.A. G. .. V::: :..G .C.G I.. W..TAAHC... .. W . V.. ..		
<i>SmSP1</i>	GRVVGQPAPKGAWAFIVSLRFSGNGGHVCAGSLISAQWVMTAAHCIQMPDPK--RWFDVVGRYYR		316
<i>Hu FI</i>	DLKRIVIEYV--DRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSTPACVPWSPYLFQPNDC		449
I..H :YN .Y.NDIAL: :::N :: :S : P : L: N C		
<i>SmSP1</i>	NFGGPEVQRIKLSQIVIHPSYNKKIYANDIALLRQLTPANLDNRQVRLSPVPRNPHLSDLLTDNVQC		383
<i>HU FI</i>	IVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLIS--NCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGDSGGPLVCM		514
	:V:GWG : : :I: C...Y :: :K. CAG : :IDAC:GDSGGPL:C		
<i>SmSP1</i>	MVAGWGDTHTNGSNDVSRQAVLPVINYDLCKSWY--QYLNKASFCAGYKQRGIDACQGDSGGPLLCY		448
<i>HU FI</i>	DANNVTYVWGVVSWGENCCKPEFPGVYTKVANYFDWIS		552
	:: : :W. : .:C:KP PGVYT:VA : DW S		
<i>SmSP1</i>	VGGSSNSSSWNCIMGKRLC-KTRNPGVYTNVAMFSDWYS		485

Figure 15 : Alignement des séquences protéiques de *SmSP1* avec la kallikréine plasmatique de souris (A) et le Facteur I humain (B). Les homologies de séquence ne concernent qu'une partie du cadre de lecture ouvert de *SmSP1* (depuis aa 252) et les chaînes légères des deux sérine protéases. Le site potentiel de clivage libérant les deux chaînes est représenté par une flèche.

2.5.2 Autre homologie de séquence

La séquence complète du clone génomique d'environ 7kb (7184 pb) (séquence non présentée) a également été analysée. Ainsi, les cadres de lecture ouverts de plus de 150pb ont été comparés à la même banque de données de séquence protéique. Aucun autre cadre de lecture ne présentait des homologies significatives, néanmoins le cadre de lecture de 489 aa présenté en figure 14 a révélé la présence d'une séquence intéressante 165 pb avant l'arginine évoquée précédemment. Cette région (position en aa 199 à 266) présente des homologies significatives avec les séquences répétées du domaine extracellulaire du récepteur LDL (Low Density Lipoprotein) (Yamamoto *et al.*, 1984) (figure 16). Cette structure, composée de 6 résidus cystéine présents dans une région consensus, est répétée 8 fois dans le domaine extracellulaire du récepteur LDL et est également présente dans d'autres protéines telles que certains composants du complément, le C9, le C8 et le facteur I humain (Catterall *et al.*, 1987).

Une stratégie de PCR qui sera présentée dans le paragraphe suivant n'a révélé la transcription que du domaine correspondant à la « chaîne légère » de SmSP1 (cf. § 2.6). Ceci suppose donc la présence d'un intron (correspondant à la séquence depuis l'acide aminé 1 à 241) dont la séquence est soulignée dans la figure 14.

A

Numéro des résidus de la région NH₂-terminal du récepteur : LDL

1-38 -AVGDR-**C**-ERNE**FQ**CQD--**GKCI**SYKWVCDGSAECQ**DGSDES**
 41-81 T**CLS**VT-**C**-KSGD**F**SCGGRVNR**CI**PQFWRC**DGQVDCDNGSDEQ**
 82-120 G**CPPKT**-**C**-SQDE**F**RCHD--**GKCI**SRQFV**CD**SDR**DC**LD**GSDEA**
 121-159 S**CPVLT**-**C**-GPAS**FQ**CNS--**STCI**PQLWACDNDP**DCEDGSDEW**
 170-208 QGDSSP-**C**-SAFE**FH**CLS--**GECI**HSSWR**CDGGPDCCKDSDEE**
 209-247 N**CAVAT**-**C**-RPDE**FQ**CSD--**GNCI**HGSRQ**CDREYDCKDMSDEV**
 248-288 GCVNV**TL**CEGP**NKFK**CHS--**GECI**TLDKVCNMAR**DCRDWSDEP**
 291-322 ECGTNE-**C**-LDNNG**GS**---HVC--NDLKIGYECL**CPDG**----

Séquence consensus -C---T-C-----F-C---G-C**I**-----CD---DC-DGS DE-

SmSP1 del199 à 226 aaC--PTS**QCILKIWR**CDGFSDC-SGSEDEI
 NC

B

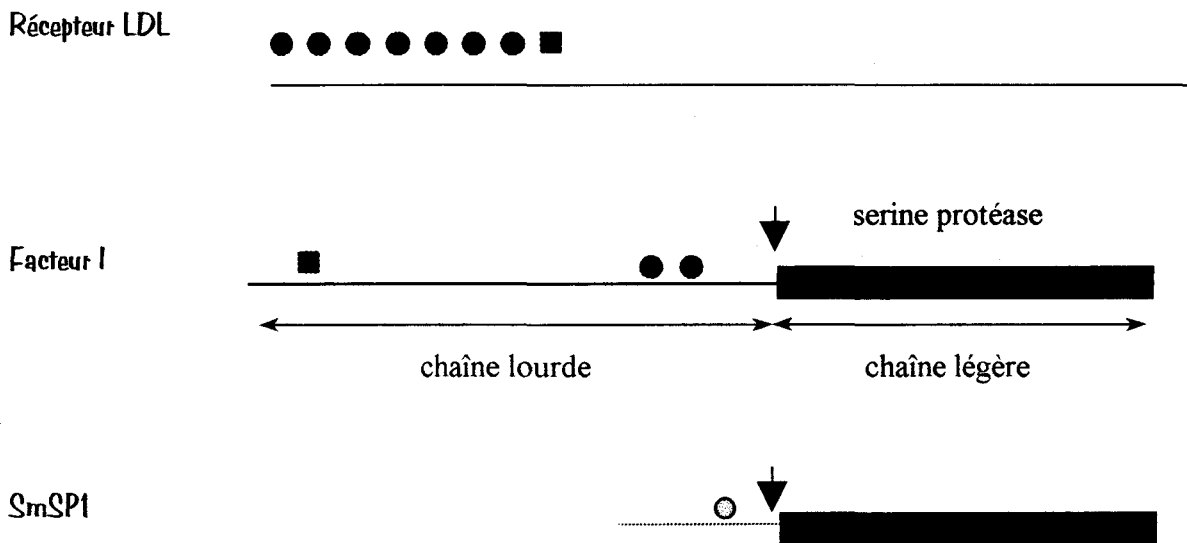


Figure 16 : A : Séquences répétées du domaine NH₂-terminal du récepteur LDL et séquence consensus. Les 7 premières séquences représentent les séquences de classe A et la dernière séquence (291-322) moins conservée constitue la classe B. Le domaine (199 à 226) de SmSP1 est présenté en dessous, les acides aminés conservés par rapport à la région consensus sont en gras.

B : Représentation schématique des homologies entre le récepteur LDL, le facteur I et SmSP1. (●) représente les domaines de classe A et (■) le domaine de classe B. Le rectangle noir correspond au domaine catalytique de type sérine protéase.

Comme l'indique la figure 16, une des seules protéines à présenter un domaine catalytique de type sérine protéase au côté de domaine que l'on nommera LDL-like est le facteur I. Or selon la figure 15, le domaine codant pour le site catalytique de SmSP1 est déjà homologue à la chaîne légère du facteur I. De plus, SmSP1 présente en amont de ce domaine catalytique une séquence LDL-like également retrouvée sur la chaîne lourde du facteur I.

2.6 Détection par RT-PCR des domaines effectivement transcrits

Devant les intéressantes homologies présentées précédemment, nous avons voulu dans un premier temps nous assurer de la présence effective d'une protéine facteur I-like chez le schistosome. Aussi, nous nous sommes intéressés au produit de transcription, pour cela nous avons synthétisé des oligonucléotides (tableau 14) spécifiques d'une part du domaine LDL-like (LDL3) ou d'autre domaine (PC17) et d'autre part nous avons choisi un oligonucléotide (PC16) juste avant le codon STOP. La position des amorces est présentée dans la figure 14. La figure 17 présente les produits de RT-PCR réalisées sur des produits de transcription de vers adultes.

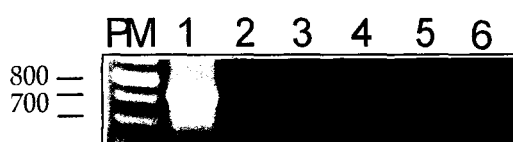


Figure 17 : Analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR sur ARN total de vers adultes. Les PCR ont été réalisées à l'aide des oligonucléotides PC17 et PC16 (piste 1), LDL3 et PC16 (piste 2), PC17 seul (piste 3), PC16 seul (piste 4), LDL3 seul (piste 5) et PC17 & PC16 sans matrice. En piste (PM) a été déposé un marqueur de taille d'ADN (échelle 100pb) (Pharmacia).

Ainsi, ces résultats montrent une absence de transcription du domaine LDL-like avec la chaîne légère de SmSP1, les trois oligonucléotides (LDL1 à 3) présents dans ce domaine ont été utilisés. Ce domaine n'est peut-être pas codant ou peut-être indécodable par cette

approche. La séquence transcrite débute au minimum à PC17, avant l'arginine (R), site potentiel de clivage.

Nous avons voulu nous assurer que la juxtaposition de ces deux domaines (LDL-like et sérine protéase) n'était pas le résultat d'une recombinaison au niveau du clone génomique. Ainsi, une PCR réalisée sur ADN génomique à l'aide des oligonucléotides LDL3 et PC16 nous a confirmé la contiguïté de ces deux domaines au niveau génomique (résultat non présenté).

2.7 Etude de réactivité croisée

Afin de confirmer au niveau immunologique les homologies de séquences protéiques présentées en figure 15, nous avons voulu tester en western blot, à l'aide du sérum anti-rSmSP1 (cf. § 3.2.2), la réactivité croisée qu'il existe entre la SmSP1 et une kallikréine pancréatique de porc. Le résultat présenté en figure 18 révèle, en effet, que l'antisérum dirigé contre la rSmSP1 est capable de reconnaître une kallikréine active purifiée confirmant ainsi les homologies de séquence précédemment obtenues et suggérant ainsi l'obtention d'une kallikréine-like chez *S. mansoni*.

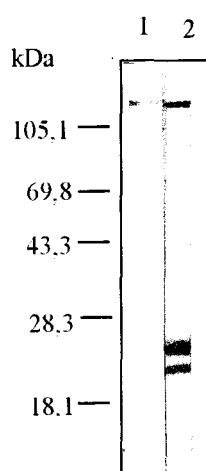


Figure 18 : Analyse en western blot de l'immunoréactivité du sérum anti-rSmSP1 (piste2) sur la kallikréine pancréatique de porc (1/500^e), en piste 1, immunoréactivité du sérum sain.

3. Etude de l'expression de la protéine native correspondant à SmSP1

L'expression de la SmSP1 au cours du cycle évolutif de *S. mansoni* fut dans un premier temps étudiée au niveau de l'expression de l'ARNm correspondant, puis dans un second temps au niveau de l'expression même de la protéine native.

3.1 Etude de l'expression de l'ARNm

3.1.1 RT-PCR

Des expériences de RT-PCR menées sur l'ARN de vers adultes et de cercaires ont été réalisées à l'aide des oligonucléotides PC3 et PC4 distants de 427pb. Ces amorces sont présentes sur la séquence codante de SmSP1 dans le domaine situé entre l'histidine et la sérine impliqués dans le site catalytique de la protéase. La figure 19 révèle la présence de l'ARNm correspondant à SmSP1 aux deux stades étudiés. Le séquençage de ce fragment a confirmé la séquence initialement obtenue.

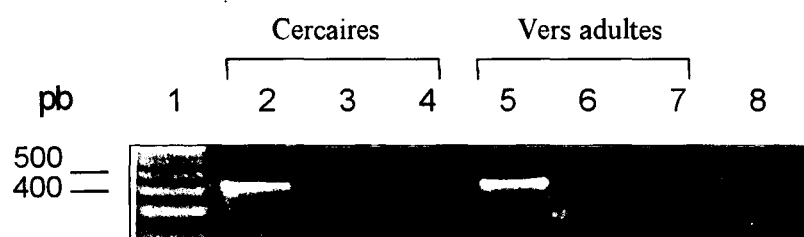


Figure 19 : Analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR menées sur l'ARN total de cercaires (pistes 2 à 4) et de vers adultes (pistes 5 à 7) à l'aide d'oligonucléotides spécifiques PC3 et PC4. Dans chaque cas, la PCR a été réalisée avec les amorces 5' et 3' (pistes 2 et 5), avec l'amorce 3' seule (pistes 3 et 6), avec l'amorce 5' seule et avec les deux amorces en absence de matrice dans la piste 8. En piste 1 a été déposé un marqueur de taille (échelle 100 pb) (Pharmacia).

3.1.2 Northern blot

Par northern blot, nous voulions déterminer la taille exacte de l'ADNc, malheureusement malgré les nombreuses tentatives effectuées, nous n'avons jamais pu mettre en évidence la présence du transcrite même sur ARNm purifié (5 μ g) (figure 20A). Notre contrôle positif utilisant une sonde d'ADNc codant pour la Sm28GST (figure 20B) révèle que l'ARNm n'est pas dégradé. Ce résultat suggère donc la sous-représentativité de l'ARNm correspondant à SmSP1 et permet d'expliquer les multiples échecs obtenus lors de criblages de banques d'ADNc (cf. § 2.2).

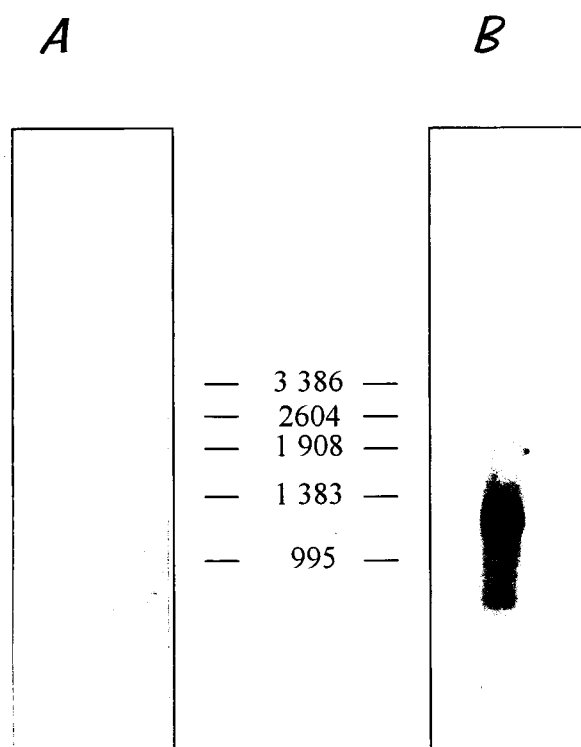


Figure 20 : Northern blot sur ARNm de vers adultes de *S. mansoni*. Sonde codant pour *SmSP1* (A) et contrôle positif, sonde *Sm28GST* (B).

L'ARNm correspondant à SmSP1 fut donc détecté par RT-PCR aux stades adulte et cercaire. Qu'en est-il de la protéine native ?

*3.2 Etude de l'expression de la protéine native au cours du cycle évolutif de *S. mansoni**

Pour étudier l'expression de la protéine native correspondant à SmSP1 au cours du cycle de *S. mansoni*, il nous fallait disposer d'un antisérum dirigé contre la protéine recombinante, lequel nous servira à appréhender par différentes approches l'expression de la protéine native au cours du cycle évolutif de *S. mansoni*.

3.2.1 Expression de protéines recombinantes

Ainsi, nous avons exprimé la SmSP1 recombinante dans différents systèmes : *E. coli* et cellules d'insectes.

*✓ Expression de la protéine recombinante partielle ou rSmSP1 en *E. coli**

La protéine recombinante correspondant à SmSP1 (rSmSP1) correspond au fragment de 467 pb dont la séquence est présentée en figure 9. La figure 21 représente une analyse sur SDS-PAGE de l'expression de la rSmSP1 exprimée en *E. coli* en vecteur pQE30, migrant à environ 22kDa. L'expression de la protéine recombinante est induite par l'IPTG (piste 2) ; le produit obtenu après purification a été déposé en piste 3. La protéine recombinante se trouve dans les corps d'inclusion de la bactérie, ce qui a nécessité une solubilisation en conditions dénaturantes et une renaturation de la protéine recombinante par dialyses séquentielles en présence de SDS 0.02% dans la dernière étape. Le rendement moyen de production de la protéine recombinante est de 4mg/l de culture bactérienne.

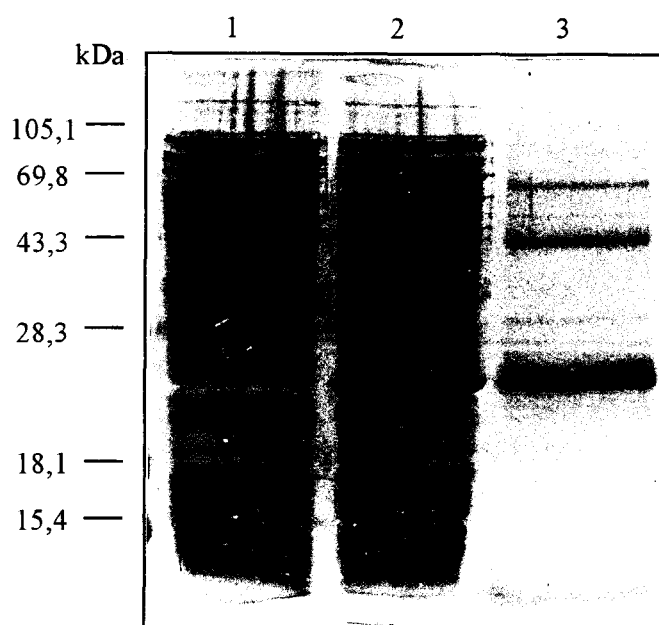


Figure 21 : Analyse sur SDS-PAGE de l'expression de la SmSP1 recombinante (rSmSP1) en vecteur d'expression pQE 30. (1) culture d' E. coli non induite, (2) culture induite par l'IPTG, (3) protéine recombinante purifiée.

✓ Expression de la « chaîne légère » de SmSP1 en cellules d'insectes

Les études comparatives des séquences primaires et secondaires laissant supposer que la « chaîne légère » contiendrait tous les éléments nécessaires au repliement correct de la protéine afin d'obtenir une activité enzymatique, nous avons alors décidé de l'exprimer en cellules d'insectes. Cette chaîne légère code pour le site catalytique de l'enzyme, aussi nous avons exprimé la protéine à partir de l'arginine (R), site potentiel de clivage, jusqu'au codon STOP (figure 14). Pour ce faire, nous avons choisi des oligonucléotides spécifiques de ces régions en insérant un site de restriction de manière à sous cloner le fragment de façon directionnelle. Ainsi, une RT-PCR a été réalisée sur ARN totaux de vers adultes à l'aide des amorces BPC24 et SPC16, le fragment digéré par les enzymes *Bam* HI et *Sma* I a été ensuite sous cloné dans le vecteur pAcGP67, B digéré par ces mêmes enzymes.

Les cellules sont alors co-tranfectées avec le plasmide recombinant et l'ADN viral. Après deux tentatives de clonage, la protéine est très faiblement détectée par ELISA même après amplification virale. La protéine est également faiblement présente dans le lysat

cellulaire. Aussi, nous n'avons pu mener à bien ce projet dont nous espérions l'obtention d'une protéine recombinante active. Néanmoins, un phénomène intéressant a été observé. En effet, après 5 jours (J5) d'infection, les cellules ne semblent pas très infectées mais de plus, se sont très fortement multipliées, alors qu'un arrêt de la prolifération cellulaire est habituellement observé dans le cas de cellules infectées (Baculovirus expression vector system, Pharmingen).

3.2.2 Obtention d'un antiserum dirigé contre rSmSP1 et purification d'IgG spécifique

La protéine recombinante partielle ou rSmSP1 purifiée a été injectée à des animaux dans le but d'obtenir un antiserum. En dépit de nombreuses tentatives sur le lapin et malgré différents modes d'administration (sous-cutanée ou intra-ganglionnaire) ainsi que les multiples rappels effectués, aucun des trois lapins ne donna de résultat satisfaisant. C'est à dire qu'aucun des antisérums obtenus, capables néanmoins de reconnaître la protéine recombinante, ne donnaient de résultat satisfaisant sur des extraits d'antigènes de *S. mansoni*.

En revanche, les rats utilisés donnèrent, après de nombreux rappels (5 rappels tous les quinze jours) un antiserum satisfaisant capable de reconnaître une protéine native sur des extraits d'antigènes de *S. mansoni*. La figure 22 présente le résultat d'un test en Western blot d'un antiserum de rat sur la protéine recombinante purifiée (figure 22A) et sur un extrait d'antigènes totaux de vers adultes de *S. mansoni* (figure 22B). La protéine native correspondante présente un poids moléculaire d'environ 35kDa.

Cet antiserum sera par la suite utilisé pour les techniques d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation ainsi que pour la purification d'IgG spécifique nécessaire au test ELISA.

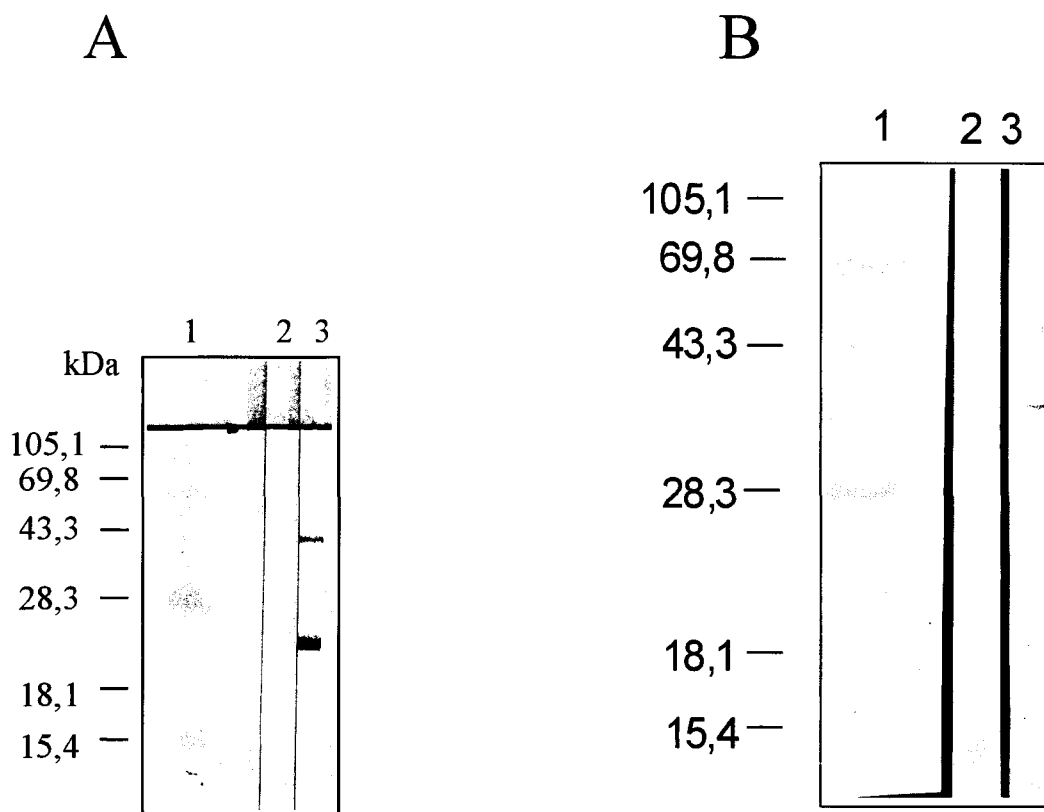


Figure 22 : Analyse en Western blot de l'immunoréactivité du sérum anti-rSmSP1 (piste 3) ou du sérum de rat sain (piste 2) au 1/500^e sur la protéine recombinante purifiée (A) et au 1/100^e sur un extrait d'antigènes totaux de vers adultes (B). En piste 1 sont déposés des marqueurs de poids moléculaires (Gibco).

*3.2.3 Etude de l'expression de la protéine native au cours du développement de *S. mansoni**

L'étude de l'expression de la protéine native correspondant à SmSP1 au cours du développement du parasite a déjà été abordée dans un premier temps au niveau de l'expression de l'ARNm ; dans ce paragraphe l'étude de l'expression de la protéine sera entreprise.

Dans la figure 22, nous mettons déjà en évidence l'expression de la protéine au stade adulte. La mise au point d'un test par immunocapture ELISA a permis de compléter cette étude en analysant l'expression à d'autres stades du cycle évolutif. Dans ce système, une courbe standard établie avec la rSmSP1 purifiée permet d'évaluer les quantités de protéines au sein de préparations antigéniques par mg de protéines totales ou par ml de surnageant de culture de schistosomules (SRP). La figure 23 illustre les quantités de protéines natives correspondant à SmSP1 détectées à chaque stade de développement du parasite.

Ainsi, par ces approches, nous mettons en évidence la présence de la protéine native correspondant à SmSP1 dans chacun des stades étudiés (figure 23C) avec une concentration maximale au stade schistosomule. La concentration est plus importante dans les schistosomules cultivés 3h et décroît après 18h. La figure 23B illustre la présence de la protéine dans le surnageant de culture des schistosomules laissant ainsi supposer l'excrétion/sécrétion de la protéine native, la concentration décroît également après 18h d'incubation.

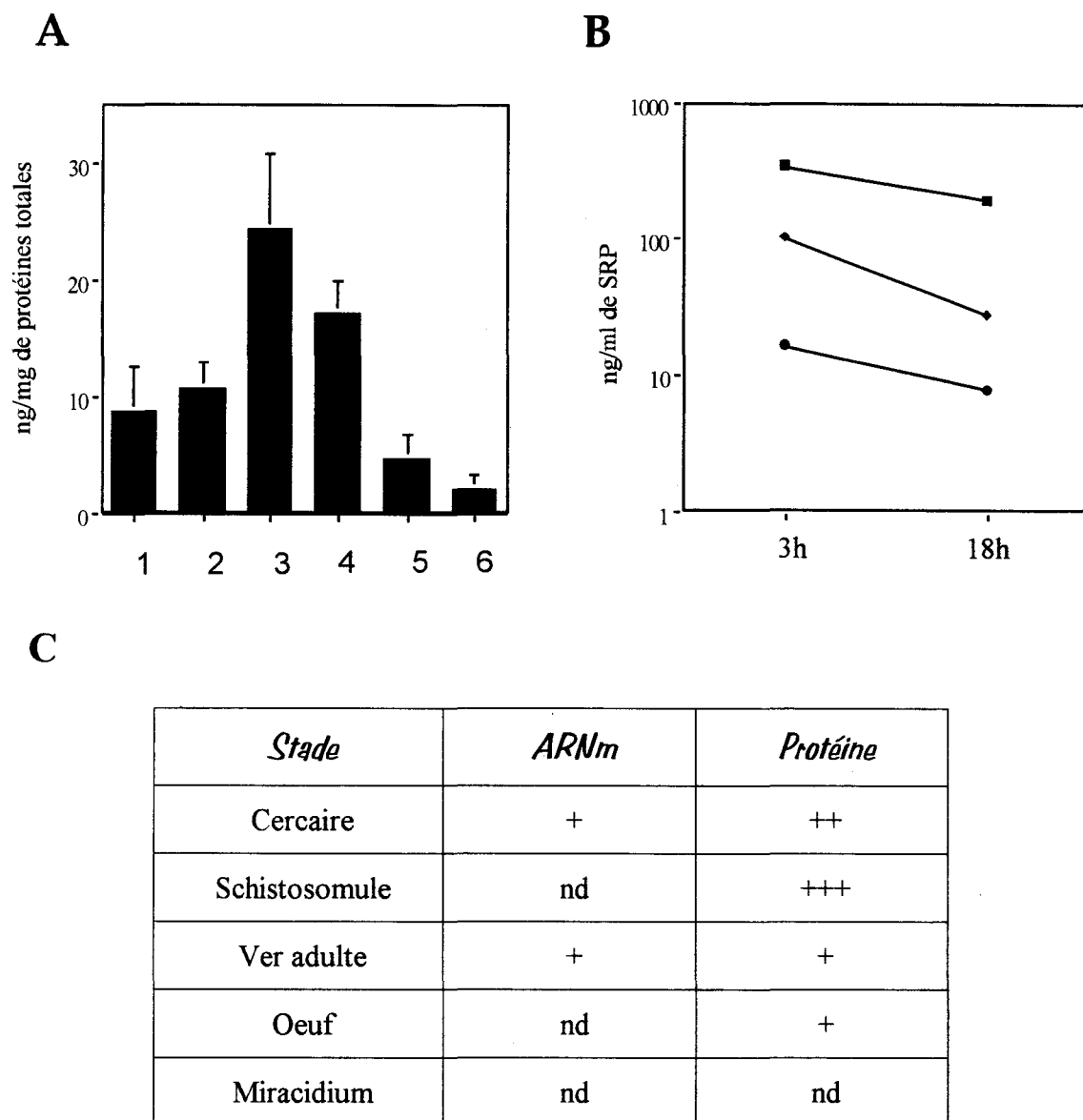


Figure 23 : Etude de l'expression de la protéine native correspondant à SmSP1 au cours du développement de *S. mansoni*.

A : Analyse en ELISA immunocapture du profil représentatif des quantités de protéines en ng/mg de protéines totales d'œufs (1), de cercaires (2), de schistosomules 3h (3) ou 18h (4) et de vers adultes femelles (5) ou mâles (6).

B : Analyse en ELISA immunocapture profil représentatif de la quantité de protéine en ng/ml de SRP testé sur trois lots de cultures différentes présentant un nombre variable de parasites : 27 500/ml (■), 15 000/ml (◆) and 8 500/ml (●).

C : Tableau récapitulatif de l'étude de l'expression de la protéine native au niveau de l'expression de l'ARNm et protéique (nd : non déterminé).

3.2.4 Marquage métabolique

La réalisation d'un marquage métabolique de vers adultes, suivi d'une immunoprécipitation grâce à l'antisérum anti-rSmSP1 (figure 24), a permis dans un premier temps de confirmer la présence de la protéine, qui présente également un poids moléculaire d'environ 35kDa, à ce stade de développement. De plus, cette approche permet de conclure quant à une néosynthèse de l'enzyme par le ver adulte maintenu en culture *in vitro*. Enfin, l'utilisation de NP40, détergent capable de libérer les protéines de surface du parasite laisse supposer que chez le ver adulte la protéine correspondant à SmSP1 peut être une protéine de surface.

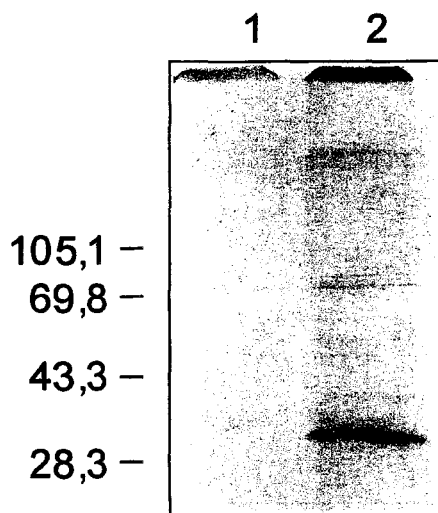


Figure 24 : Immunoprécipitation (IP) de protéines marquées au ^{35}S de vers adultes de *S. mansoni* à l'aide de l'antisérum anti-rSmSP1 (piste 2). En piste 1 est présenté le résultat d'une IP à l'aide d'un sérum sain.

3.2.5 Immunolocalisation de la protéine native chez le ver adulte

L'identification, pour la première fois, d'une sérine protéase au stade adulte nous a interpellés, aussi nous avons voulu par immunofluorescence connaître sa localisation afin de mieux appréhender sa fonctionnalité.

Ainsi, l'étude de la localisation de la protéine native par immunomarquage a révélé la présence de la protéine dans le parenchyme du ver ainsi que dans les épines dorsales du mâle (figure 25). Ces spicules ne sont en effet présentes que chez le mâle adulte et auraient un rôle dans les systèmes d'excrétion/échange vers le milieu extérieur. Cette observation permet de confirmer l'hypothèse émise dans le paragraphe précédent concernant la présence en surface de la protéine native correspondant à SmSP1.

On note, de plus, l'absence de marquage dans le tégument et dans les assises musculaires sous le tégument.

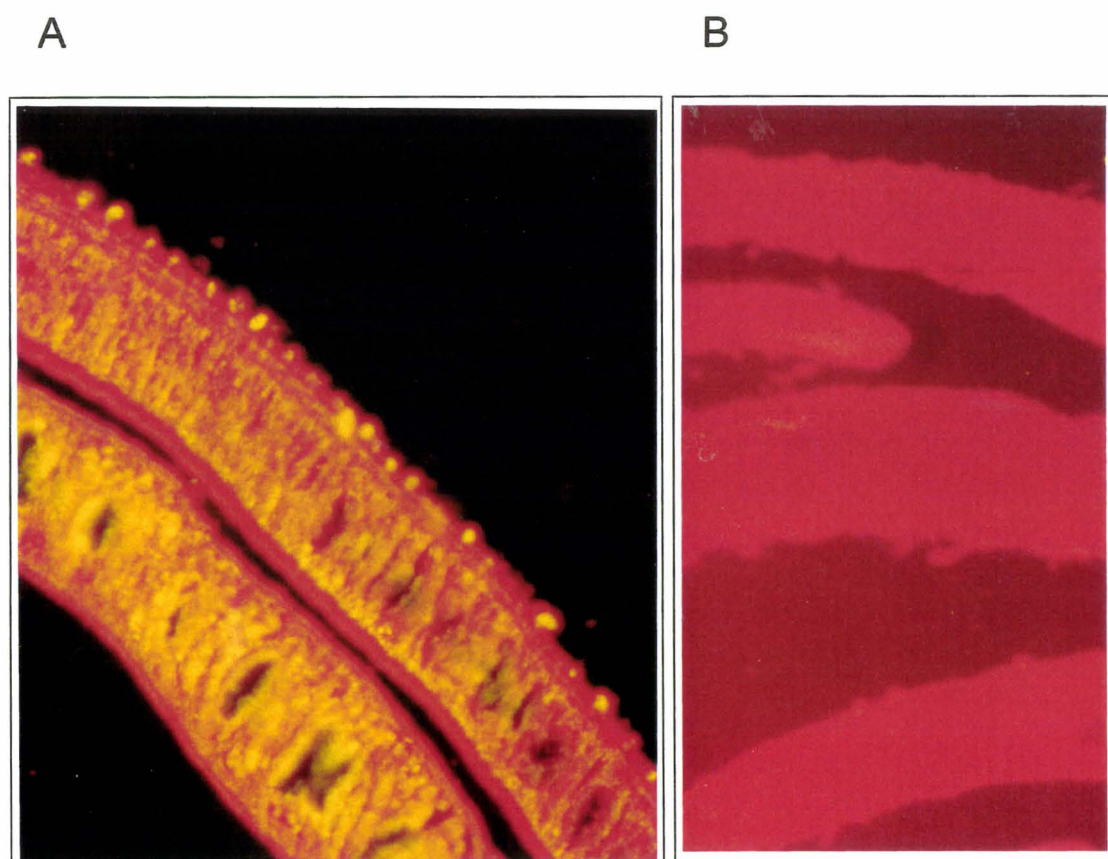


Figure 25 : Marquage par immunofluorescence (IF) de coupes de vers adultes de *S. mansoni*. En A, marquage par l'antisérum anti-rSmSP1 et en B, contrôle négatif à l'aide d'un sérum sain. (G x100)

3.2.6 Etude de l'antigénicité de la protéine native

Les études précédentes ont révélé la présence de la protéine native dans le SRP et en surface du ver adulte. Ces observations laissent suggérer que la protéine puisse être facilement aperçue par le système immunitaire de l'hôte et donc peut être ainsi devenir cible de la réponse immunitaire. Aussi, nous avons entrepris l'étude de l'antigénicité de la protéine native au cours d'infections expérimentales par *S. mansoni*. Nous avons suivi par ELISA direct la réponse humorale dirigée contre la protéine chez la souris, hôte permissif et chez le rat, hôte semi-permissif, infectés par *S. mansoni*. Les résultats ont montré une absence de réponse tout au long de l'infection primaire ou d'une réinfection (résultats non présentés). Des études complémentaires sur des souris infectées et traitées au praziquantel n'ont de même révélé aucune réponse humorale dirigée contre la protéine recombinante.

La protéine n'est peut-être pas visible par le système immunitaire, dégradée ou encore simplement non antigénique.

4. Mise au point de la purification de la protéine native correspondant à SmSP1

Possédant un antisérum capable de reconnaître une protéine dans des extraits protéiques de *S. mansoni*, nous avons alors décidé d'utiliser cet outil afin d'aborder la purification de la protéine native. La technique de purification choisie fut donc une chromatographie d'affinité à l'aide d'IgG spécifiques dirigées contre la rSmSP1. Pour ce faire, nous devons purifier les IgG totales à partir de l'antisérum anti-rSmSP1, puis isoler les IgG spécifiques par une chromatographie d'affinité afin de les fixer sur une matrice. Enfin, la chromatographie d'affinité a pu être réalisée à partir d'extraits totaux de vers adultes (SWAP pour Soluble Worms Antigen Preparation). Nous avons choisi d'isoler la protéine native à partir de ce stade de développement et ceci, en dépit de la faible quantité de SmSP1 détectée (figure 23), car l'antigène total de vers adultes est le plus facile à préparer en grande quantité.

4.1 Purification d'IgG spécifiques

La purification des IgG spécifiques de la rSmSP1 nécessite la fixation au préalable de la protéine recombinante sur une matrice. Ainsi, 2 mg de rSmSP1 purifiées (cf. § 3.2.1) sont fixés sur la colonne préactivée (NHS-Hydroxysuccinimide-ester), la fixation étant assurée par liaison amide stable. Puis, les IgG totales (5mg), préparées à l'acide caprylique (cf. § 2.4.2), contenant une faible quantité d'IgG spécifique de la rSmSP1 sont passées sur la colonne afin d'isoler les IgG spécifiques.

Malheureusement, la quantité d'IgG spécifiques obtenue, dont la qualité a été testée en ELISA direct, est trop faible (35 µg) pour permettre leur fixation sur une matrice

préactivée. Ce problème peut s'expliquer par la faible quantité de protéine recombinante fixée sur la colonne. En effet, la quantité de rSmSP1 fixée était de 2mg et la concentration préconisée par le fabricant est de 5mg/ml.

Aussi, nous avons décidé de fixer directement les IgG totales sur différentes matrices afin de réaliser la chromatographie d'affinité finale, en effet, les étapes de purification d'IgG spécifiques induisent une perte importante d'IgG dont nous ne pouvions nous satisfaire.

4.2 Couplage des IgG, préparation des matrices

Deux matrices ont été utilisées, la première assure une orientation préférentielle des IgG sur les billes, nécessaire à la chromatographie d'affinité. En effet, la liaison de l'anticorps à la matrice est assurée par l'intermédiaire des sucres de la chaîne lourde. Le traitement par le périodate assure l'oxydation des sucres et conduit à la formation de groupement qui réagiront avec l'hydrazide de la matrice activée pour donner une liaison stable. Le second couplage permet une fixation des IgG sur une matrice préactivée.

4.2.1 Couplage des IgG activées par le périodate

500µl d'IgG à 3.5 mg/ml sont mis en contact avec le périodate (Na_2IO_4 , sodium m-periodate). Puis la solution a été dessalée et dialysée contre un tampon (Ac Na 60mM pH 4.6). Les différentes étapes de dessalage et de concentration nous ont fait perdre 1/4 des IgG. Ainsi, 750µg d'IgG ont été mis en contact avec la matrice Hydrazide, préalablement équilibrée, pendant 6 heures à température ambiante sous légère agitation. Après incubation, la DO à 280 nm a été prise et a révélé la fixation d'une faible quantité d'IgG soit 30%. La colonne a été ensuite lavée en Tris HCl 0.1M pH8.

Ce faible pourcentage de couplage nous a conduits à entreprendre une autre stratégie.

4.2.2 Couplage des IgG sur Sépharose activée

La matrice est reconstituée en tampon phosphate 0.5M pH 7.5, 600µl de ce gel ont été mis en contact avec 3mg d'IgG totales. Après 3 heures d'incubation à température ambiante sous légère agitation, la DO est prise et a révélé la fixation de 75% des IgG. Aussi, la matrice a été lavée 2 fois en tampon phosphate 0.5M pH 7.5 puis une fois en tampon phosphate + 1M NaCl pH 7.2. Les groupements NHS-ester encore libres ont été bloqués par addition de 10 fois le volume d'ethanolamine pH8 à température ambiante sous légère agitation pendant 2 heures. Après deux lavages en PBS, la matrice est conservée en PBS, 0.01% merthiolate.

4.3 Réalisation de la chromatographie d'affinité

4.3.1 Contrôle de la qualité des matrices

La qualité des deux matrices a été testée vis à vis de la rSmSP1. Après incubation avec la protéine recombinante, différentes éluions ont été réalisées et les produits obtenus sont analysés sur SDS-PAGE 15%.

La colonne, sur laquelle ont été fixées les IgG préactivées au périodate, n'a donné aucun résultat satisfaisant.

L'essai réalisé sur la colonne activée (CNBr) a révélé une absence d'éluion à 0.5M NaCl et à pH 4.6, alors qu'à pH3, la protéine recombinante est bien éluee (résultat non présenté). Ceci laisse supposer une bonne affinité de l'anticorps vis à vis de la rSmSP1. Aussi, nous avons pu utiliser cette matrice afin de purifier la protéine native à partir d'extraits solubles de vers adultes (SWAP pour Soluble Worms Antigens Preparation).

4.3.2 Passage des extraits de vers adultes sur la colonne d'affinité

La première tentative a été réalisée sur 8 mg de SWAP, l'analyse des résultats sur SDS-PAGE a révélé l'élution spécifique d'une protéine migrant vers 35kDa à pH3 (figure 26). Une analyse en ELISA direct confirma la reconnaissance spécifique de la protéine éluee par les IgG anti-rSmSP1. L'élution à pH3 confirme la bonne affinité des IgG vis à vis cette fois de la protéine native. La protéine éluee migrant vers 35kDa, nous confirmons ainsi les résultats obtenus en western blot (figure 22B) et en IP (figure 24). La faible quantité de protéine éluee, estimée à 20ng, confirme la faible représentativité de la protéine native correspondant à SmSP1 déjà observée en Immunocapture-ELISA (figure 23A). Par la suite, une plus grande quantité de SWAP (110mg) a été déposée sur la colonne. L'analyse en SDS-PAGE a révélé un résultat identique avec néanmoins de nombreuses bandes contaminantes (résultat non présenté).

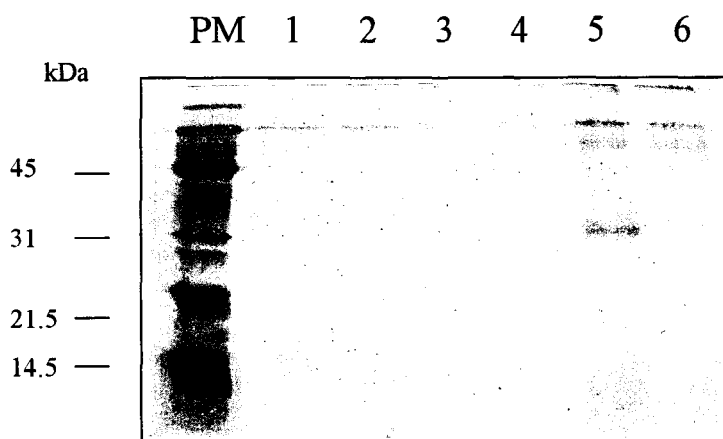


Figure 26: Analyse en SDS-PAGE 15% (coloration au nitrate d'argent) des éluats de la colonne d'IgG anti-rSmSP1 après passage de 8mg de SWAP. Les Pistes 1 et 2 correspondent aux éluations en PBS + NaCl 500mM, les pistes 3 et 4 aux éluations à pH4.6 et les pistes 5 et 6 aux éluations à pH3. Les éluations ont été réalisées dans 500 μ l de chacun des éluants et concentrées 5 fois avant dépôt sur gel. En piste (PM) ont été déposés des marqueurs de poids moléculaire.

L'activité enzymatique de la fraction éluee à pH3, présentée dans la figure 26, a été évaluée sur différents substrats. Aucun des substrats utilisés n'a été dégradé par cette fraction.

5. Expression et caractérisation de l'élastase de *S. mansoni* produite en cellules d'insectes

L'élastase de *S. mansoni*, a été décrite chez la cercaire, forme larvaire infestante de l'hôte définitif (McKerrow *et al.*, 1985). Il s'agit d'une sérine protéase de 30kDa (proenzyme), la forme mature, dépourvue du peptide signal, est de 28kDa. L'élastase est sécrétée et agit en dégradant l'élastine de la peau, assurant ainsi la pénétration de la larve. Cette protéine intervient donc à une étape cruciale du cycle parasitaire et semble être un candidat de choix dans le cadre d'une stratégie de chimio- ou immunothérapie. Ainsi, Cohen *et al.* (1991) ont montré qu'un inhibiteur spécifique du site actif de l'élastase peut bloquer la pénétration des cercaires dans la peau. Dans le laboratoire des études complémentaires ont permis de mieux caractériser par des approches moléculaires et immunologiques l'expression « stade-spécifique » de cette protéase (Pierrot *et al.*, 1996). Les études concernant la potentialité de cette protéase en tant que modulateur de la réponse immune ont été gênées par une absence d'activité de l'enzyme recombinante. Aussi, nous nous sommes attachés au cours de ce travail à l'expression de l'élastase recombinante en cellules d'insectes et à la caractérisation partielle de l'activité enzymatique détectée. De nombreuses tentatives d'expression de l'élastase en *E. coli* ont, en effet, été réalisées, mais aucune n'a permis l'obtention d'une activité enzymatique. Plusieurs hypothèses ont été émises par Pierrot (1997) pour expliquer cette absence d'activité.

5.1 Détection de l'élastase recombinante

L'élastase mature a été initialement clonée dans un plasmide d'expression pQE30 (Pierrot *et al.*, 1996), le plasmide fut ensuite digéré par les enzymes *Bam* HI et *Sma* I afin de libérer l'ADNc codant pour l'élastase et sous-cloné de nouveau dans pAcGP67B. La co-transfection de ce plasmide avec l'ADN viral du baculovirus, de cellules d'insectes Sf9 a permis l'expression de la protéine recombinante. Ainsi, nous avons pu isoler un clone produisant l'élastase recombinante dans le surnageant de culture (150ng/ml), mais celle-ci est également présente au niveau intracellulaire malgré le système d'excrétion optimisée. La présence de l'élastase au niveau intracellulaire pourrait expliquer en partie la faible quantité excrétée dans le surnageant. La figure 27 représente une analyse en western blot de la présence de l'élastase recombinante dans le surnageant de culture par rapport au contrôle donné par les cellules saines, l'analyse en western blot sur le lysat cellulaire révèle également la présence de l'élastase (résultat non présenté). Des études complémentaires utilisant d'autres cellules d'insectes (High Five) n'ont pas permis un meilleur rendement comme nous l'attendions.

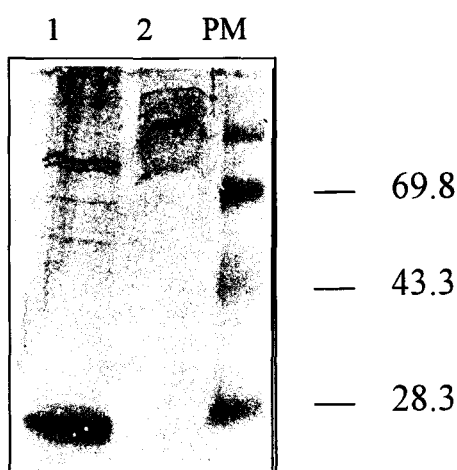


Figure 27 : Analyse en western blot de l'expression de l'élastase recombinante de *S. mansoni* par les cellules d'insectes Sf9. Immunoréactivité du sérum anti-élastase (1/100^e) sur un surnageant de cellules d'insectes transfectées (1) et un surnageant de cellules saines (2).

5.2 Etude de l'activité enzymatique de l'élastase recombinante, caractérisation de substrats dégradés

L'activité enzymatique a été testée à l'aide d'un substrat synthétique (Azocoll), dont la dégradation, libérant une coloration mesurable au spectrophotomètre (DO à 540 nm), est proportionnelle à l'activité enzymatique. Ce substrat a été utilisé lors de la caractérisation de la protéine native purifiée par McKerrow *et al.* (1985). L'activité enzymatique est donc testée sur l'Azocoll, la DO est mesurée de 6 à 24h. Les contrôles furent donnés par un surnageant de culture de cellules Sf9 saines et par un surnageant de culture de cellules, disponible dans le laboratoire, exprimant une protéine dont l'ADNc a été sous cloné dans le même vecteur. Le résultat révèle une dégradation du substrat par le surnageant de cellules Sf9 exprimant l'élastase dès 8 heures d'incubation, alors qu'aucune dégradation n'est observée par le surnageant de cellules saines ou exprimant une autre protéine.

D'autres substrats synthétiques ont été utilisés, malheureusement aucun des substrats décrits par Mc Kerrow *et al.* (1985) n'a été dégradé par le surnageant de culture exprimant l'élastase.

5.3 Caractérisation de l'activité enzymatique

L'analyse de l'influence de différents paramètres a été étudiée sur la dégradation de l'Azocoll, les mesures des DO ont été prises après 18h d'incubation.

5.3.1 Influence du pH

L'influence du pH a été testée par variation du pH du tampon glycine. Le résultat, présenté en figure 28, représente le % d'activité en fonction du pH, nous avons arbitrairement placé à 100% d'activité la DO maximale observée. Ainsi, l'on constate que l'activité augmente proportionnellement à l'augmentation du pH jusqu'à un maximum correspondant à un pH de 9.5 puis l'activité semble décroître.

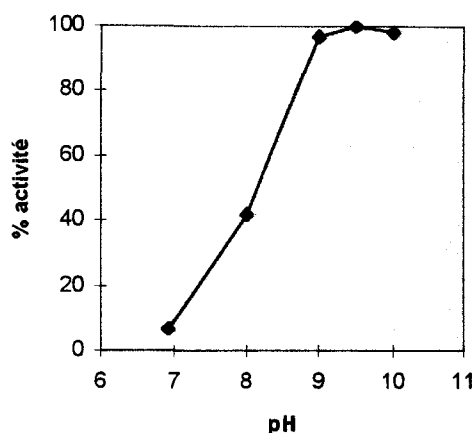


Figure 28 : Etude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique détectée dans le surnageant de culture de cellules d'insectes exprimant l'élastase recombinante. 500 μ l de surnageant exprimant l'élastase sont mis en contact avec 5mg d'Azocoll dans un tampon glycine dont le pH varie.

5.3.2 Influence d'inhibiteurs ou de chélateurs d'ions divalents

Des inhibiteurs spécifiques de sérine protéases ont été testés afin de vérifier la nature exacte de l'enzyme responsable de cette activité, ce qui confirmerait dans un premier temps que l'activité est bien spécifique de la classe de protéase qui nous intéresse, et non pas d'une autre protéase qui serait donc d'origine cellulaire. Ainsi, nous avons testé l'activité de l'élastase recombinante en présence de PMSF ou de p-aminobenzamidine libre. D'autre part, nous avons également incubé préalablement le surnageant de culture exprimant l'élastase sur une colonne sépharose sur laquelle est fixée la p-aminobenzamidine, le surnageant ainsi récupéré doit être dépourvu de toute activité sérine protéase.

Nous avons, dans un second temps, voulu confirmer la présence indispensable d'ions calciques préalablement décrite par Mc Kerrow *et al.* (1985), aussi nous avons testé l'activité en présence d'EDTA.

Ainsi, la figure 29 résume les différentes études réalisées, nous avons placé arbitrairement à 100% d'activité le résultat obtenu avec le surnageant de cellules exprimant l'élastase.

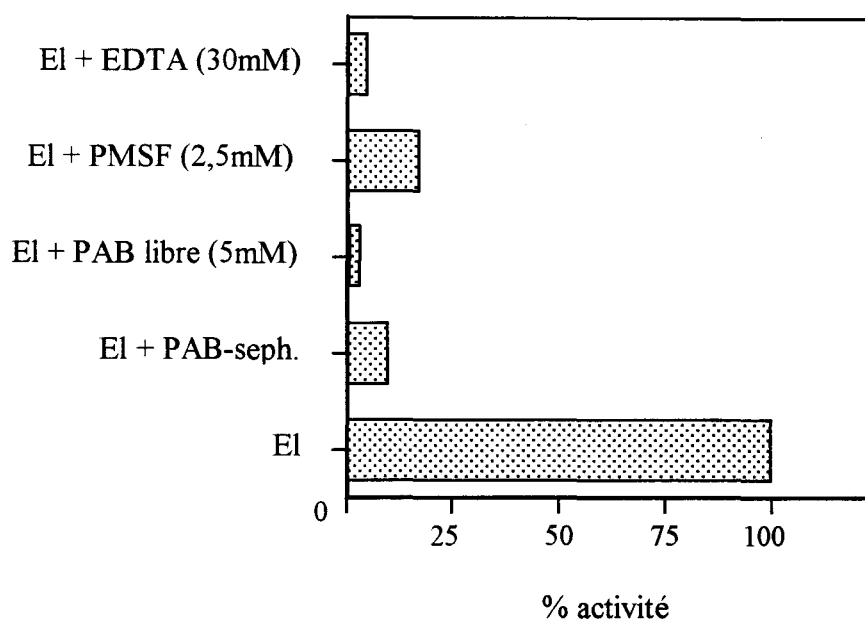


Figure 29 : Pourcentage d'activité du surnageant de culture de cellules d'insectes exprimant l'élastase (El) en présence d'inhibiteurs spécifiques de sérine protéases tels que PMSF (2.5mM) ou la p-aminobenzamidine (PAB libre 5mM), après passage du surnageant sur une colonne sépharose- p-aminobenzamidine (PAB-seph) ou en présence d'EDTA 30mM.

Nous constatons ainsi que l'activité est inhibée en présence d'inhibiteur de sérine protéase tels que le PMSF ou la PAB libre, l'activité est également absente après passage du surnageant au travers de la colonne PAB-séph, ce qui suggère non seulement que l'activité soit bien de type sérine protéase, de plus elle permet de conclure quant à un bon repliement tridimensionnel de la protéine puisqu'elle est reconnue par un inhibiteur spécifique. Des expériences complémentaires de western blot ont permis de confirmer que la protéine retenue par cette colonne était bien l'élastase de *S. mansoni* (résultat non présenté). Enfin, l'utilisation d'un chélateur d'ions divalent (EDTA) peut, en partie, laisser supposer que les ions calciques sont nécessaires à l'activité protéolytique observée.

5.3.3 Effet d'IgG anti-élastase recombinante sur l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été testée en présence d'IgG purifiées à partir du sérum de lapin (Pierrot *et al.*, 1996) dirigée contre l'élastase recombinante exprimée dans *E. coli*. Le résultat, présenté en figure 30, révèle non seulement l'activité neutralisante des IgG contre l'élastase recombinante produite en cellules d'insectes, mais montre également que l'activité protéolytique obtenue précédemment est spécifique de l'élastase produite par ces cellules.

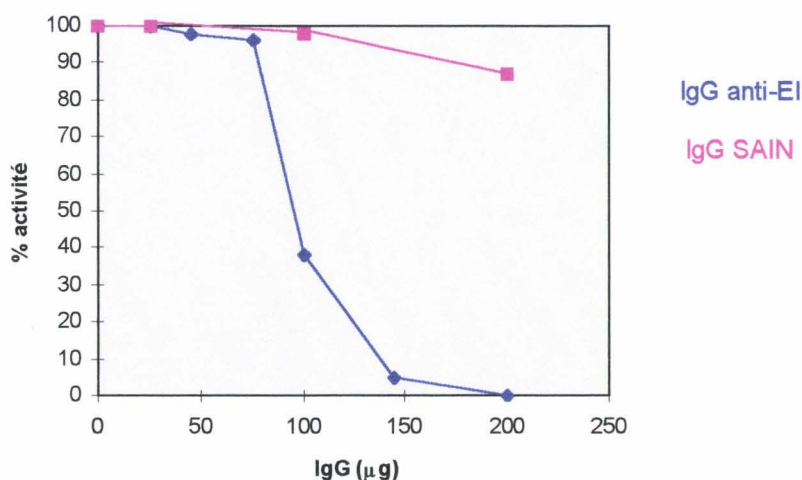


Figure 30 : Activité protéolytique du surnageant de culture de cellules d'insectes exprimant l'élastase recombinante de *S. mansoni* en présence d'IgG anti-élastase produite en système procaryote (*E. coli*) ou d'IgG de lapin sain.

5.4 Purification de l'élastase

Afin d'associer l'activité enzymatique à l'élastase de *S. mansoni*, il nous fallait purifier la protéine. Compte tenu de la faible production de l'élastase recombinante dans le surnageant de culture et ceci malgré le système d'excrétion optimisée, nous nous sommes intéressés à la protéine intracellulaire stockée en très grande quantité, afin de la purifier. Pour cela, nous avons utilisé une colonne d'affinité présentée précédemment, la PAB-

sépharose, dont nous nous sommes assurés, au préalable, de l'interaction avec l'élastase recombinante exprimée dans le surnageant (résultat non présenté).

D'importantes productions d'élastase ont donc été réalisées, les cellules ont été reprises dans un tampon de lyse et le lysat cellulaire a été passé sur la colonne (1ml) préalablement équilibrée dans un tampon (Tris HCl 50mM pH8). Après deux lavages en TrisHCl, NaCl 150mM ou 500mM, l'éluat est réalisée par compétition avec l'inhibiteur libre (10mM ou 30mM) dans un volume de 20 ml et l'éluat récupéré a été dialysé contre le même tampon afin de dissocier le complexe inhibiteur/protéase puis concentré.

Les différentes étapes ont été déposées sur SDS-PAGE 15% puis transférées sur nitrocellulose et révélées à l'aide d'un antisérum dirigé contre l'élastase. Le résultat présenté en figure 31 révèle que l'élastase intracellulaire n'a pas été retenue par la colonne (piste 3). Néanmoins en piste 4, on devine une bande correspondant à une faible quantité d'élastase, celle-ci se serait certes fixée à l'inhibiteur mais avec une faible affinité puisqu'elle est éluée en présence de NaCl. Ainsi, en pistes 6 et 7 aucune bande correspondant à l'élastase n'apparaît.

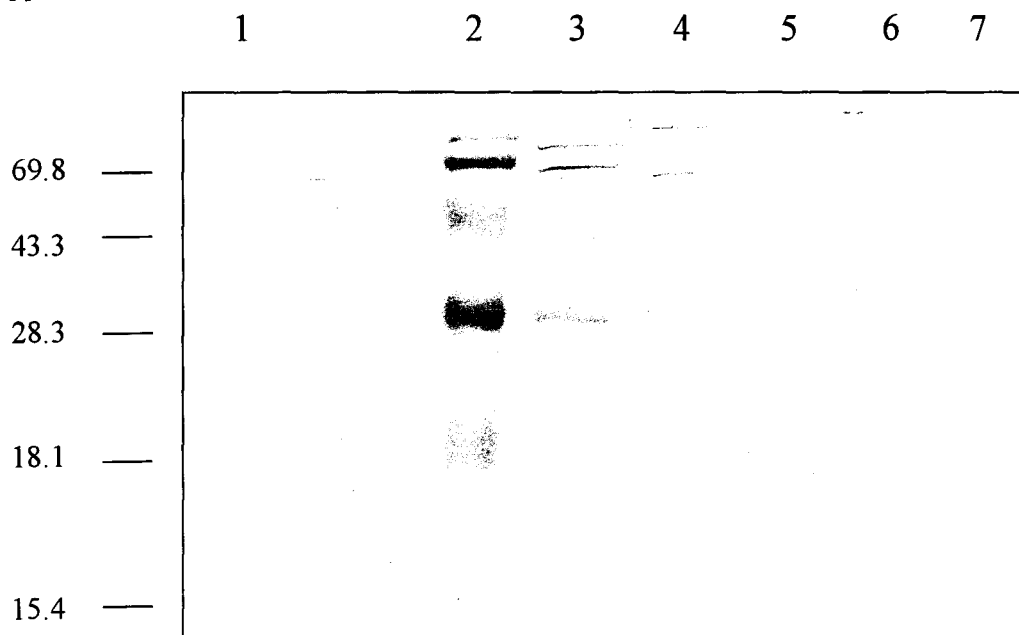


Figure 31 : Analyse en western blot des différentes étapes de purification de l'élastase (intracellulaire) recombinante de *S. mansoni*, exprimée en cellules d'insectes, par chromatographie d'affinité (p-aminobenzamidine-sépharose). Immunoréactivité du sérum anti-élastase (1/100^e) sur le lysat cellulaire avant passage sur la colonne (1) ou après passage (3), sur les lavages de la colonne en présence de NaCl 150mM (4) ou 500mM (5), ainsi que sur les éluats après une élution par l'inhibiteur libre à 10mM (6) ou 30mM (7).

*Discussion
et
Perspectives*

Chez *Schistosoma mansoni*, de nombreuses protéases ont été décrites mais peu sont complètement caractérisées. Elles apparaissent fondamentales dans l'accomplissement du cycle évolutif du parasite, dans l'échappement et la modulation de la réponse immune de l'hôte. C'est aux stades larvaires (cercaires et schistosomules) que l'on retrouve le plus de protéases de la famille des sérine protéases, l'autre famille la mieux représentée étant celle des cystéine protéases.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude de deux sérine protéases de *S. mansoni* : l'élastase, identifiée et caractérisée par McKerrow *et al.*, (1983; 1985) à partir de cercaire et une sérine protéase, nouvellement identifiée, au cours de cette étude.

✓ Nous avons, en effet, grâce à une stratégie de PCR, identifié un nouveau membre de la famille des sérine protéases de *S. mansoni* que nous avons caractérisé au niveau moléculaire et dont nous avons tenté la purification biochimique.

✓ Puis, nous avons exprimé l'élastase recombinante de *S. mansoni* en cellules d'insectes, ce qui nous a permis une caractérisation partielle de l'activité enzymatique observée.

Etude du gène codant pour la SmSP1

L'obtention d'un fragment codant pour le site actif d'une nouvelle sérine protéase de *S. mansoni* (ou SmSP1), nous a encouragés à caractériser cette enzyme. Le criblage de banques d'ADNc n'ayant donné aucun résultat satisfaisant, ce qui supposait d'ores et déjà une faible représentativité de l'ARNm, nous nous sommes alors tournés vers le criblage de banques génomiques de *S. mansoni*. Le séquençage complet d'un clone long de 7kb nous a permis de confirmer l'hybridation spécifique des amorces dégénérées et ainsi de mettre en évidence un cadre de lecture ouvert de 489aa. Celui-ci présente un codon STOP potentiel mais aucun ATG initiateur ne peut encore être défini. Néanmoins, il code potentiellement pour une « chaîne légère » exprimant l'activité catalytique d'une sérine protéase de *S. mansoni*.

Parmi les séquences non codantes de ce clone génomique, nous avons pu mettre en évidence, après comparaison des séquences nucléiques, des domaines homologues à des régions décrites lors d'identification de séquences répétées. Dans ce contexte, on estime à

60% de copies uniques le génome du schistosome, le reste étant attribué à la fraction répétée du génome parmi laquelle on distingue les séquences hautement et moyennement répétées. Une autre population d'éléments répétés, formés d'éléments transposables est également présente. Ces éléments transposables sont désignés comme des acteurs potentiels capables d'influencer l'évolution du génome (Kidwell, 1992).

La séquence présentant un cadre de lecture ouvert code pour une « chaîne légère » correspondant à un domaine sérine protéase complet qui serait libéré après clivage protéolytique, au niveau d'une séquence consensus retrouvée dans la SmSP1. La transcription de ce domaine a été confirmée par RT-PCR. Les sérine protéases présentant des homologies avec la SmSP1 sont, en effet, synthétisées sous forme d'une unique et longue chaîne polypeptidique inactive (zymogène) et sont activées après clivage protéolytique qui libère une chaîne lourde et une chaîne légère. Cette dernière code pour le domaine catalytique constitué par une triade d'acides aminés, l'histidine (H), l'acide aspartique (D) et la sérine (S). Chez *S. mansoni*, la seule sérine protéase caractérisée est l'élastase de cercaire (Newport *et al.*, 1988b; Pierrot *et al.*, 1995), elle comporte cette triade d'acides aminés mais n'est constituée que d'une seule chaîne car différente des enzymes évoquées précédemment. La SmSP1 identifiée et caractérisée au cours de ce travail, présente cette triade d'acides aminés contenus dans une séquence consensus.

Une étude a permis, de plus, après comparaison avec différentes sérine protéases dont les structures tridimensionnelles sont connues, de montrer que celle-ci contient les informations requises pour un bon repliement nécessaire à une activité protéolytique. En effet, les résidus entourant la triade d'acides aminés du site catalytique (His, Asp, Ser) sont très conservés, de même que de nombreux résidus glycine, proline et cystéine nécessaires à la formation de ponts disulfures.

En amont de cette chaîne légère, a été retrouvé un domaine LDL-like également décrit sur la chaîne lourde du facteur I. Par RT-PCR, nous n'avons pu identifier le produit de transcription correspondant. Ainsi, bien que ce domaine LDL-like soit codant, il ne semble pas transcrit, la juxtaposition de ce domaine au côté du domaine sérine protéase, plaide en faveur de la présence chez le schistosome d'une molécule ancestrale à une protéine mosaïque décrite chez les vertébrés. L'évolution des protéases impliquées dans la coagulation sanguine et la fibrinolyse a été largement décrit par Patthy (1985) et évoquée de manière plus générale par Doolittle *et al.*, (1985). Le facteur I, quant à lui, aurait reçu au

cours de l'évolution un domaine codant pour une activité enzymatique de type sérine protéase et un domaine présentant des séquences LDL-like retrouvées dans la région extracellulaire du récepteur LDL. Ainsi, peut-être a-t-on eu avant la dissociation arthropodes/vértébrés une première réorganisation des domaines qui ne se serait approfondie que chez les vertébrés?

L'obtention de la copie complète de l'ADNc aurait permis de répondre à la question, mais malheureusement la sous-représentativité de l'ARNm de même que celle de la protéine native correspondante ont clairement été démontrées.

Purification de la protéine native correspondant à SmSP1

La faible quantité de protéine obtenue lors de la purification de la protéine native en est la principale preuve. La purification de la protéine native a néanmoins permis de mettre en évidence une protéine d'environ 35kDa. La chromatographie d'affinité est une approche intéressante qui nous permettra la purification de la SmSP1 native afin d'apprécier son activité enzymatique. Néanmoins, il reste à optimiser quelques étapes fondamentales telles que la purification d'IgG spécifiques et l'immunogénicité de la protéine recombinante. Dans ce contexte, il faut rappeler qu'aucun des trois lapins utilisés ne donna d'antisérum suffisamment immun pour mettre en évidence une protéine native par western blot. Ainsi, les perspectives de cette étude concernent l'optimisation de l'immunogénicité en changeant de modèle animal (souris de différents haplotypes), ou encore tenter différentes voies et modes (adjuvant) d'administrations ou utiliser des peptides parfois plus immunogènes. La seconde étape à optimiser est la purification des IgG spécifiques de la rSmSP1, les problèmes rencontrés pouvant s'expliquer par la conformation de la protéine recombinante exprimée en *E. coli*. En effet, la protéine est exprimée dans les corps d'inclusion de la bactérie, des étapes dénaturantes (Guanidine 6M) sont nécessaires à la lyse des ces corps d'inclusions pour purifier la protéine. Puis, des dialyses successives contre des concentrations d'urée décroissantes permettent normalement une renaturation complète de la protéine. Cependant, à la dernière étape de dialyse, une grande partie de la protéine précipite et doit être solubilisée en présence de SDS 0.02%. Ainsi, la quantité de protéine soluble est non seulement trop faible pour l'élaboration d'une matrice, mais, de plus, la protéine, compte tenu des différentes étapes de solubilisation et de renaturation, peut

présenter une conformation tridimensionnelle non satisfaisante. Afin de contourner ce problème, nous avons décidé de fixer les IgG totales sur une matrice, ainsi, la mise au point de la purification de la protéine native a pu être abordée. Celle-ci nous a permis de montrer l'excellente affinité qu'il existe entre les IgG de rat anti-rSmSP1 et la protéine native correspondante puisqu'une élution à pH 3 est nécessaire à la dissociation du complexe. L'optimisation de chacune des étapes pourra peut-être nous permettre de prétendre à un meilleur rendement de purification de la protéine afin de la caractériser. La nature des substrats dégradés et de ses inhibiteurs facilitera la compréhension du rôle joué par cette protéase au cours d'une infection par *S. mansoni*.

Rôle de la SmSP1 ?

Celle-ci a été nommée SmSP1; elle aurait pu s'appeler kallikréine-like ou facteur I-like mais elle n'aurait valu son nom qu'à des homologies de séquence primaire sans aucun fondement quant à sa fonctionnalité. Est-ce une protéine intervenant dans les systèmes de cascades de la coagulation, du complément ou encore dans le système kallikréine-kinine, est-ce une protéine de surface ou une protéine excrétée/sécrétée? Les questions sont multiples, intéressées et intéressantes mais nous n'avons malheureusement encore aucune certitude quant à la fonction exacte de cette nouvelle sérine protéase. Néanmoins, des données expérimentales telles que la réactivité croisée entre l'antisérum dirigé contre la SmSP1 et une kallikréine pancréatique purifiée viennent conforter nos spéculations.

Les homologies de séquences de cette protéine concernent en effet, des sérine protéases impliquées dans les différents événements, rencontrés chez les vertébrés, cités précédemment. Fascinante adaptation du parasite que de synthétiser des enzymes capables d'interagir avec des systèmes de l'hôte aussi complexes, dans le but sans doute, de déjouer ces systèmes d'activation à ses dépens.

Les homologies observées soulèvent donc de nombreuses spéculations quant au rôle joué par la SmSP1 dans l'accomplissement du cycle évolutif du parasite, dans l'échappement ou la modulation de la réponse immune de l'hôte.

Parmi les multiples capacités de *S. mansoni* à contourner la réponse immune, nous citerons sa capacité à déjouer les mécanismes de résistance à la lyse par le complément (Marikovsky *et al.*, 1988b, 1990). Dans ce contexte, une sérine protéase de 28kDa

membranaire (Parizade *et al.*, 1990) a été décrite comme étant capable d'interférer avec ce mécanisme en assurant la lyse du C3, du C3b et du C3bi fixés à la surface des schistosomules (Marikovsky *et al.*, 1988a). Le C3bi est, d'autre part, le ligand du récepteur CR3 présent à la surface des cellules effectrices telles que les éosinophiles (Capron *et al.*, 1987), sa liaison assure l'adhérence entre les cellules effectrices et les schistosomules et favorise ainsi la lyse par activation des mécanismes cytotoxiques. Ainsi, son clivage assuré par une activité protéolytique permet aux schistosomules une forme d'échappement vis à vis d'une activité cytotoxique. Le schistosome immature est capable d'activer de multiples mécanismes dépendants du complément, la voie classique qui dépend de la présence d'anticorps spécifiques, la voie alterne et les mécanismes de cytotoxicité dépendante d'anticorps ou ADCC évoqués précédemment. Les cercaires et les schistosomules fraîchement préparés sont particulièrement susceptibles à ces attaques mais rapidement le schistosomule devient résistant. Il a été décrit que le jeune schistosomule était capable de fixer à sa membrane des protéines de l'hôte, ce qui pourrait expliquer les mécanismes d'échappement à la réponse de l'hôte. La capture de composants tels que le C1q (Santoro *et al.*, 1980) ou le C3b (Ouassi *et al.*, 1980), par des récepteurs identifiés à la surface du parasite, quelques heures après pénétration du jeune schistosomule, ont été largement étudiés.

La SmSP1, homologue au facteur I, vient conforter ces hypothèses de résistance et permet ainsi de mieux comprendre les mécanismes utilisés. En effet, le facteur I est un facteur à activité protéolytique de type sérine protéase, intervenant dans la régulation de l'activité du complément car il est capable de cliver le C3b et le C4b. Il assure le contrôle de l'activation du complément et permettrait ainsi au schistosome d'échapper aux mécanismes de lyse par le complément. Ces observations sont confortées par la localisation de la protéine en surface (du ver adulte) ou excrétée/sécrétée (par le schistosomule), donc capable d'interagir avec les composants du complément en surface ou autour du parasite. Différentes approches expérimentales telles que l'utilisation d'IgG anti-rSmSP1 ou d'inhibiteurs spécifiques nous permettraient d'évaluer *in vitro* l'intérêt d'une telle protéase dans la lyse du schistosomule par le complément.

Aux stades schistosomule-poumon et adulte, le parasite est complètement résistant à ces mécanismes de lyse, ceci peut s'expliquer par la perte du glycocalyx, surface activatrice du complément et aussi par le clivage des IgG fixées à la surface du schistosomule (Auriault *et*

al., 1980, 1981a, 1981b), ce qui entraîne la libération d'un peptide capable d'inhiber les fonctions cytotoxiques des macrophages (Auriault *et al.*, 1983, 1985). Ce clivage protéolytique de même que la modification biochimique de la surface du parasite sont assurés par des activités de type sérine protéase (Marikovsky *et al.*, 1988a), ainsi, ces observations laissent supposer que la résistance à certains mécanismes de défense de l'hôte est hautement contrôlée par ces enzymes.

La SmSP1 présente, d'autre part, des homologies avec une kallikréine plasmatique de souris, cette observation fut confortée par une réactivité immunologique croisée. Les conséquences d'une activation de la kallikréine sont complexes car cette dernière est impliquée dans un large spectre d'activités biologiques liées notamment au système kallikréine-kinine qui induit la libération de bradykinine. Celui-ci est un médiateur vasoactif et pro-inflammatoire qui assure une baisse de la pression sanguine locale et favorise l'œdème et le développement de fièvre résultant d'une vasodilatation et d'une augmentation de la perméabilité des petits vaisseaux. De plus, la kallikréine (KLK) est capable d'induire, via la libération de kinine, la libération de l'élastase stockée dans les granules de neutrophiles et assure la formation de radicaux libres (superoxyde et NO); par ailleurs elle induit l'activation du plasminogène et inhibe l'agrégation plaquettaire. La kallikréine, forme active dérivée du zymogène prékallikréine (PK), est constituée d'une chaîne légère laquelle code pour l'activité protéolytique et d'une chaîne lourde qui assure la liaison au substrat, le kininogène de haut poids moléculaire (HK, high molecular weight kininogen). Parmi les substrats de la KLK, il existe en effet, le HK, le facteur XII et la prourokinase. La régulation de l'activité de la KLK est encore mal connue, néanmoins, le C1-INH et l' α_2 -M sont capables d'interagir avec la chaîne légère pour inhiber l'activité protéolytique (Colman & Schmaier, 1990).

Que deviendrait alors le rôle d'une kallikréine-like chez le schistosome?

Serait-elle inductrice d'une réponse pro-inflammatoire qui serait alors nuisible au développement du parasite ou alors a-t-on ici un phénomène fascinant déjà évoqué chez *S. mansoni* (Capron *et al.*, 1996) témoignant d'une adaptation du parasite à son hôte, le phénomène de leurre de la communication. En effet, nous pouvons imaginer l'interaction de la kallikréine-like du schistosome avec les substrats de l'hôte sans activation du processus en cascade. La formation du complexe enzymatique pourrait avoir lieu, mais sans activation

protéolytique, qui pourrait être due à une conformation tridimensionnelle différente, ce qui conduirait à une interaction de type inhibitrice. Chez le schistosome, des interactions inhibitrices ont été largement évoquées dans le cas des sérine protéases avec leur inhibiteurs (Modha *et al.*, 1996). La localisation en surface de certains inhibiteurs tels que la Smpi56 assurent non seulement une protection du parasite vis à vis de l'activité cytotoxique de cellules effectrices car elle est capable d'interagir avec l'élastase de neutrophiles, mais elle est également capable d'assurer une protection de sa propre élastase en la rendant invisible au système immunitaire (Ghendler *et al.*, 1994). Nous pouvons ainsi imaginer une telle interaction pour la kallikréine-like du parasite dans un complexe enzyme/substrat plutôt que enzyme/inhibiteur.

En revanche, la kallikréine présente un intérêt dans la modulation de la réponse immune et plus particulièrement dans l'activation et la différenciation des cellules B. Dans ce contexte, un facteur kallikréine-like, désigné par GEF pour Glycosylation Enhancing Factor peut induire, via d'autres facteurs, la différenciation des cellules B mémoires productrices d'IgE (Ishizaka, Iwata & Ishizika, 1985). De plus, la kallikréine peut présenter une activité modulatrice du récepteur ϵ (ϵ RMP pour ϵ receptor modulating protein) qui induit alors une augmentation d'IgE et d'IgG1 par les cellules B stimulées (Matsushita & Katz, 1993). Ces observations ajoutées à celles rapportées par Verwaerde *et al.* (1986 ; 1988) montrant que les sérine protéases présentes dans le SRP sont impliquées dans la régulation *in vitro* et *in vivo* de la synthèse des IgE, suggèrent que la SmSP1 peut être impliquée dans la modulation de la réponse immune.

Enfin, la SmSP1 présente des homologies avec des protéines impliquées dans la régulation de la cascade de coagulation sanguine ou la fibrinolyse, ainsi le parasite semble capable d'interagir avec un système de l'hôte aussi complexe que l'hémostase.

Il est, dans ce contexte, surprenant de remarquer que les schistosomes, de même que de nombreux parasites intravasculaires tels que les filaires, n'induisent aucune thrombose en dépit de leur surface très activatrice. Ainsi, différentes études ont identifié la présence d'inhibiteur de la coagulation sanguine dans de nombreux parasites. Chez *S. mansoni*, il a été démontré que des extraits solubles d'antigènes du parasite étaient capables d'inhiber la voie endogène de la coagulation par inhibition de l'activation du facteur Hageman ou facteur XII (Foster *et al.*, 1992). Ce facteur est une protéine de régulation fondamentale dans la voie d'activation de la voie endogène, elle circule sous

forme de zymogène inactif et peut être activée au contact d'une grande variété d'agents chargés négativement. L'inhibition spécifique de cette enzyme par le parasite permet ainsi d'expliquer l'absence d'activation de coagulation autour du schistosome. Les homologies de séquence de la SmSP1, certes plus faibles qu'avec d'autres sérine protéases concernent des enzymes impliquées dans la régulation de la coagulation (protéine C, résultat non évoqué) ou dans la fibrinolyse (activateur de plasminogène), ces observations viennent ainsi conforter les études concernant le contrôle de la coagulation par le schistosome.

Différentes approches expérimentales telles que l'ELISA ou l'immunoprécipitation, nous ont permis de conclure quant à la présence de la SmSP1 au stade adulte. C'est à ce jour la première sérine protéase détectée à ce stade, en effet, l'élastase de *S. mansoni* est, malgré la présence du transcrit, totalement absente chez le ver adulte (Pierrot *et al.*, 1996). Ceci suggère donc l'intérêt fondamental de la SmSP1 tout au long du cycle évolutif pour le parasite.

Il est, dans ce contexte, intéressant de noter une absence de réponse humorale dirigée contre celle-ci au cours d'infections expérimentales. La sous-représentativité de la protéine évoquée précédemment aurait pu expliquer cette observation. En effet, quel que soit le modèle utilisé, souris BalB/c ou rat, permissif à *S. mansoni* ou semi-permissif, aucune réponse de type humorale n'a été détectée. Seule la réponse IgG totales a été regardée, les réponses IgE ou cellulaire n'ont pas été étudiées et restent donc à envisager. Néanmoins, cette absence de réponse anticorps au cours d'une infection primaire ou d'une réinfection soulève d'autres hypothèses. Dans ce contexte, de nombreux travaux ont montré que des sérine protéases étaient capables de se fixer à des inhibiteurs, formant ainsi un complexe qui rend l'enzyme totalement invisible au système immunitaire (cf. Généralités "*Les protéases*" § 3.6.1). C'est ainsi que la faible antigénicité de l'élastase observée par Toy *et al.* (1987) a été expliquée. Pour A. Sher, citant les propos plus anciens de Waksman (Sher, 1988), l'intérêt des protéines faiblement ou non antigéniques (l'auteur utilisera le terme d'immunogénicité) est à noter. En effet, plutôt que d'étudier des protéines fortement antigéniques, dans le cas d'une stratégie vaccinale, ne vaut-il pas mieux, au contraire, s'intéresser aux protéines contre lesquelles aucune réponse n'est détectée et qui, de plus, pourraient présenter un caractère fondamental pour la survie du parasite (Doenhoff, 1998)? Ainsi, la moindre réponse ou intervention chimiothérapeutique dirigée contre cette protéine engendrerait des conséquences notables dans la lutte contre la schistosomiase. Le complexe

protéase/inhibiteur suggère de nombreuses études dans le développement d'une stratégie antiparasitaire. Pour certains, c'est l'occasion de développer une stratégie utilisant des inhibiteurs dirigés contre une protéase fondamentale pour le développement du parasite, ainsi Cohen *et al.* (1991), chez *S. mansoni*, utilisa l'élastase en tant que cible et Engel *et al.* (1998), chez *T. cruzi*, développa un inhibiteur dirigé contre la cruzain. Pour d'autres, ce serait l'occasion de développer une stratégie vaccinale utilisant l'enzyme non active qui ne serait alors pas reconnue par son inhibiteur et donc visible au système immunitaire, ainsi, une réponse anti-protéase pourrait alors être engendrée contre l'enzyme active du parasite (Modha *et al.*, 1996).

Les protéases présentent de nombreux intérêts fondamentaux mais pour cela il est nécessaire de disposer d'une protéine dont l'activité est préservée. Les travaux de Verwaerde *et al.* (1986, 1988), montrant que la régulation de la synthèse des IgE *in vivo* et *in vitro* dépend de la présence de molécules à activité protéolytique de type sérine protéase, illustrent la nécessité de travailler avec une enzyme active.

C'est pourquoi, nous avons entrepris l'expression de la chaîne légère de la SmSP1 et de l'élastase (forme mature) en cellules d'insectes. L'élastase exprimée en *E. coli* n'a, en effet, jusqu'ici révélé aucune activité protéolytique.

La difficulté d'obtenir une protéine enzymatique active demeure un problème de longue haleine. Jusqu'à ce jour, aucune élastase recombinante active de *S. mansoni* n'a été produite, de manière générale, aucune sérine protéase recombinante d'origine parasitaire n'a été obtenue. Les différentes enzymes recombinantes d'origine parasitaire présentant une activité protéolytique sont à ce jour, la gp63 de *T. Cruzi* exprimée en BCG recombinant (Abdelhack *et al.*, 1995), la plasmepsine de *P. falciparum* exprimée en *E. coli* (Dame *et al.*, 1994), ainsi que la Sm31 ou cathepsine B (Lipps *et al.*, 1996) et la Sm32 de *S. mansoni* exprimées respectivement en levure et en cellules d'insectes. Ainsi, l'activité protéolytique n'a pu être obtenue que pour des cystéine des métallo ou des aspartyl protéases.

L'expression de la chaîne légère de SmSP1 ne donna pas de résultat satisfaisant dans la mesure où la protéine correspondante était faiblement détectée dans le lysat cellulaire et pratiquement indécélable dans le surnageant de culture et ceci en dépit d'une bonne recombinaison entre l'ADN viral et le plasmide recombinant. Néanmoins, une observation intéressante nous a interpellés, en effet, à densité équivalente, les cellules transfectées

montrent après 5 jours de culture une densité égale à celle des cellules saines. Les cellules infectées présentent certes un signe d'infection mais une importante prolifération cellulaire a été observée. Dans ce contexte, il existe une famille de protéine, HGF (Hepatocyte Growth Factor) et HGF-like présentant des propriétés mitogènes et ayant des homologies structurales avec les sérine protéases (Comoglio & Graziani, 1994). Ainsi, le facteur HGF présente 28% d'homologies de séquence avec la SmSP1 au niveau de la chaîne légère, sous-unité β , homologue au domaine catalytique des sérine protéases.

Ainsi, l'on constate que la famille des sérine protéases évoquée au cours de ce travail présente des homologies intéressantes avec des facteurs de croissance. Pouvons-nous alors imaginer qu'une telle sérine protéase décrite chez le schistosome puisse également avoir un rôle mitotique sur les cellules Sf9 exprimant la SmSP1 ? Est-elle capable d'agir directement à l'intérieur de la cellule ou agit-elle après excrétion dans le surnageant puis via un récepteur membranaire ? Certes, nous ne connaissons pas le mécanisme d'action, ni si l'enzyme est active, ni si cette population cellulaire exprime à sa surface un récepteur susceptible d'être activée par une telle protéase. Néanmoins, il a été décrit que certaines protéases peuvent être considérées comme des signaux capables de réguler de multiples fonctions cellulaires via l'activation de récepteur spécifique (Déry *et al.*, 1998). Une des familles de récepteur, couplé à des protéines G, celle des PAR (Proteinase-Activated Receptors) est présente sur les cellules Sf9 (Chen *et al.*, 1996). Ces données tentent d'expliquer les phénomènes de prolifération observés, néanmoins ces observations demandent à être confirmées.

Expression de l'élastase de S. mansoni en cellules d'insectes

L'expression de l'élastase mature de *S. mansoni* en cellules d'insectes, donna des résultats préliminaires prometteurs. En effet, une activité enzymatique sur un substrat (Azocoll), certes à large spécificité, a été obtenue. Malheureusement, aucune autre activité n'a été observée sur des substrats synthétiques.

L'activité enzymatique obtenue sur l'azocoll est inhibée de façon dose dépendante par des IgG anti-élastase exprimée en *E. coli* et par des inhibiteurs spécifiques de sérine protéases tels que le PMSF et la p-aminobenzamidine. De plus, la caractérisation de l'activité

enzymatique montre des résultats similaires à ceux présentés par McKerrow *et al.* (1985), c'est à dire que l'activité est dépendante des ions Ca^{++} et variable en fonction du pH avec un pH optimum de 9.5 (pH 9 pour la protéine native). Certes, nous n'avons pas la certitude que cette activité enzymatique soit bien due à l'élastase malgré les contrôles utilisant notamment une autre protéine exprimée dans le même vecteur, par la souche cellulaire et dans les mêmes conditions de culture. C'est pourquoi, nous avons entrepris la purification de l'élastase afin, dans un premier temps, d'associer l'activité à l'enzyme et par la suite tester les propriétés protectrices ou modulatrices de l'élastase. La concentration de l'élastase dans le surnageant de culture étant trop faible (150ng/ml) quelle que soit la souche cellulaire utilisée (Sf9 ou HF), nous avons donc entrepris la purification de l'élastase intracellulaire, en effet, malgré le système d'excrétion optimisé, une importante concentration d'élastase est retrouvée à l'intérieur des cellules. La technique de purification choisie est une technique de chromatographie d'affinité basée sur la reconnaissance protéase/inhibiteur (p-aminobenzamidine). Malheureusement, l'élastase intracellulaire n'est pas retenue sur la colonne alors que l'élastase excrétée dans le surnageant se fixe bien à l'inhibiteur (résultat non présenté). Ce résultat soulève de multiples interprétations qui expliqueraient l'absence de reconnaissance par l'inhibiteur et donc l'absence d'activité enzymatique (résultat non évoqué). La protéine intracellulaire ne présenterait pas une conformation correcte soit à cause d'une absence de maturation qui aurait lieu lors du processus d'excrétion, soit le traitement de lyse des cellules affecterait directement l'enzyme. Ainsi, il semble préférable de travailler sur l'élastase excrétée dans le surnageant de culture.

Une des perspectives de cette étude est donc l'optimisation de la production de l'élastase dans le surnageant de culture afin de purifier directement l'enzyme. L'élastase ainsi purifiée, nous pourrions alors tester ces éventuelles propriétés modulatrices de la réponse immune.

La capacité des protéases à moduler la réponse immune a déjà été suggérée par Verwaerde *et al.* (1986; 1988) chez *S. mansoni*. D'autres protéases de la famille des cystéine protéase présentent également une capacité à moduler la réponse immune et les mécanismes ont été bien décrits par Schulz *et al.* (1997 ; 1998) dans le cas des allergènes. Ainsi, la Der p1, protéase de la famille des cystéine protéases, représentant l'allergène majeur de *Dermatophagoides pteronyssinus* (acarien responsable de l'allergie à la poussière de maison) est capable d'augmenter la réponse IgE en clivant le CD23 (récepteur de faible

affinité pour les IgE) des cellules B (Schulz *et al.*, 1997). En effet, la Der p1 en assurant le clivage du CD23 interrompt le contrôle négatif de la synthèse des IgE via son récepteur. Plus récemment, les mêmes auteurs ont montré que la Der p1 était également capable de cliver le CD25 (sous-unité α du récepteur IL2 humain des cellules T périphériques), ce qui induit une modulation de la réponse immune vers un profil de type Th2 (Schulz *et al.*, 1998). La polarisation de la réponse immune vers un profil Th2 avait également été suggérée dans un système d'immunisation hétérologue (Comoy *et al.*, 1998).

Ces observations suggèrent la capacité des protéases à moduler la réponse immune. Ainsi, ces enzymes pourraient être impliquées dans la polarisation de la réponse immune observée dans une infection parasitaire à *S. mansoni*. La purification des deux protéases étudiées au cours de ce travail, nous permettra de tester cette hypothèse. Dans ce contexte, dans les infections parasitaires, il est intéressant de noter que les profils de réponse (Th1 ou Th2) liés à la protection semblent être associés à la nature des protéases synthétisées par le parasite. En effet, les parasites responsables d'une parasitose intracellulaire, dont la protection est associée à un profil de type Th1, synthétisent majoritairement des protéases de type cystéine et métalloprotéases (Urban *et al.*, 1992). En revanche, chez les helminthes et en particulier *S. mansoni* chez lesquels le rôle fondamental des sérine protéases a été largement évoqué, on note un profil protecteur de type Th2.

*Références
bibliographiques*

- ABDELHACK, S., LOUZIR, H., TIMM, J., BLEL, L., BENLASFAR, Z., LAGRANDERIE, M., GHEORGHIU, M., DELLAGI, K. & GICQUEL, B. (1995) Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Microbiology* **141**, 1585-1592.
- ALTIERI, D.C. (1995) Proteases and protease receptors in modulation of leucocyte effector functions. *Journal of Leucocyte Biology* **58**, 120-127.
- ANDRADE, F., ROY, S., NICHOLSON, D., THORNBERRY, N., ROSEN, A. & CASCIOLA-ROSEN, L. (1998) Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: Implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* **8**, 451-460.
- AMIRI, P., LOCKSLEY, R.M., PARLOW, T.G., SADICK, M., RECTOR, E., RITTER, D. & MCKERROW, J.H. (1992) TNF α restores granulomas and induces parasite egg laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* **356**, 604-607.
- AMORY-SOISSON, L., MASTERTSON, C., TOM, T.D., MCNALLY, M.T., LOWELL, G.H. & STRAND, M. (1992) Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *Journal of Immunology* **149**, 3612-3620.
- AMORY-SOISSON, L. & STRAND, M. (1993) *Schistosoma mansoni*: Induction of protective immunity in rats using recombinant fragment of a parasite surface antigen. *Experimental Parasitology* **77**, 492-494.
- ANDRESEN, K., TOM, T.D. & STRAND, M. (1991) Characterization of cDNA encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 15085-15090.
- ASCH, H.L. & DRESDEN, M.H. (1979) Acidic thiol proteinase activity of *Schistosoma mansoni* egg extracts. *Journal of Parasitology* **65**, 543-549.
- AURIAULT, C., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. (1980) Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by *Schistosoma* larvae proteases. *Immunology Letters* **2**, 135-139.
- AURIAULT, C., OUASSI, M.A., TORPIER, G., EISEN, H. & CAPRON, A. (1981a) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunology* **3**, 33-44.
- AURIAULT, C., PESTEL, J., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. (1981b) Interaction between macrophages and *Schistosoma mansoni* schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cellular Immunology* **62**, 15-27.
- AURIAULT, C., PIERCE, R., CESARI, I.M. & CAPRON, A. (1982a) Neutral proteases activities at different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in mammalian hosts. *Comparative Biochemistry and Physiology* **82**, 72B, 377-384.
- AURIAULT, C., CAPRON, M. & CAPRON, C. (1982b) Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Cellular Immunology* **66**, 59-69.
- AURIAULT, C., JOSEPH, M., TARTAR, A. & CAPRON, A. (1983a) Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of human IgG. *FEBS Letters* **153**,

11-15.

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

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

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

BALLOUL, J.M., SONDEMEYER, P., DREYER, D., CAPRON, M., GRZYCH, J.M., PIERCE, R.J., CARVALLO, D., LECOCQ, J.P. & CAPRON, A. (1987a) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* **326**, 149-153.

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

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

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

BARRETT, A.J. & RAWLINGS, N.D. (1996) Families and clans of cysteine peptidases. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **6**, 1-11.

BART, G., COOMBS, G.H. & MOTTRAM, J.C. (1995) Isolation of *lmcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin B-like cysteine proteinase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **73**, 271-274.

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

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

BECKER, M.M., HARROP, S.A., DALTON, J.P., KALLINA, B.H., McMANUS, D.P. & BRINDLEY, P.J. (1995) Cloning and characterization of the *Schistosoma japonicum* aspartic proteinase involved in hemoglobin degradation. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 24496-24501.

BECKETT, R.P., DAVIDSON, A.H., DRUMOND, A.H., HUXLEY, P. & WHITTAKER, M. (1996) Recent advances in matrix metalloproteinase inhibitor research. *Drug Discovery Today* **1**, 16-26.

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

BICKLE, Q.D., TAYLOR, M.G., DOENHOFF, M.J. & NELSON, G.S. (1979) Immunization of mice with irradiated intramuscularly injected schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **79**,

209-222.

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

BLEACKLEY, R.C., LOBE, C.G., DUGGAN, B. EHRMAN, N., FREGEAU, C., MEIER, M., LETELLIER, M., HAVELE, C., SHAW, J. & PAETKAN, V. (1988) The isolation and characterization of a family of serine protease genes in activated cytotoxic T lymphocytes. *Immunological Reviews* **103**, 5-19.

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

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

BONTEMPI, E., MARTINEZ, J. & CAZZULO, J.J. (1989) Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 43-48.

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

BOUVIER, J., SCHNEIDER, P. & ETGES, R. (1995) Leishmanolysin: surface metalloproteinase of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 43-48.

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

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

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

BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. & REES, P.H. (1974) Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula *in vitro*. *Nature* **252**, 503-505.

BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. & REES, P.M. (1975) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* **256**, 727-729.

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

BUTTERWORTH, A.E., CAPRON, M., CORDINGLEY, J.S., DALTON, P.R., DUNNE, D.W. HARIUKI, H.C., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., PRENTICE, M.A. RICHARDSON, B.A., ARAP

- SIONGOK, T.K., STURROCK, R.F. & TAYLOR, D.W. (1985) Immunity after traitement of human schistosomiasis. II Identification of resistant individuals and analysis of their immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene* **79**, 393-408.
- CALLAHAN, H.L., CROUCK, R.K. & JAMES, E.R. (1988) Helminth antioxidant enzymes : a protective mechanism against host oxidants ? *Parasitology* **4**, 218-225.
- CAMPETELLA, O., HENRIKSSON, J., ASLUND, L., FRASH, A.C.C., PETTERSON, U. & CAZZULO, J.J. (1992) The major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **50**, 225-234.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., & BAZIN, H. (1975) Specific IgE antibodies in immune response adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature* **253**, 274-275.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., OUMA, J.H. & BUTTERWORTH, A.E. (1987) Immunity to schistosomes: progress towards vaccine. *Science* **238**, 1065-1072.
- CAPRON, A. (1993) La bilharziose: du papyrus à l'ordinateur. *Le généraliste* **1411**, 8-18.
- CAPRON, A. (1995) Le langage moléculaire des parasites. *Médecine/Sciences* **11**, 431-439.
- CAPRON, A., RIVEAU, G., GRZYCH, J.M., BOULANGER, D., CAPRON, M. & PIERCE, R.J. (1995) Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Memorias Instituto do Oswaldo Cruz* **90**, 235-242.
- CAPRON, M., BAZIN, H. JOSEPH, M. & CAPRON, A. (1981) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rats eosinophils. *Journal of Immunology* **126**, 1764-1768.
- CAPRON, M., NOGUEIRA-QUEIROZ, J.A., PAPIN, J.P. & CAPRON, A. (1984) Interactions between eosinophils and antibodies: *in vivo* protective role against rat schistosomiasis. *Cellular Immunology* **83**, 60-72.
- CAPRON, M. & CAPRON, A. (1986) Rats, mice and men - models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitology Today* **2**, 69-75.
- CAPRON M, KAZATCHKINE, D., FISHER, E., JOSEPH, M., BUTTERWORTH, A.E., KUSNIERZ, J.P., PRIN, L., PAPIN, J.P. & CAPRON, A. (1987) Functional role of the a chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody mediated cytotoxicity against schistosomes. *Journal of Immunology* **139**, 2059-2065.
- CATTERALL, C.F., LYONS, A., SIM, R.B., DAY, A.J. & HARRIS, T.J.R. (1987) Characterization of the primary amino acid sequence of human complement control protein Factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochemical Journal* **242**, 849-856.
- CAWSTON, T.E., MCLAUGHLIN, P. & HAZELMAN, B.L. (1987) Paired serum and synovial fluid values of α 2-macroglobulin and TIMP in rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology* **26**, 354-358.
- CAZZULO, J.J. COUZO, R., RAIMONDI, A., WERNSTEDT, C. & HELLMAN, U. (1989) Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 33-42.

- CÊTRE, C., COCUE, C., PIERROT, C., GODIN, C., CAPRON, A., CAPRON, M. & KHALIFE, J. (1998) In vivo expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*, **20**, 135-142.
- CÊTRE, C., PIERROT, C., COCUE, C., LAFITTE, S., CAPRON, A., CAPRON, M. & KHALIFE, J. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after a primary and a secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. (*Soumis pour publication*).
- CHAVEZ-OLORTEGUI, C., RESENDE, M. & TAVARES, C.A.P. (1992) Purification and characterization of a 47kDa protease from *Schistosoma mansoni* cercarial secretion. *Parasitology* **105**, 211-218.
- CHEN, X., EARLEY, K., LUO, W., LIN, S-H. & SHILLING, W. (1996) Functional expression of a human thrombin receptor in Sf9 insect cells: evidence for an active tethered ligand. *Biochemical Journal* **314**, 603-611.
- CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, A. E., MACDONALD, J. & RUTTER, W. J. (1978) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.
- CLEMENTS, J.A. (1989) The glandular Kallikrein family of enzymes: tissu-specific expression and hormonal regulation. *Endocrine reviews* **10**, 393-419.
- COFFMAN, R.L., SEYMOUR, B.W.P. HUDAK, S., JACKSON, J. & RENNICK, D. (1989) Antibody to interleukin 5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* **245**, 308-310.
- COHEN, F.E., GREGORET, L.M., AMIRI, P., ALDAPE, K., RALEY, J. & MCKERROW, J.H. (1991) Arresting tissue invasion of a parasite by protease inhibitors chosen with the aid of computer modeling. *Biochemistry* **30**, 11221-11229.
- COLMAN, R.W. & SCHAIMER, A.H. (1997) Contact system: A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes. *Blood* **90**, 3819-3843.
- COMBES, C. (1993) Les schistosomes, l'eau et l'homme. *La Revue du Praticien* **43**, 405-415.
- COMBES, C., DELAY, B., JARNE, P., JOURDANE, J. & POINTIER, J.P. (1992) Seminar on "International cooperation in the field of genetic transformation of Invertebrates and resistance to diseases". Washington, December 4-5.
- COMOGLIO, P.M. & GRAZIANI, A. (1994) Hepathocyte Growth Factor. In *Cytokines and their Receptors*. Nicola, N.A. Ed. A sambrook and Tooze publications, Oxford University Press. pp 182-184
- COMOY, E.E., PESTEL, J., DUEZ, C., STEWART, G.A., VENDEVILLE, C., FOURNIER, C., FINKELMAN, F., CAPRON, A. & THYPHRONITIS, G. (1998) The house dust mite allergen, *Dermatophagoides pteronyssinus*, promotes type 2 responses by modulating the balance between IL-4 and IFN-gamma. *Journal of Immunology* **160**, 2456-2462
- COOMBS, C. & BAXTER, J. (1984) Inhibition of *Leishmania* amastigote growth by antipain and leupeptin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **78**, 21-24.
- COOMBS, G.H. & MOTTRAM, J.C. (1997) Proteinases of trypanosomes and *Leishmania*. In *trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control* (ed. Hide, G., Mottram, J.C., Coombs, G.H. & Holmes, P.H.), pp. 177-197. Oxford, CAB International.

- COULSON, P.S. (1997) The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? *Advances in Parasitology* **39**, 272-323.
- COUISSINIER, P. & DESSEIN, A.J. (1995) Schistosoma specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are ThO/2. *European Journal of Immunology* **25**, 2295-2302.
- CRAIG, S.P., MURALIDHAR, M.G., MCKERROW, J.H. & WANG, C.C. (1989) Evidence for a class of very small introns in the gene of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase in *Schistosoma mansoni*. *Nucleic Acids Research* **17**, 1635-1647.
- DALTON, J.P., SMITH, A.M., CLOUGH, K.A. & BRINDLEY, P.J. (1995a) Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on. *Parasitology Today* **11**, 299-303.
- DALTON, J.P., HOLA-JAMRISKA, L. & BRINDLEY, P.J. (1995b) Asparaginyl endopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **111**, 575-580.
- DALTON, J.P. & BRINDLEY, P.J. (1996) Schistosome asparaginyl endopeptidase Sm32 in haemoglobin digestion. *Parasitology Today* **12**, 125.
- DALTON, J.P., CLOUGH, K.A., JONES, M.K. & BRINDLEY, P.J. (1997) The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* **114**, 105-112.
- DAME, J. B., REDDY, G. R., YOWELL, C.A., DUNN, B. M., KAY, J. & BERRY, C. (1994) Sequence, expression and modeled structure of an aspartic proteinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **64**, 177-190.
- DAMIAN, R.T., GREENE, N.D. & HUBBARD, W.J. (1973) Occurrence of mouse α_2 -macroglobulin antigenic determinants on *Schistosoma mansoni* adults, with evidence on their nature. *Journal of Parasitology* **59**, 64-73.
- DA SILVA, A.C., LEPRESLE, T., CAPRON, A. & PIERCE, R.J. (1992) Molecular cloning of a 16kDa Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **52**, 275-278.
- DAVIS, A.H., NANDURI, J. & WATSON, D.C. (1987) Cloning and gene expression of *Schistosoma mansoni* protease. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 12851-12855.
- DAVIS, R.E., DAVIS A.H. CARROLL, S.M., RAIJKOVIC, A. & ROTTMAN, F.M. (1988) Tandemly repeated exons encode 81 base repeats in multiple, developmentally regulated *Schistosoma mansoni* transcripts. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 4745-4755.
- DEL NERY, E., JULIANO, M.A., LIMA, A.P., SCHARFSTEIN, J. & JULIANO, L. (1997) Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 25713-25718.
- DEMEURE, C.E., RIHET, P., ABEL, L., OUATTARA, M., BOURGOIS, A. & DESSEIN, A.J. (1993) Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *Journal of Infectious Diseases* **168**, 1000-1011.
- DERY, O., CORVERA, C.U., STEINHOFF, M., & BUNNETT, N.W. (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *The American Physiological Society* **274**, C1429-C1452.

- DISSOUS, C., GRZYCH, J.M. & CAPRON, A. (1982) *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a. *Journal of Immunology* **129**, 2232-2234.
- DISSOUS, C., PRATA, A. & CAPRON, A. (1984) Human antibody response to *Schistosoma mansoni* surface antigens defined by protective monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases* **149**, 227-233.
- DISSOUS, C., GRZYCH, J.M. & CAPRON, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature* **323**, 443-445.
- DOOTLITTLE, R.F. (1985) The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 233-237.
- DRESDEN, M.H. & DEELDER, A.M. (1979) *Schistosoma mansoni*: thiol proteinase properties of adult worm "haemoglobinase". *Experimental Parasitology* **48**, 190-197.
- DUBOISE, S.M., VANNIER-SANTOS, M.A., COSTA-PINTO, D., RIVAS, L., PAN, A.A., TRAUB-CSEKO, Y.M., DE SOUZA, W. & MCMAHON-PRATT, D. (1994) The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine protease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **68**, 119-132.
- DUNNE, D.W., GRABOWSKA, A.M., FULFORD, A.J.C., BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., KOECH, D. & OUMA, J.H. (1988) Human antibody responses to *Schistosoma mansoni*: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. *European Journal of Immunology* **18**, 123-131.
- DUNNE, D.W., BUTTERWORTH, A.E., FULFORD, A.J.C., KARIUKI, H.C., LANGLEY, J.G., OUMA, J.H., CAPRON, A., PIERCE, R. & STURROCK, R.F. (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *European Journal of Immunology* **22**, 1483-1488.
- DUVAUX-MIRET, O., BARRATTE, B., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1991) Molecular cloning and sequencing of the α -tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **49**, 337-340.
- DUVAUX-MIRET, O., STEFANO, G.B., SMITH, E.M., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1992) Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 778-787.
- EVANS, B.A., DRINKWATER, C.C. & RICHARDS, R.I. (1987) Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 8027-8034.
- ENGEL, J.C., DOYLE, P.S., PALMER, J., HSIEH, I., BAINTON, D.F. & MC KERROW, J.H. (1998) Cysteine protease inhibitor alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cell Science* **111**, 597-606.
- ENGEL, J.C., DOYLE, P.S., HSIEH, I., & MC KERROW, J.H. (1998) Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 725-734.
- DOENHOFF, M.J. (1998) A vaccine for Schistosomiasis: Alternative Approaches. *Parasitology*

Today 14, 105-109.

FAISST, S. & MEYER, S. (1992) Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Research* 20, 3-26.

FALLON, P.G., COOPER, R.O., PROBERT, A.J. & DOENHOFF, M.J. (1992) Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology* 105, S41-S48.

FALLON, P.G. & DOENHOFF, M.J. (1994) Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 83-88.

FALLON, P.G., STURROCK, R.F., NIANG, A.C. & DOENHOFF, M.J. (1995) Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53, 61-72.

FALLON, P.G., TAO, L.F., ISMAIL, M.M. & BENNET, J.L. (1996). Schistosome resistance to praziquantel: fact or artefact ? *Parasitology Today* 12, 316-322.

FINKELMAN, F.D., KATONA, I.M., URBAN, J.F., SNAPPER, C.M., OHARA, J. & PAUL, W.E. (1986) Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 83, 9675-9678.

FRANCIS, S. E., GLUZMAN, I. Y., OKSMAN, A., KNICKERBOCKER, A., MUELLER, R., BRYANT, M.L., SHERMAN, D. R., RUSSEL, D. G. & GOLDBERG, D.E. (1994) Molecular characterization and inhibition of a plasmodium aspartic haemoglobinase. *EMBO Journal* 13, 306-317.

FLEXNER, C. (1998) HIV-protease inhibitors. *The new England Journal of Medicine* 338, 1281-1292.

FOSTER, C.B., FLANIGAN, T.P., DESTIGTER, K.K., BLANTON, R., DUMENCO, L.L. GALLAGHER, C. & RATNOFF, O.D. (1992) Inhibition of Hageman factor (F XI) by extracts of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Laboratory Clinic and Medical* 92, 735-739.

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

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

GORDON, H. MC L. in "Biochemical adaptation in parasites" (1989) BRYANT, C. & BEHM, C. Chapman and Hall, New York. p.1.

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

GOUDOT-CROZEL, V., CALLOL, D., DJABALI, M. & DESSEIN, A.J. (1989) The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37 kDa glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Experimental Medicine* 170, 2065-2080.

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

- GRZYCH, J.M., DISSOUS, C., CAPRON, M. TORRES, S., LAMBERT, P.H. & CAPRON, A. *Schistosoma mansoni* shares with keyhole limpet hemocyanin a protective carbohydrate epitope. *Journal of Experimental Medicine* **165**,865-878.
- GRZYCH, J.M., PEARCE, E., CHEEVER, A., CAULADA, Z.A., CASPAR, P., HEINY, S., LEWIS, F. & SHER, A. (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology* **146**, 1322-1327.
- HAGAN, P., BLUMENTHAL, U., DUNNE, D., SIMPSON, A.J.G. & WILKINS, H.A. (1991) Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* **349**, 243-245.
- HARTH, G.A., ANDREWS, N., MILLS, A.A., ENGEL, J.C., SMITH, R. & MCKERROW, J.H. (1993) Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Journal* **58**, 17-24.
- HEDSTROM, R., CULPEPPER, J., HARRISON, R.A., AGABIAN, N. & NEWPORT, G. (1987) A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infection is homologous to the heat-shock protein hsp 70. *Journal of Experimental Medicine* **165**, 1430-1435.
- HENKLE, K.J., COOK, G.A., FOSTER, L.A. ENGMAN, D.M., BOBEK, L.A., CAIN, G.D. & DONELSON, J.E. (1990) The gene family encoding egg shell proteins of *Schistosoma japonicum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **42**, 69-82.
- ISMAIL, M.M., TAHA, S.A., FARGHALY, A.M. & EL AZONY, A.S. (1994) Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *Journal of Egyptian Society of Parasitology* **24**, 685-693.
- JAMES, S.L. (1986) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non living vaccine. III. Correlation of resistance with induction of activated larvacidal macrophages. *Journal of Immunology* **136**, 3872-3877.
- JANICKE, R.U., SPRENGART, M.L., WATI, M.R. & PORTER, A.G. (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 9357-9360.
- JANKOVIC, D., ASLUND, L., OSWALD, I.P., CASPAR, P., CHAMPION, C., PEARCE, E., COLIGAN, J.E., STRAND, M., SHER, A. & JAMES, S.L. (1996) Calpain is the target antigen of a Th1 clone that transfers protective immunity against *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **157**, 806-814.
- JANOFF, A. & SCHERER, J. (1968) Mediators of inflammation in leucocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Experimental Medicine* **128**, 1137-1155.
- JOSEPH, M., AURIAULT, C., CAPRON, A., VORNG, H. & VIENS, P. (1983) A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* **303**, 810-811.
- KARCZ, S.R., PODESTA, R.B., SIDDIQUI, A.A., DEKABAN, G.A., STREJAN, G.H. & CLARKE, M.W. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of a calcium-activated neutral protease (calpain) from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **49**, 333-336.
- KEENE, W. E., JEONG, K. H. MCKERROW, J. H. & WERB, Z. (1983) Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. II. Degradation by newly transformed and developing schistosomula. *Laboratory Investigation* **49**, 201-207.

- KEENE, W.E., PETTIT, M.G., ALLEN, S. & MCKERROW, J.H. (1986) The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine* **163**, 536-549.
- KHALIFE, J., CAPRON, M., CAPRON, A., GRZYCH, J.M., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D. & OUMA, J. (1986) Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *Journal of Experimental Medicine* **164**, 1626-1640.
- KHALIFE, J., DUNNE, D.W., RICHARDSON, B.A., MAZZA, G. THORNE, K.J.I., CAPRON, A. & BUTTERWORTH, A.E. (1989) Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **142**, 4422-4427.
- KHALIFE, J., GRZYCH, J.M., PIERCE, R.J., AMEISEN, J.C., SCHACHT, A.M., GRAS-MASSE, H., TARTAR, A., LECOQ, J.P. & CAPRON, A. (1990) Immunological crossreactivity between the human immunodeficiency virus type I virion infectivity factor and a 170 kDa surface antigen of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine* **172**, 1001-1004.
- KHALIFE, J., GODIN, C. & CAPRON, A. (1995) Transcriptional regulation of *Schistosoma mansoni* Calreticulin: possible role of AP1. *Parasitology* **111**, 469-475.
- KIDWELL, M.G. (1992) Horizontal transfer. *Current Opinion of Genetic Development* **2**, 868-873.
- KIGONI, E.P., ELSAS, P.P., LENZI, H.L. & DESSEIN, A.J. (1986) IgE antibody and resistance to infection. II Effect of IgE suppression on the early and late skin reaction and resistance of rats to *Schistosoma mansoni* infection. *European Journal of Immunology* **6**, 589-595.
- KLINKERT, M.Q., FELLEISEN, R., LINK, G., RUPPEL, A. & BECK, E. (1989) Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 113-122.
- KLINKERT, M. & KUNZ, W. (1996) Digestion of haemoglobin by schistosomes. *Parasitology* **106**, 395-404.
- KLOETZEL, K. (1968) A collagenase-like substance produced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* **54**, 177-178.
- KOHL, N.E., EMINI, E.A. SCLEIF, W.A. et al. (1998) Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **85**, 4686-4690.
- KRAUT, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual Reviews in Biochemistry* **46**, 331-358.
- ISHIZAKA T, IWATA M, ISHIZAKA K. (1985) Release of histamine and arachidonate from mouse mast cells induced by glycosylation-enhancing factor and bradykinin. *Journal of Immunology* **146**, 1880-1887.
- LANAR, D.E., PEARCE, E.J., JAMES, S.L. & SHER A. (1986) Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* **234**, 593-596.
- LANDSPERGER, W.J., STREWALT, M.A. AND DRESDEN, M.H. (1982) Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochemical Journal* **201**, 137-144.
- LIPPS, G., FÜLLKRUG, R. & BECK, E. (1996) Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*: purification

- and activation of the recombinant proenzyme secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1717-1725.
- LOTTENBERG, R., MINNING-WENZ, D. & BOYLE, M. D. P. (1994) Capturing host plasminogen: a common mechanism for invasive pathogens? *Trends in Microbiology* **2**, 20-24.
- MAEDA, H., MOLLA, A., ODA, T. & KATSUKI, T. (1987) Internalization of Serratial protease into cell as an enzyme inhibitor complex with α_2 macroglobulin and regeneration of protease activity ant cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 10946-10950.
- MANGOLD, B.L. & DEAN, D.A. (1986) Passive transfert with serum and IgG antibodies of irradiated cercaria-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *Journal of Immunology* **136**, 2644-2647.
- MARIKOVSKY, M. FISHELSON, Z. & ARNON, R. (1988a) Purification and characterization of proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **30**, 45-54.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1988b) Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* **141**, 273-278.
- MARIKOVSKY, M., PARIZADE, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1990) Complement regulation on the surface of cultured schistosomula and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Immunology* **20**, 221-227.
- MASSON, D. & TSCHOPP, J. (1987) A family of serine esterases in lytic granules of cytotoxic T lymphocytes. *Cell* **49**, 679-685.
- MATSUSHITA, S. & KATZ, D.H. (1993) Biphasic effect of Kallikrein on IgE and IgG1 synthesis by LPS/IL4 stimulated B cells. *Cellular Immunology* **146**, 210-214. MCDONALD, R.J., MARGOLIUS, H.S. & ERDOS, E.G. (1988) Molecular biology of tissue kallikrein. *Biochemical Journal* **253**, 313-321.
- MC GRATH, M.E., EAKIN, A.E., ENGEL, J.C., MC KERROX, J.H., CRAIK, C.S. & FLETTERICK, R.J. (1995) The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for chagas' disease. *Journal of Molecular Biology* **247**, 251-259.
- MCAIR, A.T., DISSOUS, C., DUVAUX-MIRET, O. & CAPRON, A. (1993) Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-Transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene* **124**, 245-249.
- MCTIGUE, M.A., WILLIAMS, D.R. & TAINER, J.A. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathion S-transferase from *Schistosoma japonicum* and its complex with the leading anti-schistosomal drug praziquantel. *Journal of Molecular Biology* **246**, 21-27.
- MCKERROW, J. H., KEENE, W. E., JEONG, K. H. & WERB, Z. (1983) Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I: Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Laboratory Investigation* **49**, 195-200.
- MCKERROW, J.H., PINO-HEISS, S., LINDQUIST, R. & WERB, Z. (1985) Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Chemistry* **260**, 3703-3707.

- MCKERROW, J.H., SUN, E., ROSENTHAL, P.J. & BOUVIER, J. (1993) The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology* **47**, 821-853.
- MCMMASTER, W.R., MORRISON, C.J., McDONALD, M.H. & JOSHI, P.B. (1994) Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase gp63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology* **108** (Suppl.), S29-S36.
- MEGYERI, P., PABST, K.M. & PABST, M.J. (1995) Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. *Immunology* **86**, 629-635.
- MICHEL, A., GHONEIM, H., RESTO, M., KLINKERT, M.Q. & KUNZ, W. (1995) Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **73**, 7-18.
- MILLER, K.J., KENNEDY, E.P. & REINHOLD, V.N. (1986) Osmotic adaptation by gram-negative bacteria. Possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231**, 48-51.
- MINARD, P., DEAN, D.A., JACOBSON, R.H., VANNIER, W.E. & MURELL, K.D. (1978) Immunization of mice with cobalt-60 irradiates *Schistosoma mansoni* cercariae. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **27**, 76-86.
- MODHA, J., PARIKH, V., GAULDIE, J. & DOENHOFF, M.J. (1988) An association between schistosomes and contrapsin, a mouse serine protease inhibitor (serpin). *Parasitology* **96**, 99-109.
- MODHA, J. & DOENHOFF, M.J. (1994a) Complex formation of human alpha-1-antitrypsin with components of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasite Immunology* **16**, 447-450.
- MODHA, J., ROBERTS, M.C. & KUSEL, J.R. (1996) Schistosomes and serpins: a complex business. *Parasitology Today* **12**, 119-121.
- MOLONEY, N.A., HINCHCLIFFE, P. & WEBBE, G. (1987) Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice after treatment with praziquantel. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**, 247-254.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Reviews of Immunology* **7**, 145-173.
- MOSTAFA, M.H., BADAWI, A.F. & OCONNOR, P.J. (1995) Bladder cancer associated with schistosomiasis. *Parasitology Today* **11**, 87-89.
- MOTTRAM, J.C., ROBERTSON, C.D., COOMBS, G.H. & BARRY, J.D. (1992) A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology* **6**, 1925-1932.
- MURAY, S.R., CHAO, J., LIN, F.K. & CHAO, L. (1990) Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **15** (Suppl.) S7-S16.
- NENE, V., DUNNE, D.W., JOHNSON, K.S., TAYLOR, D.W. & CORDINGLEY, J.S. (1986) Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat-shock proteins and alpha crystallins. *Molecular and Biochemical Parasitology* **21**, 179-188.
- NEUMANN, S., ZIU, E., LANTEN, F. & SCHESCHTER, I. (1992) Cloning and sequencing an hsp 70 of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **56**, 357-360.
- NEWPORT, G.R., HARRISON, R.A., MCKERROW, J., TARR, P., KALLESTAD, J. & AGABIAN, N.

- (1987) Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* myosin. *Molecular and Biochemical Parasitology* **26**, 29-38.
- NEWPORT, G., CULPEPPER, J. & AGABIAN, N. (1988a) Parasite heat-shock proteins. *Parasitology Today* **4**, 306-318.
- NEWPORT, G. R., MCKERROW, J. H., HEDSTROM, R., PETITT, M., MCGARRIGLE, L., BARR, P.J. & AGABIAN, N. (1988b) Cloning of the proteinase that facilitates infection by Schistosome parasites. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 13179-13184.
- NORTH, M., MOTTRAM, J.C. & COOMBS, G.H. (1990) Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today* **6**, 270-275.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (1990) L'éducation pour la santé dans la lutte contre la schistosomiase. Genève.
- OUASSI, M.A., SANTORO, F. CAPRON, A. Interactions between *Schistosoma mansoni* and the complement system receptors for C3b cercariae and schistosomula. *Immunology Letters* **80**, 197-210.
- PARIZADE, M., GHENDLER, Y., ARNON, R., FISHELSON, Z. (1990) Resistance of the parasite *Schistosoma mansoni* to immune attack. *FASEB* **4**: A2228 (Abstr.)
- PATTHY, L. (1985) Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell* **41**, 657-663.
- PEARCE, E.J. & MC LAREN, D.J. (1983) Reappraisal of the guinea pig as an experimental hosts for schistosomiasis mansoni. *Parasitology* **87**, 455-464.
- PEARCE, E.J., JAMES, S.L., DALTON, J., BARRALL, A., RAMOS, C., STRAND, M. & SHER, A. (1986) Immunological characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non-living vaccine. *Journal of Immunology* **137**, 3593-3600.
- PEARCE, E.J., JAMES, S.L., HIENY, S., LANAR, D.E. & SHER, A. (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **85**, 5678-5682.
- PEARCE, E.J., CASPAR, P., GRZYCH, J.M., LEWIS, F.A. & SHER, A. (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine* **173**, 159-166.
- PERLMUTTER, D.H., JOSLIN, G. NELSON, P., SCHASTEEN, C., ADAMS, S.P. & FALLON, R.J. (1990) Endocytosis and degradation of the α 1-antitrypsin-protease complexes is mediated by the serpin-enzyme complex (SEC) receptor. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 16713-16716.
- PEIREIRA, C., FALLON, P.G., CORNETTE, J., CAPRON, A., DOENHOFF, M.J. & PIERCE, R.J. (1998) Alterations in cytochrome-c oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible stains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **117**, 63-73.
- PHILIPS, S.M., CAPRON, M., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1983) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*Schistosoma mansoni* antibodies. *Journal of Immunology* **129**, 2739-2743.

- PIERROT, C., CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1995) Cloning and characterization of two genes encoding *Schistosoma mansoni* elastase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 113-117.
- PIERROT, C., GODIN, C., LIU, J.L., CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1996) *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during life-cycle. *Parasitology* **113**, 519-526.
- PIERROT, C. (1997) Caractérisation moléculaire et étude de l'expression de l'élastase de *Schistosoma mansoni*. Rôle potentiel en tant que cible et régulateur de la réponse immune. Thèse de doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille. 30mai 1997.
- PINO-HEISS, S., PETITT, M., BECKSTEAD, J.H. & MCKERROW, J.H. (1986) Preparation of mouse monoclonal antibodies and evidence for a host immune response to the preacetabular gland proteinase of *Schistosoma mansoni* cercariae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**, 536-543.
- POULAIN-GODEFROY, O., GAUBERT, S., LAFITTE, S., CAPRON, A. & GRZYCH, J.M. (1996) Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: Stimulatory role of egg antigens. *Infection and Immunity* **64**, 763-768.
- PROVENZANO, D. & ALDERETE, J.F. (1995) Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* **63**, 3388-3395.
- PUPKIS, M., TETLEY, L. & COOMBS, G.H. (1986) *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosomes. *Experimental Parasitology* **62**, 29-39.
- RAMALHO-PINTO, F.J., GAZZINELLI, G., HOWELLS, R.E., MOTA-SANTOS, T.A., FIGUEIREDO, E.A. & PELLEGRINO, J. (1974) *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomulae *in vitro*. *Experimental Parasitology* **36**, 360-372.
- REDMAN, C.A., ROBERTSON, A., FALLON, P.G., MODHA, J., KUSEL, J.R., DOENHOFF, M.J. & MARTIN, R.J. (1996) Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitology Today* **12**, 14-20.
- REYNOLDS, S.R., SHOEMAKER, C.B. & HARN, D. (1992) T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, **149** 3995-4001.
- RICHARD-LENOBLE, D., KOMBLA, M., DUONG, T.H., & GENDREL, D. (1993) Bilharzirose à *Schistosoma intercalatum*, bilharzirose récente et oubliée. *La Revue du Praticien* **42**, 432-439.
- RIES, C. & PETRIDES, P.E. (1995) Cytokines regulation of Matrix Metalloproteinases activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* **376**, 345-355.
- RIHET, P., DEMEURE, C., BOURGEOIS, A., PRATA, A. & DESSEIN, A.J. (1991) Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *European Journal of Immunology* **21**, 2679-2684.
- RIHET, P., DEMEURE, C.E., DESSEIN, A.J. & BOURGEOIS, A. (1992) Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4 revealed by a new methodology in subjects from a *Schistosoma mansoni* endemic area. *European Journal of Immunology* **22**, 2063-2070.
- RING, C.S., SUN, E., MC KERROW, J.H., LEE, G.K., ROSENTHAL, P.J., KUNTZ, I.D. & COHEN, F.E. (1993) Structure based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 3583-3587.
- ROBERTSON, C.D. & COOBMS, G.H. (1990) Characterization of three groups of cysteine

- proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **42**, 269-276.
- ROBERTSON, C.D. & COOBMS, G.H. (1994) Multiple high activity cysteine proteases of *Leishmania mexicana* are encoded by the *lmcpb* gene array. *Microbiology* **140**, 417-424.
- ROCHE, C., WILLIAMS, D.L., KHALIFE, J., LEPRESLE, T., CAPRON, A., & PIERCE, R.J. (1994) Cloning and characterization of the gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase. *Gene* **138**, 149-154.
- ROGGWILLER, E., BETOULLE, M. E. M., BLISNICK, T. & BRAUN-BRETON, C. (1996) A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp 76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **82**, 13-24.
- ROGGWILLER, E., FRICAUD, A., BLISNICK, T. & BRAUN-BRETON, C. (1997) Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malaria merozoites from infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **86**, 49-59.
- ROST, B., SANDER, C. & SCHNEIDER, R. (1994) PHD- an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Computer Applications in the Biosciences* **10**, 53-60.
- RUPPEL, A., DIESFELD, H.J. & ROTHER, U. (1985a) Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. *Clinical and Experimental Immunology* **62**, 499-506.
- RUPPEL, A., ROTHER, U., VONGERICHTEN, H., LUCIUS, R. & DIESFELD, H.J. (1985b) *Schistosoma mansoni* : immunoblot analysis of adult worm proteins. *Experimental Parasitology* **60**, 195-206.
- RUSSEL, D.G. (1987) The macrophage-attachment glycoprotein, gp 63, is the predominant C3 acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *European Journal of Biochemistry* **164**, 213-221.
- RUSSEL, D.G. (1994) Biology of the *Leishmania* surface: With particular reference to the surface proteinase, gp 63. *Protoplasma* **181**, 191-201.
- SALVESEN, G.S. & DIXIT, V.M. (1997) Caspases: Intracellular signalling by proteases. *Cell* **91**, 443-446.
- SANTORO, F., OUASSI, M.A., PESTEL, J. & CAPRON, A. (1980) Interaction between *Schistosoma mansoni* and the Complement system: Binding of C1q to schistosomula. *Journal of immunology* **124**, 2886-2891.
- SAKANARI, J.A., STAUTON, C.E., EAKIN, A.E., CRAIK, C.S. & MC KERROW, J.H. (1989) Serine proteases from nematode to protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **86**, 4863-4867.
- SAKANARI, J.A., NADLER, S.A., CHAN, V.J., ENGEL, J.C., LEPTAK, C. & BOUVIER, J. (1997) *Leishmania major*: Comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatidae. *Experimental Parasitology* **85**, 63-76.
- SCALLON, B.J., BOGITSH, B.J. & CARTER, C.E. (1987) Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding a major immunogen recognized by hyperinfected rabbits. *Molecular and Biochemical Parasitology* **24**, 237-245.

- SCHULZ, O., LAING, P., SEWELL, H.F. & SHAKIB, F. (1997) *Der p I*, a major allergen of the dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23). *European Journal of Immunology* **25**, 3191-3194.
- SCHULZ, O., SEWELL, H.F. & SHAKIB, F. (1998) Proteolytic cleavage of CD25, the α subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by *Derp 1*, a major mite allergen with cysteine protease activity. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 271-275.
- SERRA, E., ZEMZOUKI, K., TROLET, J., CAPRON, A. & DISSOUS, C. (1996) Functional analysis of the *Schistosoma mansoni* 28kDa glutathione S-transferase gene promoter: involvement of SMNF-Y transcription factor in multimeric complexes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **83**, 69-80.
- SHAPIRO, S.D., KOBAYASHI, D.K. & LEY, T.J. (1993) Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloprotease produced by human alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 23824-23829.
- SHER, A. (1988) in *The Biology of Parasitism* (Englund, P.T. & Sher, A., eds), pp169-182, Alan R. Liss.
- SHER, A. (1992) Parasitizing the cytokine system. *Nature* **356**, 565-566.
- SHOEMAKER, C.B., RAMACHANDRAN, H., LANDA, A. DOS REIS, M.G. & STEIN, L.D. (1992a) Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding homologue of epidermal growth factor receptor. *Molecular and Biochemical Parasitology* **53**, 17-32.
- SHOEMAKER, C., GROSS, A., GEBREMICHAEL, A. & HARN, D. (1992b) cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 1842-1846.
- SHOEMAKER, C.B. (1994) The *Schistosoma mansoni* phosphogen kinase gene contains two closely apposed transcription initiation sites and arose from a fused gene duplication. *Molecular and Biochemical Parasitology* **68**, 319-322.
- SIMPSON, A.J.G., SHER, A., & MCCUTCHAN, T.F. (1982) The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* **6**, 125-137.
- SIMPSON, A., DIAS NETO, E., VIDIGAL, T., PENA, H., CARVALHO, O. & PENA, S. (1995) DNA polymorphism of schistosomes and their snail hosts. *Memorias Instituto do Oswaldo Cruz* **90**, 211-232.
- SIMURDA, M.C., VANKEULEN, H., REKOSH, D.M. & LO VERDE, P.T. (1988) *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of a mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Experimental Parasitology* **67**, 73-84.
- SMITH, A.M., CARMONA, C., DOWD, A.J., MC GONIGLE, S., ACOSTA, D. & DALTON, J.P. (1994a) Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunology* **16**, 325-328.
- SMITH, A.M., DALTON, J.P., CLOUGH, K.A., KILBANE, C.L., HARROP, S.A., HOLE, N. & BRINDLEY, P.J. (1994b) Adult *Schistosoma mansoni* express cathepsin-L proteinase activity. *Molecular and Biochemical Parasitology* **67**, 11-19.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1965a) The infection of laboratory hosts with cercariae of

- Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Journal of Parasitology* **55**, 695-700.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1965b) Acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the albinos rat. *Parasitology* **55**, 711-717.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1967) Resistance to experimental infection by schistosoma mansoni in rhesus monkeys induced by the transfert of adult worms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **61**, 517-533.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1969) Immunity in schistosomiasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **160**, 826-840.
- SMYTHIES, L.E, COULSON, P.S. & WILSON, W.A (1992) Monoclonal antibody to IFN γ modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *Journal of Immunology* **149**, 3654-3658.
- SPEER, C.P., PABST, M.J., HEDEGAARD, H.B., REST, R.F. & JOHNSTON R.B. (1984) Enhanced release of oxygen metabolites by monocyte-derived macrophages exposed to proteolytic enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G. *Journal of Immunology* **133**, 2151-2156.
- SPOTILA, L.D., HIRAI, H., REKOSH, D.M. & LO VERDE, P.T. (1997) A retroposon-like short repetitive DNA element in the genome of human blood fluke *Shistosoma mansoni*. *Chromosoma* **6**, 421-428 (89).
- STARKEY, P.M. (1977) Elastase and Cathepsin G. In: Proteinases in mammalian cells and tissues, Barret A.J. ed., Amsterdam, Elsevier, pp 57-89.
- STEINBUCH, M. & AUDRAN, R. (1969) Isolation of IgG immunoglobulin from human plasma using caprylic acid. *Revue Française d' Etudes Cliniques et Biologiques* **10**, 1054-1058
- STIREWALT, M.A. (1974) *Schistosoma mansoni*: cercariae to schistosomule. *Advances in Parasitology* **12**, 115-182.
- TANAKA, M., TANAKA, T., INAZAWA, TJ., NAGAFUCHI, S., MUTSUI, Y., KAVKAS, A., JOHNSTON, D.A. & ROLLINSON, D. (1997) Procoeedings of the *Schistosoma mansoni* genome project. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **92**, 829-834.
- TENDLER, M., VILAR, M.M., BRITO, C.A., DA SERRA FREIRE, N.M., KATZ, N. & SIMPSON, A. (1995) Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: Potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**, 255-265.
- TCHUEM TCHUENTE, L.A. (1995) Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology* **110**, 45-52.
- TCHUEM TCHUENTE, L.A., SOUTHGATE, V.R., COMBES, C., & JOURDANE, J. (1996) Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful? *Parasitology Today* **12**, 231-236.
- THERON, A. & COMBES, C. (1988) Genetic analysis of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma mansoni*. *Behavior Genetics* **18**, 201-209.
- TOY, L., PETTIT, M., WANG, Y. F., HEDSTROM, R. & MCKERROW, J. H. (1987) The immune response to stage specific proteolytic enzymes of *Schistosoma mansoni*. In: UCLA Symposia on

- Molecular and Cellular Biology, vol. 60, Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites, Alan R. Liss, Inc., W.Y., pp 85-103.
- TRAUB-CSEKO, Y.M., DUBOISE, M., BOUKAI, L.K. & MCMAHON-PRATT, D. (1993) Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* 57, 101-116.
- TRAVIS, J & SALVESEN, G.S. (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annual Review in Biochemistry* 52, 655-709.
- TROTTEIN, F., KIENY, M.P., VERWAERDE, C., TORPIER, G., PIERCE, R.J., BALLOUL, J.M., SCHMITT, D., LECOCQ, J.P. & CAPRON, A. (1990) Molecular cloning and tissue distribution of a 26kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 41, 35-44.
- TZENG, S., MCKERROW, J.H., FUKUYAMA, K. & EPSTEIN, W.L. (1983) Degradation of purified skin keratin by a protease secreted from *Schistosoma mansoni* cercariae. *Journal of Parasitology* 69, 992-994.
- URBAN, J.F. JR, MADDEN, K.B., SVETIC, A., CHEEVER, A., TROTTA, P.P., GAUSE, W.C., KATONA, I.M. & FINKELMAN, F. (1992) The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunology Review* 127, 205-220.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J. B., NIESCHLAF, E. & ROSS, G. T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *Journal of Clinical Endocrinology* 33, 988-991.
- VELUPILLAI, P. & HARN, D.A. (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, 18-22.
- VERWAERDE, C., AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, M., NEYRINCK, J.L., VENDEVILLE, C. & CAPRON, A. (1986) Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scandinavian Journal of Immunology* 24, 509-516.
- VERWAERDE, C., JOSEPH, M., CAPRON, M., PIERCE, R., DAMONNEVILLE, M., VELGE, F., AURIAULT, C. & CAPRON, A. (1987) Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* 138, 4441-4447.
- VERWAERDE, C., AURIAULT, C., NEYRINCK, J.L. & CAPRON, A. (1988) Properties of serine proteases of *Schistosoma mansoni* involved in the regulation of IgE synthesis. *Scandinavian Journal of Immunology* 27, 17-24.
- WASILEWSKI, M.M., LIM, K.C., PHILIPS, J. & MC KERROW, J.H. (1996) Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 81, 179-189.
- WEINSTOCK, J.V., & BOROS, D.L. (1983) Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology* 127, 1906-1913.
- WIEST, P.M. (1996) The epidemiology of morbidity of schistosomiasis. *Parasitology Today* 12, 215-220.
- WILLIAMS, D.L. PIERCE, R.J., COOKSON, E. & CAPRON, A. (1992) Molecular cloning and

- sequencing of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **52**, 127-130.
- WYNN, T.A., REYNOLDS, A., JAMES, S., CHEEVER, A.W., CASPAR, R., HIENY, S., JANKOVIC, D., STRAND, M. & SHER, A. (1996) Il-12 enhances vaccine-attenued immunity to schistosome by augmentation both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. *Journal of Immunology* **157**, 4068-4078.
- XU, Y.Z. & DRESDEN, M.H. (1986) Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Parasitology* **72**, 507-511.
- XU, H., MILLER, S., VANKEULEN, H., WAWRZYNSKI, M.R., REKOSH, D.M. & LOVERDE, P.T. (1989) *Schistosoma mansoni* tropomyosin: cDNA characterization, sequence, expression and gene product localization. *Experimental Parasitology* **69**, 373-392.
- XU, Y.Z., SHAWAR, S.M. & DRESDEN, M.H. (1990) *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of a membrane-associated leucine aminopeptidase. *Experimental Parasitology* **70**, 124-133.
- XU, C.B., VERWAERDE, C., GRAS-MASSE, H., FONTAINE, J., BOSSUS, M., TROTTEIN, F., WOLOWCZUK, I., TARTAR, A. & CAPRON, A. (1993) *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability: role of the amino- and carboxy-terminal domains. *Journal of Immunology* **150**, 940-949.
- YAMAMOTO, T., GEODFFREY DAVIS, C., BROWN, M.S., SHNEIDER, W.J., CASET, M.L., GOLDSTEIN, J.L. & RUSSEL, D.W. (1984) The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* **39**, 27-38.
- YOSHINO, T.P., LODES, M.J., REGE, A.A. & CHAPPELL, C.L. (1993) Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* **79**, 23-31.
- ZEMZOUMI, K., SERRA, E., MANTOVANI, R., TROLET, J., CAPRON, A & DISSOUS, C. (1996) Cloning of *Schistosoma mansoni* transcription factor NF-YA subunit: phylogenic conservation of the HAP-2 homology domain. *Molecular and Biochemical Parasitology* **77**, 161-172.
- ZERDA, K.S., DRESDEN, M.H., DAMIAN, R.T. & CHAPPEL, C.L. (1987) *Schistosoma mansoni*: anti-Sm32 proteinase response in vaccinated and challenged baboons. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **37**, 320-326.
- ZWAAL, R.R., BROEKS, A., VANMEURS, J., GROENEN, J.T.M. & PLASTERK, R.H.A (1993) Target-selected gene inactivation in *Caenorhabditis elegans* by using a frozen transposon insertion mutant bank. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 7431-7435.

Annexes

Article 1 :

Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. (1997)

**Molecular characterization of a partial sequence encoding
a novel *Schistosoma mansoni* serine protease.**

Parasitology 115, 395-402.

Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease

C. COCUDE*, C. PIERROT, C. CETRE, C. GODIN, A. CAPRON and J. KHALIFE

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

(Received 26 February 1997; revised 28 April 1997; accepted 28 April 1997)

SUMMARY

A PCR strategy using degenerate oligonucleotide primers based upon consensus sequences of the active site of serine proteases yielded a 467 bp fragment from genomic DNA from *Schistosoma mansoni* cercariae. The sequence presented a continuous open reading frame and the deduced amino acid sequence (156 aa) presented homologies with various serine proteases, in particular the highest percentage identity was observed with a mammalian plasma kallikrein. The expression of this serine protease was studied first at the mRNA level and it was only detected by RT-PCR in cercariae and in adult worms. At the protein level we were able to detect it by Western blotting and by using antigen extracts from metabolically radio-isotope labelled worms. The absence of any positive signal in Northern blot and the detection of the protein suggest that the mRNA has a very short half-life, however the protein may be accumulated in the parasite. The significance of identity with mammalian kallikrein was confirmed by cross-immunoreactivity with a native porcine pancreatic kallikrein. However, no cross-reactivity was observed with *S. mansoni* elastase, another serine protease. Thus, we suggest that the serine protease described in this paper is a kallikrein-like protease.

Key words: *Schistosoma mansoni*, serine protease, kallikrein-like protease.

INTRODUCTION

The life-cycle of *Schistosoma mansoni* consists of larval, intermediate and adult forms which have different morphologies. Asexual multiplication occurs in the snail intermediate host and released cercariae can penetrate the skin of man or laboratory animals. Early studies showed that this process was mediated by proteases. They facilitate penetration by digestion of host skin (Lansperger, Stirewalt & Dresden, 1982; McKerrow *et al.* 1983; Newport *et al.* 1988; Marikovsky, Arnon & Fishelson, 1990), which results in the formation of small 'tunnels' in the epidermis. Proteolytic enzymes are also involved in a wide range of biological processes such as nutrition (Senft, Goldberg & Byram, 1981; Lindquist *et al.* 1986; Chappell & Dresden, 1987) and play a key role in the survival of *S. mansoni* (McKerrow & Doenhoff, 1988). Aside from these activities, proteases are involved in immune evasion by destruction of antibody bound to the Fc receptor on the surface of schistosomula (Auriault *et al.* 1981), or by cleavage of complement, promoting the resistance of the larvae to complement-mediated killing (Marikovsky, Arnon & Fishelson, 1988). Moreover, proteases have been implicated in the modulation of the host immune response. Indeed, the role of proteases, particularly serine proteases, in

the regulation of *in vitro* and *in vivo* IgE synthesis has been demonstrated (Verwaerde *et al.* 1986, 1988).

Since serine proteases play critical roles in *S. mansoni* infection and may be targets of anti-parasitic vaccines or chemotherapy, we undertook this study in order to identify novel serine protease gene fragments by using degenerate oligonucleotide primers based on the active site of these enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Parasite

A Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters. Cercariae were released from infected snails and concentrated on ice. Adult worms were prepared by hepatoportal perfusion of infected hamsters 40 days after cercarial infection. They were immediately washed in MEM containing 0.02% gentalline-gentamycine (GIBCO).

PCR procedure

Primers were designed based upon serine protease consensus sequences flanking the histidine-5' (CAC) and serine-3' (AGT/c or TCi) of the active site (Sakanari *et al.* 1989). We used different degenerate oligonucleotides to amplify genomic DNA from *S. mansoni* cercariae, single-stranded cDNA reverse

* Corresponding author. Tel: +3 20 87 78 00. Fax: +3 20 87 78 88. E-mail: Cecile.Cocude@pasteur-lille.fr

transcribed from adult worm RNA, extracted according to standard methods (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989), or a DNA preparation from a cDNA library. The sequence of primers used were: primer 5' (sense): 1: 5'- TGG GTi GTi ACi GCi GCi CAC TG -3', primers 3' (antisense): 2: 5'- AG iGG iCC iCC iCT ATC iCC -3', 3: 5'- AG iGG iCC iCC iGA ATC iCC -3', 4: 5'- AG iGG iCC iCC iCT GTC iCC -3', 5: 5'- AG iGG iCC iCC iGA GTC iCC -3'.

The cycling parameters were as follows: 94 °C for 7 min as an initial denaturing step, followed by 94 °C for 1 min, 45 °C for 1 min, 1.5 min at 72 °C for 40 cycles and a final extension at 72 °C for 10 min.

Cloning and sequencing

All PCR products were subcloned into the PCR[®] II vector using the TA Cloning system (Invitrogen), and were sequenced. The sequencing reaction by the dideoxy chain termination method was performed using fluorescein labelled primers (Autoread[™] Sequencing kit, Pharmacia, Sweden), and analysed on an ALF sequencer (Pharmacia).

Specific primers

We have synthesized specific primers based upon the fragment of interest (SmSP1). The sequence of primers applied were: P1 (sense): 5' TGT ATT CAA CCA ATG CCA 3' and P2 (antisense): 5' CTT GGC AAG CAT CAA TTC 3'. The expected fragment size of the fragment amplified with P1 and P2 is 427 bp long.

mRNA preparations and RT-PCR

Total RNA from adult worms and cercariae was prepared using the 4 M guanidine thiocyanate lysis solution and the caesium chloride gradient purification method (Chirgwin *et al.* 1978). The mRNA was isolated by passage of total RNA through an oligo (dT)-cellulose column (mRNA Purification Kit, Pharmacia).

Single-stranded cDNA was synthesized from 5 µg of mRNA in the presence of Mu-MLV reverse transcriptase and oligo (dT) for 1 h at 37 °C. PCR experiments were then performed on 1 µl of these matrices with synthetic primers (P1 and P2) derived from the sequence of interest. Forty cycles were performed, each composed of a denaturation step for 1 min at 94 °C, primer annealing for 1 min at 50 °C and extension for 1 min at 72 °C.

Expression of recombinant protein

The sequenced PCR product, cloned into the PCR[®] II vector was digested by *Sac* I and *Xho* I and was subcloned into the *Sac* I/*Sal* I-digested pQE30

vector (Qiagen) which produces a fusion protein with 6 histidines at the N-terminus. (His)₆-tagged protein produced in this system has the advantage of needing only 1 affinity-chromatography step for purification on a Ni-agarose column. The expression and purification of the recombinant protein were done using the QIAexpress system (Qiagen). The concentration of protein content was measured by the BCA method (Pierce, USA).

Antisera production

LOU M rats were immunized by injection (50 µg/rat) of recombinant protein as described by Vaitukaitis *et al.* (1971) in the presence of complete Freund's adjuvant. A secondary boost was performed 4 weeks later with incomplete Freund's adjuvant. The sera were collected 3 weeks later. Serum specificity was tested by Western blotting.

Western blotting

Purified recombinant protein or kallikrein from porcine pancreas (Sigma), were loaded independently on a 13% SDS-PAGE and then electrophoretically transferred onto nitrocellulose filters (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979). The nitrocellulose was washed in PBS and pre-incubated, to block non-specific binding, in PBS containing 5% non-fat dried milk for 2 h at room temperature. Filters were incubated with the primary serum diluted in PBS containing 5% non-fat dried milk overnight at 4 °C. After 3 washes in PBS containing 0.4% Tween-20, detection with goat anti-rat IgG conjugated to peroxidase (1/500) (Sigma, USA) was done by using the HRP colour development reagent (BioRad).

Metabolic labelling and immunoprecipitation

Adult worms (2 pairs/ml) were maintained first in MEM containing 0.02% gentalline-gentamycine and 10% foetal calf serum (FCS) without methionine (GIBCO) for 1 h at 37 °C in a 5% CO₂ gassed incubator. The parasites were then incubated overnight with ³⁵S-Met (50 µCi/ml) (Amersham). After washes with MEM, adult worms (about 15 pairs) were homogenized in lysis buffer (Tris 10 mM, NaCl 0.15 M, NP40 0.5%, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.4), sonicated using a Labsonic sonicator (B. Braun, USA) and centrifuged at 12000 g for 5 min. The supernatant fraction was recovered and the labelling was estimated after precipitation by TCA (25%) for 1 h on ice. Before immunoprecipitation, antigens were depleted on protein G-Sepharose (Sigma) with normal rat serum in TNTE buffer (Tris 5 mM, NaCl 0.15 M, NP40 0.5%, EDTA 2 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.4) for 2 h at 4 °C. The sample of antigens was then mixed with the

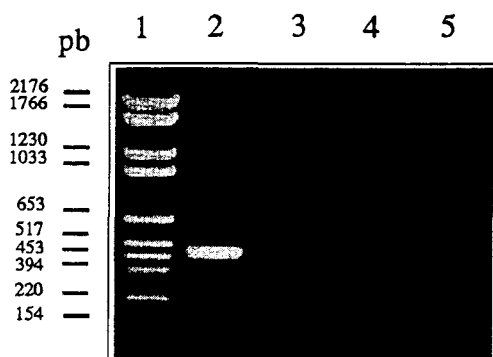


Fig. 1. PCR on genomic DNA with degenerate primers based upon consensus sequences of the active site of serine proteases. Lane 1, λ -digested by *Hind* III-*Eco*R I (Appligen); Lane 2, primer 1 and 2; Lane 3, primer 1 alone; Lane 4, primer 2 alone; Lane 5, primers without DNA.

protein G-Sepharose pre-incubated with normal rat serum or rat antiserum directed against recombinant protein, in TNTE overnight at 4 °C. After several washes, the immune complexes were recovered from beads by boiling in sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% sucrose and 0.005% bromophenol blue) and analysed on 15% SDS-PAGE. After treatment with an 'Amplify' solution (Amersham), the dried gel was exposed to Kodak Biomax[®] MR film.

RESULTS

Amplification of serine protease gene fragments

Genomic DNA, a cDNA library and reverse transcription products obtained from adult worm mRNA were used in PCR for amplification of serine protease genes. After several PCR rounds, a specific fragment of 467 bp with degenerate primers 1 and 2 was obtained in the presence of genomic DNA. Controls using only the 5' and 3' oligonucleotide primers and the two primers without DNA were negative (Fig. 1).

Identification of clones and sequencing

Following purification of the PCR product, the fragment was subcloned and sequenced. Different clones that had inserts of the right size gave identical sequences, the nucleotide and derived amino acid sequences of a clone named SmSP1 are shown in Fig. 2. The nucleotide sequence has an open reading frame (ORF) of 467 bp. This ORF encoded 156 amino acids and contained an Asp residue (D) which constitutes 1 of the 3 amino acids involved in the active site of serine proteases along with the His (5') and the Ser (3') residues. However, due to the fact that these two amino acids were predicted by using degenerate primers, we screened an *S. mansoni* genomic library in order to confirm the presence of

the histidine and serine amino acids. This screening led us to the isolation of 2 genomic clones which hybridized with the SmSP1 fragment. Partial sequencing of these 2 genomic clones without prior amplification confirmed the nucleotide sequence of SmSP1 and the presence of the histidine and the serine residues in this serine protease. The complete gene sequence will be further characterized by sequencing of these genomic clones.

Homology with other proteins

The combined Swiss-Prot and NBRF-PIR[®]-protein databases (DNA Star, Madison, WI, USA) were screened for sequences related to the predicted polypeptide sequence of the SmSP1 clone. The SmSP1 clone encodes a protein sequence which is 42% identical to the vampire bat tissue plasminogen activator from the N terminal side (positions 1-59) and 36% identical to the human protein C precursor from the C terminal side (positions 44-99). Comparison of the amino acid sequence derived from the sequence of SmSP1 with mouse plasma kallikrein shows an overall 35% identity (Fig. 3). It is interesting to note that the SmSP1 encoded protein has a conserved sequence NDIALL which is found in all compared serine proteases. Moreover, the comparison with another *S. mansoni* serine protease, the elastase, revealed an overall 26% identity (data not shown).

Expression of mRNA corresponding to SmSP1 clone at different life-cycle stages

The stage-specific expression of mRNA corresponding to SmSP1 was detected by RT-PCR experiments on mRNA from cercariae and adult worms in the presence of specific primers derived from the SmSP1 nucleotide sequence. As expected, we obtained a fragment of 427 bp at both stages (Fig. 4). The sequencing of these fragments confirmed the presence of the mRNA. In order to rule out any genomic DNA contamination of the RT-PCR products, we amplified the same products used above with the primers derived from the elastase gene of *S. mansoni* which contains an intron between these two primers. The absence of amplification of this intron confirmed that the SmSP1 fragment gene was amplified from the mRNA. Controls using only the 5' and 3' oligonucleotide primers and the 2 primers without DNA were negative. In addition, RT-PCR control containing all components without reverse transcriptase did not give any amplification product.

Study of SmSP1 protein in *S. mansoni*

Fig. 5A shows SDS-PAGE of recombinant protein (rSmSP1) expressed in *E. coli*, that migrates at about 21 kDa (lane 3). The recombinant protein was

TGGGTAATGACAGCTGCACACTGTATTCAACCAATGCCAGATCCAAAGCGATGGTTTGT 60
 W V M T A A H C I Q P M P D P K R W F V

GACGTTGGAAGATACTATAGAAACTTTGGTGGTCTGAAGTTCAAAGAATAAACTTTCA 120
 D V G R Y Y R N F G G P E V Q R I K L S

CAAATTGTTATACACCCATCTTACAATAAAAAAATTTACGCCAATGACATAGCACTGTTA 180
 Q I V I H P S Y N K K I Y A N D I A L L

CGTCTACAAACTCCAGCTAATTTAGATAATCGTCAGGTACGACTTTCTCCAGTTCACGT 240
 R L Q T P A N L D N R Q V R L S P V P R

AATCCTCATTATCCGATTTATTAACAGATAATGTTTCAGTGCATGGTCGCTGGTTGGGA 300
 N P H L S D L L T D N V Q C M V A G W G

GATACACATAATACAGGTTCAAATGATGTTCTAAGACAAGCAGTTCTTCTGTCATTAAT 360
 D T H N T G S N D V L R Q A V L P V I N

TATGATCTTTGCAAATCATGGTATCAATATCTTAATAAAGCAAGCTTTTGTGCTGGATAC 420
 Y D L C K S W Y Q Y L N K A S F C A G Y

AAACAACGAGGAATTGATGCTTGCCAAGGTGATAGTGGGGTCTCT 467
 K Q R G I D A C Q G D S G G P L

Fig. 2. Nucleotide and amino acid sequences from SmSP1. H, D and S which constitute the catalytic site are bolded. Sequences predicted by degenerate primers and confirmed by 2 genomic sequences are underlined with broken lines.

A

SmSP1 WTA**AH**CIQMPDPKRWFVDVGRYYRNFEGGPEVQRIKLSQIVIHPSYNKKIY**AND**IALLRLQTP 64
 :TAAHC:::P P W : G : E :::::IH Y: **DIAL**:::LQTP

MpKLK VTA**AH**CFDGIPYPDVWRIYGGILSLSEITKETPSSRIKELIIHQEYKVSEGN**YD**IALIKLQTP 492

SmSP1 ANLDNRQVRLSPVPRNPHLSDLLTDNVQCMVAGWGDTHNTG-SNDVLRQAVLPVINYDLCKSW 125
 N .: Q .:. :P.::: .: T :C V:GWG T.: G :::::L::A.:P::: C:.

MpKLK LNYTEFQK**P**IC-LPSKADTNTIYT---NCWVTGWGYTKEQ**Q**ETQ**N**ILQKATIPLVPNEEC**Q**KK 551

SmSP1 YRDYVINKQMICAGYKEGGTDACKGDSGGPL 582
 Y :Y: NK. :CAGYK: G.DAC:GDSGGPL

MpKLK Y-QYL-NKASFCAGYK**Q**RGIDAC**Q**GDSGGPL 155

B

SmSP1 TAA**AH**CIQMPDPKRWFVDVGRYYRNFEGGPEVQRIKLSQIVIHPSYNKKIY**AND**IALL 60
 TAAHC:Q P:: V :GR YR G E Q : : : :IH :: Y **ND**IALL

VbtPa TAA**AH**CFQERYPPQHRLRVVLGRTYRVKPGKEEQTFEVEKCI**I**HEEFDDDT**Y**ND**I**ALL 324

C

SmSP1 HPSYNKKIY**AND**IALLRLQTPANLDNRQVRLSPVPRNPHLSDLLTDNVQCMVAGWG 98
 HP:Y:Y **ND**IALL:L PA L : V : :L : :v:GWG

HuPC HPNYSKSTTD**ND**IALLHLAQPATLSQTIVPICLPDSGLAEREL**NQ**AGQ**ET**LVTGWG 301

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences encoding for *Schistosoma mansoni* (SmSP1) protein with mouse plasma kallikrein (A), vampire bat tissue plasminogen activator (B) and human protein C (C). The histidine (H), aspartic acid (D) and serine (S) which constitute the catalytic site are bolded. *MpKLK*, mouse plasma kallikrein; from aa 428 to 582. *VbtPa*, vampire bat tissue plasminogen activator; from aa 269 to 324, *HuPC*, human protein C; from aa 246 to 301.

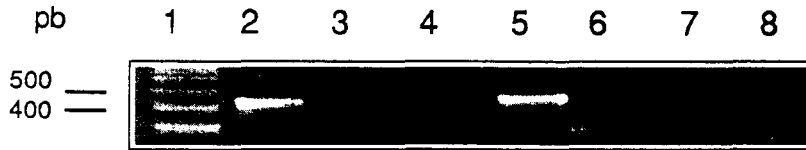
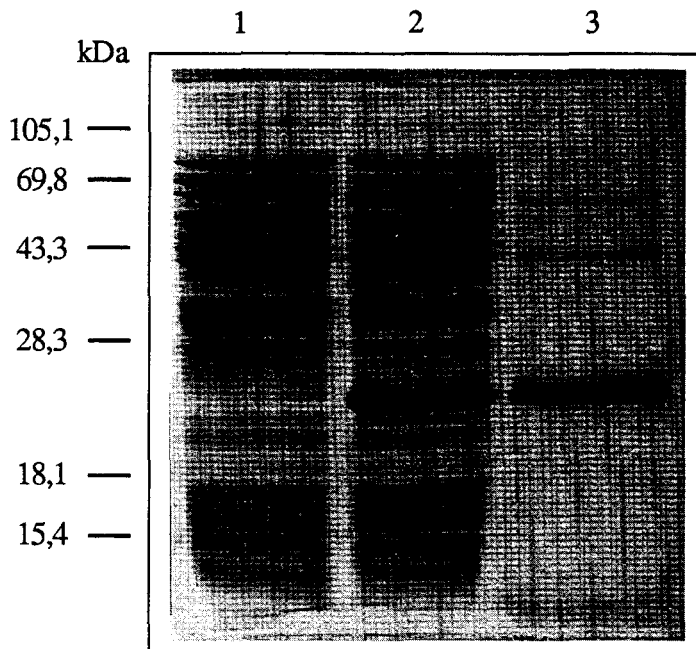


Fig. 4. Agarose gel analysis of RT-PCR products after amplification with specific primers based upon the SmSP1 fragment of RNA extracted from cercariae (Lanes 2–4) and adult worms (Lanes 6–8). In each case, PCR was performed with 5' and 3' primers (Lanes 2 and 5), with the 5' primer (Lanes 3 and 6) and with the 3' primer (Lanes 4 and 7). Lane 8, PCR control with no template; Lane 1, 100 bp DNA ladder (Pharmacia).

A



B

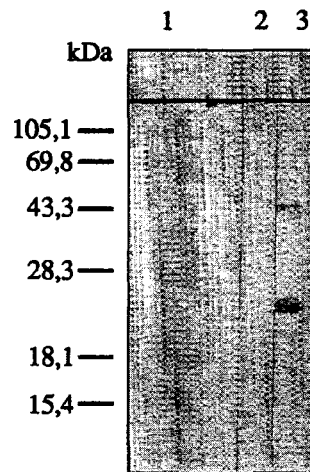


Fig. 5. (A) SDS-PAGE analysis of recombinant SmSP1 protein. Lane 1, whole extracts of non-induced bacterial culture; Lane 2, whole extracts of induced bacterial culture; Lane 3, recombinant protein after Ni column purification. (B) Western blotting of purified recombinant protein with normal rat serum (1:500) (Lane 2) and rat antiserum directed against the rSmSP1 protein (1:500) (Lane 3). Lane 1, molecular weight markers (GIBCO).

extremely pure and was used for production of antisera. The specificity of rat antiserum raised against purified recombinant protein was tested by Western blotting (Fig. 5B) which showed that the serum recognized the recombinant protein. In order to check whether the mRNA is in fact translated, we immunoprecipitated soluble antigens obtained from adult worms labelled with ^{35}S Met. Results presented in Fig. 6 showed that the antiserum directed against rSmSP1 specifically precipitated an antigen at about 30 kDa. This result was further confirmed by Western blotting (data not shown).

Immunoreactivity of porcine kallikrein with rat sera directed against rSmSP1 protein

Due to the identity of amino acid sequences between the SmSP1 protein and kallikrein, we tested whether this similarity could be reflected in cross-immunoreactivity. To address this question, we performed Western blotting on kallikrein purified from porcine

pancreas with the rat antiserum directed against the rSmSP1 protein. Results presented in Fig. 7 showed that the purified kallikrein is recognized by antibodies directed against the rSmSP1, suggesting that this protein could induce cross-reactive antibodies. The presence of 2 bands might be explained either by a degradation product of the porcine kallikrein or/and by the presence of the proenzyme (higher band) and the active enzyme (lower band) which lost the pro-peptide. However, when this antiserum was tested against the recombinant elastase of *S. mansoni*, another serine protease, results did not show a positive signal (data not shown) suggesting that antibodies induced by rSmSP1 are specific for kallikrein protease.

DISCUSSION

Through the evolution of the host-parasite relationship in schistosomiasis, the parasite has developed a variety of proteolytic enzymes (McKerrow *et al.*

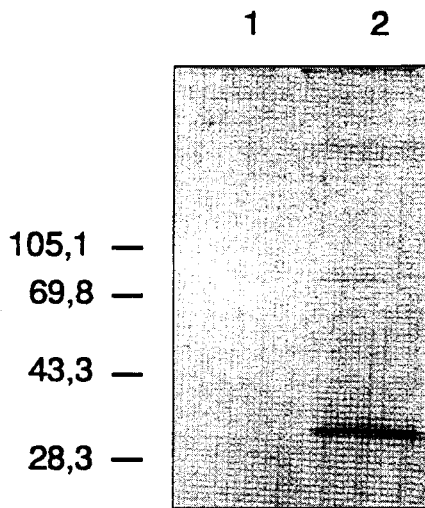


Fig. 6. Immunoprecipitation of adult worm antigens labelled with ^{35}S by normal serum (Lane 1) and rat antiserum directed against the rSmSP1 (Lane 2). Soluble extracts of labelled antigens were incubated with 20 μl of total serum. Immune complexes were adsorbed on protein G and were analysed by SDS-PAGE.

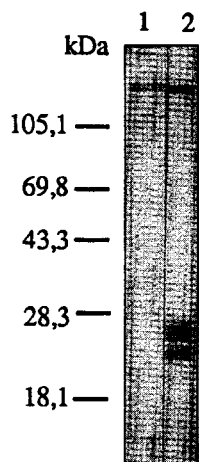


Fig. 7. Immunoblot analysis of rat antiserum anti-rSmSP1 protein against native kallikrein purified from porcine pancreas. Native kallikrein was subjected to SDS-PAGE. After transfer onto a nitrocellulose filter, membrane strips were incubated with control serum (Lane 1), or with rat anti-rSmSP1 serum (Lane 2). Rat antibodies were probed with a goat anti-rat IgG conjugated with horse-radish peroxidase.

1988) to assist in different aspects of its invasion, metabolism and exit from its host. Thus several serine proteases have been described; among them, the elastolytic (30 kDa) preacetabular gland secretions of cercaria, soluble proteins (28 and 60 kDa) released from transforming schistosomula, 2 proteins in SRP (27.5 and 29 kDa) which are involved in the enhancement of IgE Fc receptor expression (Verwaerde *et al.* 1988), and a membrane-anchored protease (28 kDa) on schistosomula (Ghendler *et al.* 1996). In addition, several cysteine proteases have been previously described in extracts of adult worms,

in eggs and in miracidia (Pino-Heiss, Brown & McKerrow, 1985; Sung & Dresden, 1986; Dalton *et al.* 1995).

In the present paper, we describe the isolation and characterization of a novel *S. mansoni* serine protease with a partial cDNA sequence which encodes a 17 kDa polypeptide. The deduced amino acid sequence shows a significant identity with the vampire bat tissue plasminogen activator, the human protein C precursor but the greatest overall similarity was to the mouse plasma kallikrein. In general, kallikrein is involved in a wide variety of essential physiological functions, among which are the processing of bioactive peptides, blood coagulation and the enhancement of glycosylation of IgE binding factors (Iwata, Munoz & Ishizaka, 1983). The role of the protein encoded by SmSP1 in the cellular function of *S. mansoni* and its location are unknown. Analysis of the amino acid sequence revealed the presence of the catalytic triad site (H, D and S) surrounded by conserved amino acids. The molecular cloning and sequencing of the gene encoding *S. mansoni* elastase showed the presence of at least 2 genes, one of them EL1 presented the catalytic triad site (H, D, S). However, the second gene (EL2) appears not to encode an active enzyme due to the absence of the aspartic acid (D) residue (Pierrot, Capron & Khalife, 1995). It was proposed by Brenner (1988) that there are 2 subclasses of serine protease; one contains a TCN codon where N = A, T, C or G and the other containing an AGY codon where Y = C or T for the active site serine protease amino acid. Sequence data showed that both the elastase (EL1) and the SmSP1 genes encoded 2 serine proteases of *S. mansoni* using the AGY codon where Y = T to code for the active site serine residue.

At the nucleotide sequence level, the alignment of SmSP1 with the EL1 sequence and other serine proteases revealed the absence of an intron in the SmSP1 sequence. However, comparisons between different serine proteases often revealed that the intron-exon junctions are conserved even when intron sizes are different. These data suggest that the gene fragment described here encodes a kallikrein-like serine protease that is structurally and may be functionally different from *S. mansoni* elastase. Moreover, Southern blot analysis with *S. mansoni* DNA digested with different restriction enzymes showed a single hybridizing fragment (data not shown) suggesting the presence of a single SmSP1 copy in this haploid genome which is not the case for mammalian species. Indeed, the analysis of mouse kallikrein genes led to the identification of a multi-gene family (Evans, Drinkwater & Richards, 1987), among which 14 genes are potentially able to encode functional proteins and 10 are pseudogenes. In humans, there are only 3 genes and in the rat 13 genes (McDonald, Margolius & Ergos, 1988; Muray *et al.* 1990). As would be expected, some schisto-

some genes show developmental regulation of expression, while others do not. In the case of *S. mansoni* elastase, we showed that cercariae and schistosomula produce more elastase than do other life-cycle stages (Pierrot *et al.* 1996). Concerning SmSP1 gene expression, we were unable to detect the corresponding mRNA by Northern blot (data not shown). However, we showed by RT-PCR that the mRNA was present at both cercarial and adult worm stages. Taken together, these results led us to check whether the native protein corresponding to the SmSP1 gene could be detected using metabolically radio-isotope labelled adult worms in the presence of ^{35}S -Met. The results of immunoprecipitation experiments performed on soluble extracts using rat serum directed against the recombinant protein of SmSP1 gene showed the presence of a single band at about 30 kDa, the expected size of serine proteases. These results suggest that the adult mRNA is in fact translated. We further confirmed these results by Western blotting using total antigen extracts from adult worms. This was not the case for *S. mansoni* elastase. Indeed, the elastase mRNA was found in the adult worms but not its protein product. These data are in favour of a stage-specific expression of serine proteases in *S. mansoni* which may be related to different physiological functions.

Sequence analysis has shown that *S. mansoni* SmSP1 is more closely related to mammalian serine protease and particularly to kallikrein. The significance of these similarities and a possible immunological cross-reactivity with known kallikrein was examined using the rat antiserum directed to the recombinant protein of SmSP1 gene. The outcome of the Western blot experiments showed the reactivity with the kallikrein from porcine pancreas confirming that we isolated a partial cDNA that encodes part of a kallikrein-like molecule in *S. mansoni*.

Currently, with the rat antiserum directed against the kallikrein-like protein and with the partial cDNA probe, we intend to isolate the full length clone from a schistosome cDNA library. By producing the recombinant protein, we will be able to elucidate its function and the role of this serine protease in host-parasite interactions.

This work was supported by the Unité INSERM U167 and by the MESR ACCSV no. 7. We are grateful to Dr R. J. Pierce for helpful discussions, to J. P. Kusnierz for synthesizing oligonucleotides. We acknowledge the support of Volvic S. A. for maintenance of the schistosome life-cycle. C. C. is a doctoral fellow of the Institut Pasteur de Lille.

REFERENCES

- AURIAULT, C., OUASSI, M. A., TORPIER, G., EISEN, H. & CAPRON, A. (1981). Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunology* **3**, 33–44.
- BRENNER, S. (1988). The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature, London* **334**, 528–530.
- CHAPPELL, C. L. & DRESDEN, M. H. (1987). Purification of cysteine proteinases from adult *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **256**, 560–568.
- CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, A. E., McDONALD, J. & RUTTER, W. J. (1978). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294–5299.
- DALTON, J. P., SMITH, A. M., CLOUGH, K. A. & BRINDLEY, P. J. (1995). Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on. *Parasitology Today* **11**, 299–303.
- EVANS, B. A., DRINKWATER, C. C. & RICHARDS, R. I. (1987). Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 8027–8034.
- GHENDLER, Y., PARIZADE, M., ARNON, R., MCKERROW, J. H. & FISHELSON, Z. (1996). *Schistosoma mansoni*: evidence for a 28 kDa membrane-anchored protease on schistosomula. *Experimental Parasitology* **83**, 73–82.
- IWATA, M., MUNOZ, J. J. & ISHIZAKA, K. (1983). Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor. IV Identification of glycosylation-enhancing factor as a kallikrein-like. *Journal of Immunology* **131**, 1954–1960.
- LANSPERGER, W. J., STIREWALT, M. A. & DRESDEN, M. H. (1982). Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *The Biochemical Journal* **201**, 137–144.
- LINDQUIST, R. N., SENFT, W., PETTIT, M. & MCKERROW, J. (1986). *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of the major acidic proteinase from adult worms. *Experimental Parasitology* **61**, 398–404.
- MCDONALD, R. J., MARGOLIUS, H. S. & ERDOS, E. G. (1988). Molecular biology of tissue kallikrein. *The Biochemical Journal* **253**, 313–321.
- MCKERROW, J. H. & DOENHOFF, M. J. (1988). Schistosome proteases. *Parasitology Today* **4**, 334–340.
- MCKERROW, J. H., KEENE, W. E., JEONG, K. H. & WERB, Z. (1983). Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Laboratory Investigations* **49**, 195–200.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1988). Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* **141**, 273–278.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1990). *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunology* **12**, 398–401.
- MURAY, S. R., CHAO, J., LIN, F. K. & CHAO, L. (1990). Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **15** (Suppl.) S7–S16.
- NEWPORT, G. R., MCKERROW, J. H., HEDSTROM, R., PETTIT, M., MCGARRIGLE, L., BARR, P. J. & AGABIAN, N. (1988). Cloning of the proteinase that facilitates infection by schistosome parasites. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 13179–13184.

- PIERROT, C., CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1995). Cloning and characterization of two genes encoding *Schistosoma mansoni* elastase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 113–117.
- PIERROT, C., GODIN, C., LIU, J. L., CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1996). *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle. *Parasitology* **113**, 519–526.
- PINO-HEISS, S., BROWN, M. & MCKERROW, J. H. (1985). *Schistosoma mansoni*: degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia. *Experimental Parasitology* **59**, 217–222.
- SAKANARI, J. A., STAUTON, C. E., EAKIN, A. E., CRAIK, C. S. & MCKERROW, J. H. (1989). Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **86**, 4863–4867.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SENF, A. W., GOLDBERG, M. W. & BYRAM, J. E. (1981). Haemoglobinolytic activity of serum in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **30**, 96–101.
- SUNG, C. K. & DRESDEN, M. H. (1986). CysteinyI proteinases of eggs: purification and partial characterization. *Journal of Parasitology* **72**, 891–900.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels onto nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350–4353.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J. B., NIESCHLAF, E. & ROSS, G. T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *Journal of Clinical Endocrinology* **33**, 988–991.
- VERWAERDE, C., JOSEPH, M., CAPRON, M., PIERCE, R. J., DAMONNEVILLE, M., VELGE, F., AURIAULT, C. & CAPRON, A. (1986). Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **138**, 4441–4446.
- VERWAERDE, C., AURIAULT, C., NEYRINCK, J. L. & CAPRON, A. (1988). Properties of serine proteases of *Schistosoma mansoni* schistosomula involved in the regulation of IgE synthesis. *Scandinavian Journal of Immunology* **27**, 17–24.

Article 2 :

Cocude, C., Pierrot, C., Cêtre, C., Fontaine, J., Godin, C., Capron, A. &
Khalife, J.

Identification of a developmentally regulated *Schistosoma*
mansoni serine protease homologous to mouse plasma
kallikrein and human factor I.

Parasitology (Sous presse)

SUMMARY

The isolation of two genomic clones has allowed us to further characterize a *Schistosoma mansoni* serine protease designated SmSP1. The deduced amino acid sequence (248aa) considered as a “light chain” encoding the active site, presents significant homologies with mouse plasma kallikrein and human factor I light chain. The secondary structure of SmSP1 “light chain” is correctly predicted and may be sufficient by itself to constitute an active enzyme. The biological function of SmSP1 is unknown, however, the homology with two serine proteases suggests that SmSP1 may play a role in the evasion of the host immune response. This is supported by the presence of the native protein corresponding to SmSP1 particularly in schistosomula released products (SRP) and in male dorsal spines. The expression of this enzyme is differentially regulated throughout the parasite life cycle. However, infected animals with *S. mansoni* did not produce specific antibodies to recombinant SmSP1. The lack of such response could be advantageous to the parasite by protecting itself from host effector mechanisms.

Key words:

Schistosoma mansoni, serine protease, kallikrein-like, factor I-like, developmentally regulated

INTRODUCTION

Proteolytic enzymes are crucial for *Schistosoma mansoni* life cycle because of their involvement in a wide range of biological processes. Several cysteine proteases have been described in adult worms, eggs and miracidia (Dalton *et al.* 1995; Pino-Heiss, Brown & McKerrow, 1985; Sung & Dresden, 1986). Many serine proteases have been detected in cercariae and/or schistosomula, but none has been described in adult worms. Proteases play a key role in the survival of *S.mansoni* (McKerrow & Doenhoff, 1988), they facilitate penetration through host skin (McKerrow *et al.* 1983; Newport *et al.* 1988; Marikovsky, Arnon & Fishelson, 1990) resulting in the formation of small “tunnels” in the epidermis and they are involved in adult worms nutrition (Lindsquit *et al.* 1986; Senft, Golberg & Byram, 1981; Chappell & Dresden, 1987). Aside from these activities, proteases help the parasite to evade the host immune response by destruction of antibody bound to the Fc receptor on the surface of schistosomula (Auriault *et al.*, 1981) or by cleavage of complement promoting the resistance of the larvae to complement-mediated killing (Marikovsky, Arnon & Fishelson, 1988). Proteases have also been implicated in the modulation of the host immune response and in the regulation of *in vitro* and *in vivo* IgE synthesis (Verwaerde *et al.* 1986, 1988).

In a previous study, we isolated and characterized a partial sequence of a serine protease (SmSP1) (Cocude *et al.* 1997), which was obtained by PCR on genomic DNA using degenerate oligonucleotide primers based on the conserved active site of these enzymes. The deduced amino acid sequence (156 aa) showed homologies with various serine proteases and in particular with a mammalian plasma kallikrein (35% identity). The significance of this identity was confirmed by a cross immuno-reactivity with a kallikrein purified from porcine pancreas. This fact, in addition to the detection of mRNA in adult worms by RT-PCR and the protein by immunoprecipitation led us to conclude that adult worms express a serine protease which may be a kallikrein-like protease. The absence of any positive signal on purified mRNA using Northern blotting and on cDNA clones by screening of different libraries hampered obtaining the full-length sequence. We therefore attempted to characterize the gene by screening two genomic libraries with a probe obtained by RT-PCR on *S. mansoni* RNA with specific primers derived from SmSP1.

Here, we present the characterization and sequence analysis of two independent clones, which extend the previous sequence to 248 aa and the expression of this serine protease during the *S. mansoni* life cycle, its localization and the antibody response during experimental infection.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and antigen preparations

A Puerto Rican strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* and golden hamsters. Cercariae were released from infected snails and concentrated on ice. Schistosomula were produced by mechanical transformation as previously described (Ramalho-Pinto *et al.* 1974) and cultured in 4 ml MEM containing 8 µg/ml of gentamycin at 37°C in a 5% CO₂ gassed incubator for 3 h or 18 h. The supernatant (SRP Schistosomula Released Products) was recovered and used in Western blotting (100µl/lane) as previously described (Cocude *et al.*, 1997). Adult worms were prepared by hepatoportal perfusion of infected hamsters 40 days after infection. Eggs were recovered from livers of infected hamsters, ground to a powder in liquid nitrogen and then treated as other stages.

Antigens prepared for Western blotting and ELISA were homogenized in PBS containing 0.5 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) and 1mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA). Homogenates were sonicated 6 times for 30s using a labsonic sonicator (B. Braun, USA) and centrifuged twice at 10 000g for 10min at 4°C. The supernatant fractions were recovered and used as sources of antigens. The measurement of protein content was performed by the BCA protein assay reagent (Pierce, USA).

Genomic library screening

Two different genomic libraries constructed with adult worms genomic DNA from Puerto Rican strain were used. The first one was constructed with the λ EMBL3 vector and the second in NM1149 (derived from λgt10 vector; fragments from 6 kb to 10 kb of EcoRI digested genomic DNA; library kindly provided by A. Begue, from the Institut de Biologie de Lille). Clones were screened with the ³²P labelled SmSP1 fragment (Cocude *et al.*, 1997) using ³²P α dCTP and the Megaprime DNA labelling system (Amersham, UK). Briefly, the nitrocellulose filters containing the transferred phage were incubated in hybridization buffer (5x SSC, Denhardt's 5x, herring sperm DNA 100µg/ml, SDS 0.5%) overnight at 55°C with the radiolabelled probe. After washes at room temperature with 2xSSC, 0.5%SDS for 10 min, in 2xSSC, 0.1%SDS for 10min and at 65°C in 0.1xSSC,

0.1%SDS for 15 min the filters were exposed at -80°C to X OMAT AR film (KODAK, Rochester, NY). Positive clones were analysed by digestion of DNA with a panel of restriction enzymes. Digestion with *Hind* III and Southern blotting with SmSP1 probe yielded two fragments (H1 & H2, respectively obtained from the first and the second library). H2 hybridized with the 5' region (from 1 to 402 bp) of SmSP1 probe (Cocude *et al.*, 1997) and H1 with the 3' region (from 403 to 467 bp).

DNA and amino acids sequences analysis

The two *Hind* III fragments described above were subcloned into *Hind* III digested pUC18, sequenced according to the dideoxy chain termination method using the DNA sequencing kit (Terminator reaction Cycle Sequencing Ready, ABI Prism, PE. Applied Biosystems) and analysed on a ABI 377 sequencer.

Open reading frames (ORF) were compared to the combined Swiss-Prot and NBRF-PIRTM-protein databases (DNA Star, Madison, WI, USA) and/or PHD secondary structure prediction algorithm (Rost, Sander & Schneider, 1994) based on a multiple sequence alignment with known sequences.

RT-PCR

RNA pretreated with DNase and single-stranded cDNA were obtained as previously described (Cocude *et al.*, 1997). PCR experiments were done on 1µl of this cDNA with synthetic primers (P1: 5'-CGG TCA GTT TAT GAT AAC GAA-3'; P2: 5'-CAA AAA ACT TGA ATA CCA GTC AGA AAA CAT AGC-3'; P3: 5'-TGT CCA ACA TCC CAA TGT ATA TTG-3') derived from the sequence of interest. Reactions were performed as previously described (Cocude *et al.*, 1997) with extension for 1.5 min at 72°C.

Capture sandwich ELISA

Rat anti-rSmSP1 previously described (Cocude *et al.*, 1997) was used to purify IgG according to the method using caprylic acid (Sigma, USA) (Steinbuch & Audran, 1969). One mg of the purified IgG was labelled with biotin according to the manufacturer's procedure (Calbiochem). Then 96-well microtiter plates (Immulon III, Dynatech laboratories, USA) were coated for 3 h at 37°C with 100µl/well of purified IgG diluted at

10µg/ml in PBS. After 3 washes in PBS containing 0.1% Tween-20 and saturation for 1h at room temperature with 200µl of PBS containing 0.5% gelatin, 100µl/well of antigens, SRP or rSmSP1 serially diluted in PBS-0.1% Tween-20 were added and incubated overnight at 4°C. The plates were then washed as above and incubated for 1.5h at 37°C with 100µl of biotin-labelled purified IgG diluted in PBS-0.1% Tween-20 (1/2000), and incubated for 30min at 37°C with 100µl of streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (1/2000) (Amersham, France). After 5 final washes, 1mg/ml of substrate (orthophenylenediamine, Sigma) in 0.1M sodium phosphate buffer (pH5.5), containing 0.03% H₂O₂ was added and incubated for 30min at 37°C. The reaction was stopped by addition of 2M HCl and the optical density was measured using a Titertek Multiscan MCC/340 reader at 492nm. Results are expressed as ng of native protein per mg of total protein and as ng per ml of SRP.

Direct ELISA

Microtiter plates (NUNC-Immulon™, Roskilde, Denmark) were coated for 3 h at 37°C with 100µl/well of purified rSmSP1 diluted at 10µg/ml in PBS. After 3 washes in PBS containing 0.1% Tween-20 and saturation for 1h at room temperature with 200µl PBS containing 0.5% gelatin, rat or mouse sera serially diluted (1/100) in PBS-Tween-20 were added and incubated overnight at 4°C. The plates were then washed as above and incubated for 1.5h at 37°C with 100µl of goat anti-rat IgG (Sigma, USA) or anti-mouse (Sanofi-Pasteur, France) conjugated to peroxidase (1/20000) diluted in PBS-Tween-20. The development and measurement were done as described above.

Sera of infected animals

Ten Fischer F344 rats (Iffa Credo, France) were infected percutaneously with 500 cercariae according to the method previously described (Smithers & Terry, 1965) and reinfected after 9 weeks with 1000 cercariae. Eleven Balb/c mice (Iffa Credo) were infected according to the same method with 50 cercariae. Sera were collected every week. Analysis of the specific antibody response against rSmSP1 was performed by direct ELISA and Western blotting.

Immunolocalization on adult worms

Adult worms were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS pH 7.4, dehydrated and embedded in paraffin. Deparaffinized sections cut at a thickness of 3 μ m were rehydrated and incubated for 30min in a solution of 0.5% ovalbumin (OVA) in Tris-HCl buffered saline (TBS; 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.4) containing 5% decomplexed goat serum. This was followed by incubation with rat anti-rSmSP1 diluted in TBS-0.5% OVA at 1/100 overnight at 4°C. After washes with TBS-0.5% OVA twice for 15 min, FITC-conjugated goat anti-rat IgG (1/50) (Jackson Immunoresearch, USA) was incubated for 30 min at room temperature. After washes in TBS-0.5% OVA, slides were observed with a fluorescence microscope (Axioskop Zeiss, Germany). Rat preimmune serum was used at the same dilution as a control.

RESULTS

Isolation and analysis of genomic DNA clones

The screening of two genomic DNA libraries led to the isolation of two clones. Sequencing of the two *Hind* III (H1 & H2) fragments confirmed the sequence previously described (Cocude *et al.*, 1997) which contained the 3 amino acids (H, D & S) involved in the serine protease active site. This ORF had a 3' extension of 44 aa with a possible STOP codon (TAA). This is supported by the presence of a polyadenylation site (AATAAAA) 35bp downstream. From the 5' side, the ORF was extended up to 289 aa without the presence of a start codon (EMBL Accession number: AJ011561).

Homology with serine proteases

The ORF described above (489 aa) was compared to the combined Swiss-Prot and NBRF-PIRTM-protein databases (DNASar, Madison, WI, USA). Significant sequence identity was found with the human factor I and with the mouse plasma kallikrein (32% and 34.5% identity respectively). The identity was obtained only with a part of the ORF (position 253 to STOP codon) and concerned only the light chain encoding the active site of these serine proteases. The light chain is released by proteolysis after a consensus region containing basic residues and in particular at an arginine (R) residue. The homology with serine proteases was further confirmed when using the PHD secondary structure prediction algorithm (Rost, Sander & Schneider, 1994) based on a multiple sequence alignment with sequences of known serine proteases such as pig elastase precursor and bovine trypsinogen. Results showed that the main elements of secondary structure of serine proteases were correctly predicted in the SmSP1 sequence (data not shown). The most notable homology surrounds the residues of the catalytic site (His, Asp, Ser), including several cysteine, glycine and proline residues. Particularly cysteine residues in SmSP1 sequence at positions 281, 297, 383, 413, 426, 437, 447 and 466 are highly conserved in other serine protease. By comparison with factor I, cysteines 281 and 297, 383 and 447, 413 and 426, 437 and 466 are likely to form disulfide linkage in SmSP1.

Other possible ORFs

The complete sequence of two overlapping genomic clones which spanned 7kb (sequence not shown) was further analysed for the presence of other possible ORF. Thus, ORF larger than 150 bp were compared to the protein databases used above. No significant homology was found. However, the ORF described above presented a comparison of a possible coding region 165 bp (from 199 to 226 aa) before the arginine residue (R) mentioned above, with the human LDL receptor class A repeat sequence present in extracellular domain (Yamamoto *et al.* 1984). This repeat structure is composed of 6 cysteine residues which are also found in the heavy chain sequence of factor I and human component C9 (Catterall *et al.* 1987). Figure 1 represents a comparative scheme between factor I and SmSP1.

Detection of ORF by RT-PCR

In order to check whether ORF described above are effectively transcribed, we purified mRNA from adult worms and treated it with DNase before RT-PCR experiments. Using specific primers, we were able to isolate and to characterize a cDNA of 744bp (Fig.2 lane 1) whose sequence was identical to the sequence obtained from the genomic clone. On the contrary, we were unable to show the transcription of the LDL-like region (Fig. 2 lane 2). RT-PCR controls containing all components without template did not give any amplification products (Fig. 2).

Expression of native protein at different life-cycle stages

In our previous study, we showed the presence of mRNA corresponding to SmSP1 in cercariae and adult worms, and the native protein (35 kDa) in adult worms.

To extend these observations and to check whether the native protein is stage-specific and/or differentially regulated, we measured the expression of the protein level in different stages by capture ELISA. Fig.3A shows that the SmSP1 protein is expressed at different stages in *S. mansoni* life-cycle. The maximum of expression is detected in 3h cultured schistosomula, the protein level then decreased after a 18h incubation period. This observation raised the question of a possible release of SmSP1. To test such hypothesis, we investigated the presence of the native protein in SRP (Schistosomula Released Products) obtained from schistosomula cultured for 3h or 18h. The same number of parasites were

incubated for 3 h and 18 h. Fig. 3B shows the detection of the SmSP1 protein in 3h- and 18h-SRP, the concentration of native protein is associated to the number of incubated parasites and decrease after 18h in comparison to a 3h incubation period. Western blotting analysis confirmed the presence of the native protein at 35kDa in SRP (data not shown)

Antibody response to recombinant SmSP1 protein in rat and mice infected with S. mansoni

The presence of SmSP1 protein in SRP *in vitro* led us to investigate whether this protein could be a target to the immune response *in vivo*. Therefore, we followed in a kinetic study the antibody response in sera of infected animals against recombinant SmSP1 protein using ELISA and Western blotting. Both approaches failed to reveal the presence of specific antibodies in infected and reinfected rats (antibody response followed up to 8 weeks after reinfection) or in infected mice (followed up to 12 weeks after infection) (data not shown).

Immunolocalization of the native protein

Immunolabelling presented in Figure 4A using the rat antiserum raised against the rSmSP1 shows a positive signal in the dorsal tubercles covering the cuticle in male worms and in parenchyma in both sexes. The signal was absent from muscle layers and tegument. Control sections incubated with the preimmunized serum did not show any staining (Fig 4B).

DISCUSSION

In the present work, we have isolated two genomic clones which allowed further characterization of a *S. mansoni* serine protease previously described. The deduced amino acid sequence (248 aa), encoding a serine protease designated SmSP1, shows significant homology with two plasma serine proteases, mouse plasma kallikrein (Seidah *et al.* 1990) and human factor I (Catterall *et al.* 1987). These proteases, which belong to the trypsin family, are synthesized as a single chain which is subsequently cleaved in a consensus region containing basic residues and in particular at an arginine (R) residue. This proteolysis releases an active enzyme which has a catalytic domain encoded by the light chain. The homology found between SmSP1 sequence and both proteases is restricted to the light chain and ended at the R residue also present in the SmSP1 sequence in a basic residue region (RVVN). Collectively, these observations suggest that the SmSP1 sequence may be sufficient by itself to constitute an active enzyme and that the missing amino acid sequence from the 5' end may correspond to a peptide signal, unnecessary for the folding of the SmSP1 protein. PHD prediction algorithm based on a multiple sequence alignment showed that the main elements of secondary structure of serine proteases were correctly predicted in the SmSP1 amino acid sequence.

The similarity between SmSP1 and kallikrein deserves some comments. First, previous study have suggested the involvement of kallikrein activity in B cell activation or differentiation. In this context, a kallikrein-like factor, designated glycosylation enhancing factor, may induce IgE-potentiating factor which, in turn, facilitates the differentiation of IgE-B memory cells (Ishizaka, Iwata & Ishizika, 1985). Second, a kallikrein may present an ϵ receptor modulating protein (ϵ RMP)-like activity and is also capable of enhancing IgE and IgG1 by stimulated B cells (Matsushita & Katz, 1993). These observations, in addition to those previously reported (Verwaerde *et al.* 1986, 1988), which showed that serine protease activity present in SRP was involved in the regulation of *in vitro* and *in vivo* IgE synthesis, suggest that SmSP1 may be a potential candidate implicated in the modulation of the immune response. Another possible role may be attributed to SmSP1 because of its homology with the human factor I, known to be involved in complement pathway regulation. The immune evasion mechanisms previously described (Fishelson, 1995) are indeed particularly supported by a cascade of proteolytic activity.

Further examination of nucleic acid sequence revealed an ORF whose amino acid sequence showed a similarity with the class A type repeat of the LDL (Low-Density

Lipoprotein) receptor. This pattern based on six conserved cysteines is present in seven copies in the extracellular domain of the LDL receptor, as well as in complement component C9. Moreover, it is present in two copies in the factor I heavy chain (Catterall *et al.* 1987) upstream of the “light chain”. It is interesting to note that factor I has been considered as a good model to explain the presence of « mosaic » proteins (Dootliffe, 1985). Indeed, factor I presents two chains “captured” from different genes. The heavy chain has homology with the sequence pattern designated as repeat of the LDL receptor and the light chain has homology with serine protease active site domain. The rearrangement of exon units gave the mosaic protein. However, in this study analysis of SmSP1 genomic clones shows that this region is not translated with the light chain in spite of the contiguity of both these sequences (data not shown). In the *S. mansoni* genome it appears that these two domains are not yet translated together although this repeat sequence is found just before the exon encoding the active site.

Using ELISA, we confirmed the expression of SmSP1 in adult worm extracts and showed its presence at different stages in *S. mansoni* life cycle. The lack of stage-specific expression suggests that SmSP1 is required all through the parasite life-cycle. However, the variation of expression suggests that this serine protease is developmentally regulated. *S. mansoni* elastase, another serine protease, is not expressed in adult worms (Pierrot *et al.* 1996) suggesting that these two serine proteases, so far described in *S. mansoni*, are differentially regulated in adult worms. However, their co-expression in schistosomula led us to check whether SmSP1 is secreted as described for cercarial elastase (McKerrow *et al.* 1985). Measurement of SmSP1 in SRP showed that it is indeed released, supporting the idea that SmSP1 could also participate as the elastase in host invasion and /or in parasite protection by evasion of the host immune response.

By its release, SmSP1 may become a potential target to immune response. However, neither Western blotting experiments nor ELISA showed the presence of specific antibody against rSmSP1. In *S. mansoni* elastase, a weak antibody response has been detected in infected monkeys and no enhancement of the immune response was detected following subsequent infections (Toy *et al.* 1987). These observations suggest that these serine proteases are poorly immunogenic and immunological studies using serpin (alpha-1-antitrypsin or Smpi56)-elastase complexes injected into experimental animals showed that resulting antisera contained antibodies to the serpin and to the complex but not to the native elastase (Modha & Doenhoff, 1994; Ghendler, Arnon & Fishelson, 1996). It

seems, therefore, that parasite proteases in a serpin-enzyme complex are inaccessible to the immune response. These observations may account for the poor immunogenicity elicited by the cercarial elastase and probably also for the absence of response against SmSP1.

When sections of male and female worms were examined, intense labelling was observed in parenchyma and in male worms a positive signal was found in dorsal tubercles. This suggests that SmSP1 may be involved in secretion/exchange with the external environment.

In conclusion, in this report we present the deduced amino acid sequence of a serine protease whose amino acid sequence of 248 aa which could be considered as a “light chain” containing the active site. The corresponding native protein is expressed in all stages but seems to be developmentally regulated.

REFERENCES

- AURIAULT, C., OUASSI, M.A., TORPIER, G., EISEN, H. & CAPRON, A. (1981) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunology* **3**, 33-44.
- CATTERALL, C.F., LYONS, A., SIM, R.B., DAY, A.J. & HARRIS, T.J.R. (1987) Characterization of the primary amino acid sequence of human complement control protein Factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochemical Journal* **242**, 849-856.
- CHAPPELL, C.L. & DRESDEN, M.H. (1987) Purification of cysteine proteinases from adult *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **256**, 560-568.
- COCUDE, C., PIERROT, C., CETRE, C., GODIN, C., CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1997) Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease. *Parasitology* **115**, 395-402.
- DALTON, J.P., SMITH, A.M., CLOUGH, K.A. & BRINDLEY, P.J. (1995) Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on. *Parasitology Today* **11**, 299-303.
- DOOTLITTLE, R.F. (1985) The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **233-237**.
- FISHELSON, Z. (1995) Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**, 289-292.
- GHENDLER, Y., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1996) Isolation and characterization of Smp156, a novel serine protease inhibitor. *Experimental Parasitology* **78**, 121-131.
- ISHIZAKA T, IWATA M, ISHIZIKA K. (1985) Release of histamine and arachidonate from mouse mast cells induced by glycosylation-enhancing factor and bradykinin. *Journal of Immunology* **146**, 1880-1887.
- LINDSQUIT, R., SENFT, W., PETTIT, M. & MCKERROW, J. (1986) *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of the major acidic proteinase from adult worms. *Experimental Parasitology* **61**, 398-404.
- MCKERROW, J. H., KEENE, W. E., JEONG, K. H. & WERB, Z. (1983) Degradation of extra cellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I: Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Laboratory Investigation* **49**, 195-200.
- MCKERROW, J. H., & DOENHOFF, M.J. (1988) Schistosome proteases. *Parasitology Today* **4**, 334-340.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1988) Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* **141**, 273-278.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R. & FISHELSON, Z. (1990) *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunology* **12**, 389-401.
- MATSUSHITA, S. & KATZ, D.H. (1993) Biphasic effect of Kallikrein on IgE and IgG1 synthesis by LPS/IL4 stimulated B cells. *Cellular Immunology* **146**, 210-214.

- MODHA, J. & DOENHOFF, M.J. (1994) Complex formation of human alpha-1-antitrypsin with components in schistosoma mansoni cercariae. *Parasite Immunology* **16**, 447-450.
- NEWPORT, G. R., MCKERROW, J. H., HEDSTROM, R., PETITT, M., MCGARRIGLE, L., BARR, P.J. & AGABIAN, N. (1988) Cloning of the proteinase that facilitates infection by Schistosome parasites. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 13179-13184.
- PIERROT, C., GODIN, C. LIU, J.L. CAPRON, A. & KHALIFE, J. (1996) *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during parasite life cycle. *Parasitology* **113**, 519-526.
- PINO-HEISS, S., BROWN, M., & Mc KERROW, J.H. (1985) *Schistosoma mansoni*: degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia. *Experimental Parasitology* **59**, 217-222.
- RAMALHO-PINTO, F.J., CRAZINELLI, S., HOWELLS, R.E., MOTA-SANTOS, T.A., FIGUEIREDO, E.A. & PELLIGRINO, J. (1974) *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Experimental Parasitology* **36**, 360-372.
- ROST, B., SANDER., C. & SCHNEIDER, R. (1994) PHD- an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Computer Applications in Biosciences* **10**, 53-60.
- SEIDAH, N.G., SAWYER, N., HAMELIN, J., MION, P., BEAUBIEN, G., BRACHPAPA, L., ROCHEMONT, J., MBIKAY, M. & CHRETIEN, M. (1990) Mouse plasma kallikrein: cDNA structure, enzyme characterization, and comparison of protein and mRNA levels among species. *DNA and Cell Biology* **10**, 737-748.
- SENFT, A.W., GOLBERG, M.W. & BYRAM, J.E. (1981) Haemoglobinolytic activity of serum in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **30**, 96-101.
- SMITHERS, S.R., & TERRY, R. (1965) The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Journal of Parasitology* **55**, 695.
- STEINBUCH, M. & AUDRAN, R. (1969) Isolation of IgG immunoglobulin from human plasma using caprylic acid. *Revue Française d'Etudes Cliniques et Biologiques*. **10**, 1054-1058.
- SUNG, C.K. & DRESDEN, M.H. (1986) CysteinyI proteinases of eggs: purification and partial characterization. *Journal of Parasitology* **72**, 891-900.
- TOY, L., PETITT, M., WANG, Y. F., HEDSTROM, R. & MCKERROW, J. H. (1987) The immune response to stage specific proteolytic enzymes of *Schistosoma mansoni*. In: *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, vol. **60**, *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*, Alan R. Liss, Inc., W.Y., pp 85-103.
- VERWAERDE, C., AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, M., NEYRINCK, J.L., VENDEVILLE, C. & CAPRON, A. (1986) Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scandinavian Journal of Immunology* **24**, 509-516.
- VERWAERDE, C., AURIAULT, C., NEYRINCK, J.L. & CAPRON, A. (1988) Properties of serine proteases of *Schistosoma mansoni* involved in the regulation of IgE synthesis. *Scandinavian Journal of Immunology* **27**, 17-24.
- YAMAMOTO, T., GEODFFREY DAVIS, C., BROWN, M.S., SHNEIDER, W.J., CASET, M.L., GOLDSTEIN, J.L. & RUSSEL, D.W. (1984) The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* **39**, 27-38.

Acknowledgments

This work was supported by the Unité INSERM U167 and by the MESR ACCSV no. 7. We are grateful to Dr. G. Lippens for his expertise in protein structure and Dr. R.J Pierce for helpful discussions.

We acknowledge the support of Volvic S.A. for maintenance of the Schistosome life-cycle. C.C. is a doctoral fellow of the Institut Pasteur de Lille.

CAPTIONS TO FIGURES

Figure 1: Comparative scheme between factor I and SmSP1. Arrangement of repeat domains, Class A (●) and Class B (■) described in the LDL receptor, in factor I and SmSP1. The arrow indicates the cleavage site between the heavy and light chains. The schematic organization of SmSP1 is presented on the bottom in comparison to human Factor I. The LDL-like domain (○) is not translated in SmSP1.

Figure 2: RT-PCR on DNase pretreated RNA with specific primers based upon SmSP1 sequence. PCR were performed with primer P1 and P2 (lane 1), with P3 and P2 (lane 2) and with primer P1, P2, P3 alone (lane 3, 4, 5 respectively), a PCR control without template was done (lane 6). Lane 1: 100bp ladder (Pharmacia, Sweden).

Figure 3: Expression of native protein corresponding to SmSP1 during the *S. mansoni* life cycle measured by an immuno-capture ELISA. (A) Representative profile of amounts of native protein in ng/mg of total proteins of eggs (1), cercariae (2), 3h (3) and 18h (4) mechanically transformed schistosomula, male (5) and female (6) adult worms. (B) Representative profile of amounts of secreted protein in ng/ml of 3h- and 18h-SRP. The number of incubated parasites was 27 500/ml (■), 15 000/ml (◆) and 8 500/ml (▼).

Figure 4: Immunolocalization of SmSP1 in adult worms. The location of native protein was performed using the rat anti-rSmSP1 (1/100) and FITC labelling. Control was done using preimmune serum. We noted the presence of a male (above) and female (below) adult worms.

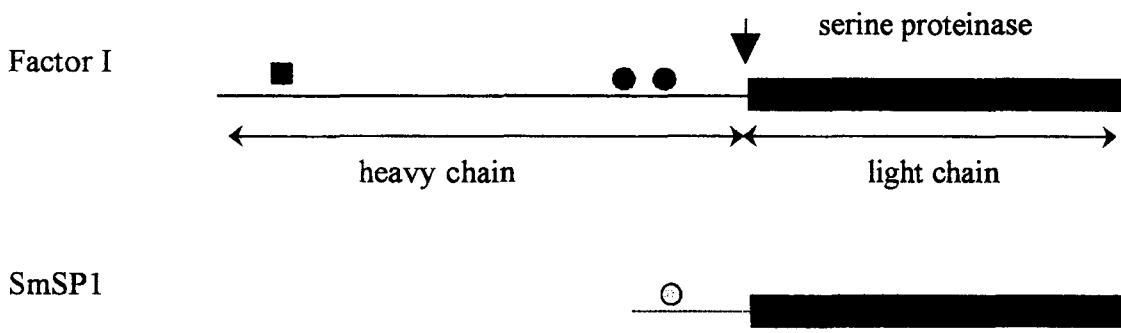


Figure 1

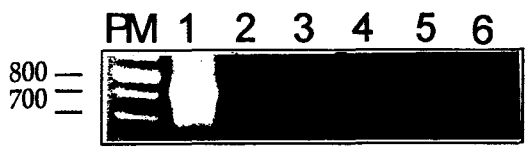


Figure 2

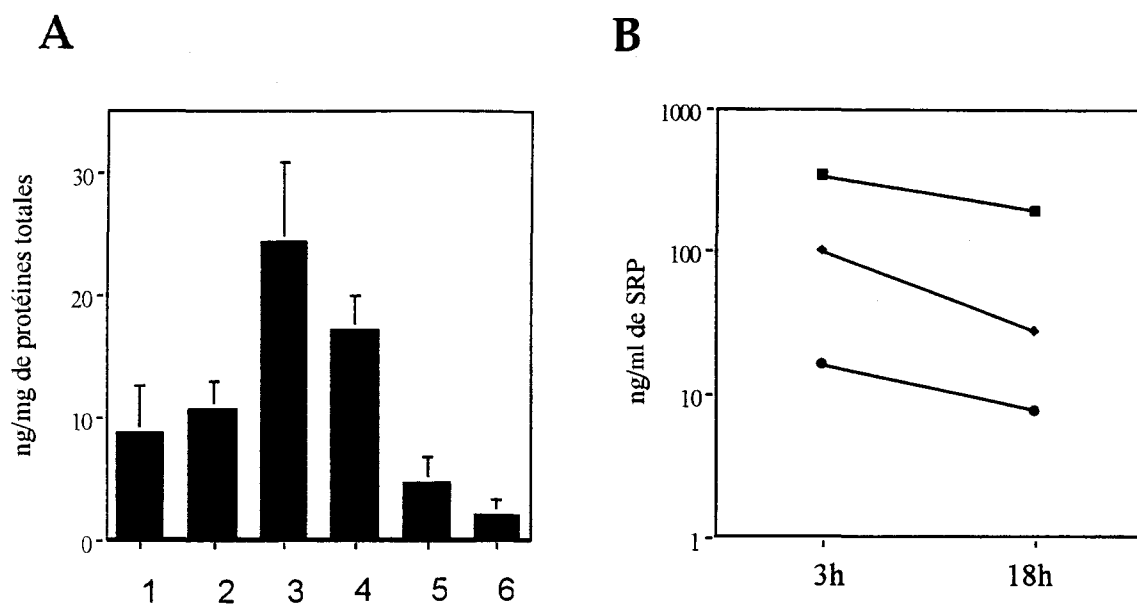


Figure 3

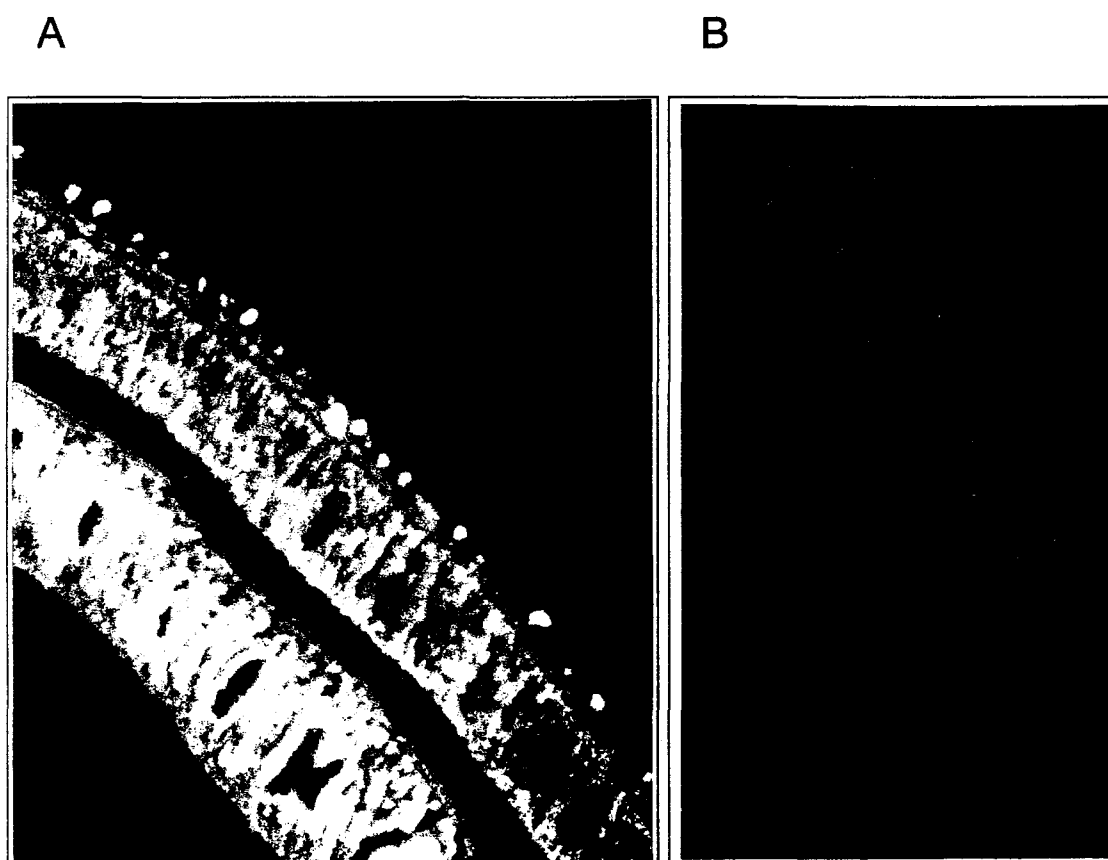


Figure 4

*Table
des matières
&
Liste des figures
et tableaux*

Résumé.....	10
Abréviations.....	11
Généralités.....	12
<i>La Schistosomiase ou Bilharziose</i>	13
1. Le parasite.....	15
1.1 Taxonomie.....	15
1.2 Principales espèces infectant l'homme.....	16
1.3 Cycle parasitaire.....	17
1.4 Hôtes définitifs.....	20
1.4.1 Réservoirs mammaliens naturels	
1.4.2 Modèles animaux	
1.5 Biologie du parasite.....	21
1.5.1 Métabolisme général du schistosome	
1.5.2 Protéines structurales, de choc thermique et les glycoprotéines	
1.5.3 Les protéases et inhibiteurs de sérine protéases	
1.5.4 Génome du parasite	
2. Régions endémiques.....	26
2.1 Distribution mondiale.....	26
2.2 Distribution dans les pays.....	27
2.3 Dynamique des populations de schistosomes.....	28
3. Pathologies associées à la schistosomiase.....	30
3.1 Manifestations cliniques.....	30
3.2 Cas de la bilharziose intestinale à <i>S. mansoni</i>	31
3.3 Le diagnostic.....	32
3.4 Schistosomiasis et co-infections.....	33
3.4.1 Schistosomiase et cancer	
3.4.2 Hépatite virale	
3.4.3 Infections bactériennes	
3.4.4 Virus de l'immunodéficience humaine	
4. Lutttes contre les schistosomiasis.....	35
4.1 L'éducation pour la santé, approvisionnement en eau et assainissement.....	35
4.2 Lutte anti-vectorielle.....	36
4.2.1 Molluscicides chimiques et végétaux	
4.2.2 Lutte biologique	
4.2.3 Aménagement de l'environnement	
4.3 Prophylaxie médicale.....	38
4.3.1 Chimiothérapie	
4.3.2 Stratégie vaccinale	

5. Réponse immune développée au cours d'une infection.....	46
5.1 Immunité concomitante.....	46
5.2 Immunité chez le rat, hôte semi permissif.....	46
5.3 Etudes immuno-épidémiologiques.....	47
5.4 Immunité protectrice de la souris.....	49
5.5 Stratégies de contrôle de la réponse immune développées par le parasite.....	50
5.5.1 <i>Mimétisme</i>	
5.5.2 <i>Appropriation de signaux</i>	
5.5.3 Echappement à la réponse immune	
 <i>Les protéases</i>	 53
1. Les protéases; définition, rôles et fonctions.....	54
1.1 Nomenclature.....	54
1.1.1 <i>Les exoprotéases</i>	
1.1.2 <i>Les endoprotéases</i>	
1.2 Rôles et Fonctions.....	57
1.2.1 <i>La coagulation sanguine et fibrinolyse</i>	
1.2.2 <i>La cascade du complément</i>	
1.2.3 <i>Réponse immune et réponse inflammatoire</i>	
1.2.4 <i>Les protéases et l'apoptose</i>	
1.2.5 <i>Modelage tissulaire</i>	
1.2.6 <i>La digestion intestinale</i>	
1.3 Contrôle de l'expression et régulation de l'activité des protéases.....	68
1.3.1 <i>Contrôle de leur expression</i>	
1.3.2 <i>Régulation de l'activité des protéases par d'autres protéases</i>	
1.3.3 <i>Régulation de l'activité des protéases par les inhibiteurs de protéases</i>	
1.3.4 <i>Conséquences d'une dérégulation de l'activité des protéases et/ou des inhibiteurs de protéases</i>	
2. Les protéases chez les micro-organismes.....	72
2.1 Les protéases chez les bactéries.....	72
2.2 Les protéases dans le monde viral.....	72
2.3 Les protéases des trypanosomides.....	
2.3.1 <i>Cystéines des trypanosomides: facteurs de virulence?</i>	
2.3.2 <i>Les métalloprotéases de surface des trypanosomides</i>	75
2.4 Les protéases de <i>Plasmodium falciparum</i>	76
2.5 Les protéases chez les Helminthes.....	76
2.6 Les protéases : candidats pour une cible chimiothérapeutique?.....	78
3. Les protéases de <i>Schistosoma mansoni</i>	78
3.1 Invasion et migration des larves.....	81
3.2 Protéases du ver adultes: métabolisme et survie.....	83

3.3 Extravasation, excrétion et éclosion des œufs.....	84
3.4 Expression des protéases de <i>S. mansoni</i> au cours du développement	85
3.5 Immunogénicité des protéase de <i>S. mansoni</i>	
3.6 Régulation de la réponse immunitaire de l'hôte par les protéases de <i>S. mansoni</i>	87
3.6.1 <i>Echappement à la réponse immune</i>	
3.6.2 <i>Rôles des protéases dans la potentialisation de la réponse immune</i>	
 Cadre et Objectifs.....	 90
 Matériels et Méthodes.....	 94
1. Matériels.....	95
1.1 Souches parasitaires.....	95
1.2 Souches bactériennes et cellulaires.....	95
1.3 Vecteurs.....	96
1.3.1 <i>Vecteurs phagiques</i>	
1.3.2 <i>Vecteurs d'expression</i>	
1.3.3 <i>Vecteurs utilisés pour le sous-clonage des fragments à séquencer</i>	
1.4 Expression protéique en système eucaryote.....	98
1.5 Animaux.....	98
1.6 Milieux et tampons.....	98
 2. Méthodes.....	 100
2.1 De la PCR au sous-clonage.....	100
2.1.1 <i>Polymerase Chain Reaction ou PCR</i>	
2.1.2 <i>Reverse Transcription-PCR ou RT-PCR</i>	
2.1.3 <i>Sous-clonages</i>	
2.1.4 <i>Transformation bactérienne</i>	
2.2 Du criblage de banques au séquençage complet du gène.....	105
2.2.1 <i>Préparation de cellules compétentes</i>	
2.2.2 <i>Le criblage de banque</i>	
2.2.3 <i>Préparation de sondes radioactives</i>	
2.2.4 <i>Hybridation des membranes</i>	
2.2.5 <i>Préparation d'ADN phagique</i>	
2.2.6 <i>Séquençage</i>	
2.3 Etude de l'expression génique de SmSP1.....	108
2.3.1 <i>Préparation d'ADN génomique</i>	
2.3.2 <i>Southern Blot</i>	
2.3.3 <i>Northern Blot</i>	

2.4 Expression de SmSP1 en système eucaryote et caractérisation de la protéine native correspondante.....	109
2.4.1 <i>Expression et purification de la protéine recombinante</i>	
2.4.2 <i>Obtention d'un antisérum et purification d'IgG</i>	
2.4.3 <i>Préparation d'antigènes de S. mansoni</i>	
2.4.4 <i>Western Blot</i>	
2.4.5 <i>ELISAs</i>	
2.4.6 <i>Marquage métabolique et Immunoprécipitation</i>	
2.4.7 <i>Localisation par immunofluorescence</i>	
2.4.8 <i>Etude de l'antigénicité de la protéine native</i>	
2.5 Expression de la " chaîne légère " de SmSP1 et de l'élastase en cellules d'insectes et caractérisation de l'activité enzymatique	114
2.5.1 <i>Cotransfection</i>	
2.5.2 <i>Clonage</i>	
2.5.3 <i>Amplification virale et production de la protéine recombinante</i>	
2.5.4 <i>Mesure de l'activité enzymatique</i>	
2.5.5 <i>Purification de l'élastase recombinante</i>	
2.6 Mise au point de la purification de la protéine native correspondant à SmSP1.....	116
2.6.1 <i>Préparation d'IgG spécifiques</i>	
2.6.2 <i>Couplage des IgG, préparation des matrices</i>	
2.6.3 <i>Contrôle de la qualité de la colonne</i>	
2.6.4 <i>Réalisation de la chromatographie d'affinité sur des extraits solubles de vers adultes ou SWAP</i>	
Résultats.....	119
1. Identification de nouvelles sérine protéases de <i>S. mansoni</i>	120
1.1 Stratégie de PCR.....	120
1.2 Séquences nucléique et protéique.....	122
1.3 Homologies de séquences.....	124
2. Etude du gène codant pour SmSP1.....	125
2.1 Southern blot.....	125
2.2 Obtention de deux clones génomiques.....	126
2.3 Stratégie de séquençage des deux clones génomiques.....	127
2.4 Homologies de séquence en acides nucléiques	129
2.5 Etude des cadres de lecture ouverts.....	130
2.5.1 <i>Homologies avec les sérine protéases</i>	
2.5.2 <i>Autre cadre de lecture et homologies</i>	

2.6	Détection par RT-PCR des domaines effectivement transcrits.....	136
2.7	Etude de réactivité croisée.....	137
3.	Etude de l'expression de la protéine native correspondant à SmSP1.....	138
3.1	Etude de l'expression de l'ARNm.....	138
3.1.1	<i>RT-PCR</i>	
3.1.2	<i>Northern blot</i>	
3.2	Etude de l'expression de la protéine native au cours du cycle évolutif de <i>S. mansoni</i>	140
3.2.1	<i>Expression de protéines recombinantes</i>	
3.2.2	<i>Obtention d'un antisérum dirigé contre rSmSP1 et purification d'IgG spécifique</i>	
3.2.3	<i>Etude de l'expression de la protéine native au cours du développement de S. mansoni</i>	
3.2.4	<i>Marquage métabolique</i>	
3.2.5	<i>Immunolocalisation de la protéine native chez le ver adulte</i>	
3.2.6	<i>Etude de l'antigénicité de la protéine native</i>	
4.	Mise au point de la purification de la protéine native correspondant à SmSP1.....	149
4.1	Purification d'IgG spécifiques.....	149
4.2	Couplage des IgG, préparation des matrices.....	150
4.2.1	<i>Couplage des IgG activées par le periodate</i>	
4.2.2	<i>Couplage des IgG sur Sépharose activée</i>	
4.3	Réalisation de la chromatographie d'affinité.....	151
4.3.1	<i>Contrôle de la qualité des matrices</i>	
4.3.2	<i>Passage des extraits de vers adultes sur la colonne d'affinité</i>	
5.	Expression et caractérisation de l'élastase de <i>S. mansoni</i> produite en cellules d'insectes.....	153
5.1	Détection de l'élastase recombinante.....	154
5.2	Etude de l'activité enzymatique de l'élastase recombinante, caractérisation des substrats dégradés.....	155
5.3	Caractérisation de l'activité enzymatique.....	155
5.3.1	<i>Influence du pH</i>	
5.3.2	<i>Influence d'inhibiteurs ou de chélateurs d'ions divalents</i>	
5.3.3	<i>Effet d'IgG anti-élastase recombinante sur l'activité enzymatique</i>	
5.4	Purification de l'élastase recombinante.....	158

Discussion et Perspectives.....	160
Références bibliographiques.....	173
Annexes.....	193
<i>Article 1</i>	194
<i>Article 2</i>	203
Table des matières et Liste des figures et tableaux.....	222

Liste des figures

Généralités

- Figure 1:** Couple de Schistosome
- Figure 2:** Cycle parasitaire de *S. mansoni*
- Figure 3:** Répartition géographique des différentes espèces de Schistosome (OMS, 1998)
- Figure 4:** Représentation schématique de la cascade de coagulation sanguine
- Figure 5:** Cascades d'activation du complément
- Figure 6:** Expression des protéases de *S. mansoni* au cours du développement

Résultats

- Figure 7:** **A:** Alignement de séquences consensus du site actif (H, D et S) de différentes sérine protéases.
B: Séquences en acides nucléiques des amorces dégénérées choisies à partir des séquences consensus contenant l'histidine et la sérine
- Figure 8:** Analyse sur gel d'agarose des produits de PCR menées sur ADN génomique de cercaires à l'aide des oligonucléotides dégénérés
- Figure 9:** Séquences nucléotidique et protéique du fragment de 467 pb ou SmSP1 amplifié à partir d'oligonucléotides dégénérés sur ADN génomique de cercaires
- Figure 10:** Homologies de séquence entre SmSP1 et d'autres sérine protéases
- Figure 11:** Southern blot sur ADN génomique de *S. mansoni*
- Figure 12:** **A:** Stratégie utilisée pour la caractérisation complète des deux clones génomiques obtenus après criblages de banques
B: Description schématique des stratégies de séquençage des différents fragments
- Figure 13:** Homologies de séquence du fragment (E) et So3'/F
- Figure 14:** Séquences nucléotidique et protéique du cadre de lecture ouvert codant pour SmSP1 après séquençage du clone génomique
- Figure 15:** Alignement des séquences protéiques de SmSP1 avec la kallikréine plasmatique de souris (A) et le Facteur I humain (B).

- Figure 16:** **A :** Séquences répétées du domaine NH₂-terminal du récepteur LDL et séquence consensus
B : Représentation schématique des homologies entre le récepteur LDL, le facteur I et SmSP1.
- Figure 17:** Analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR sur ARN total de vers adultes
- Figure 18:** Analyse en western blot de l'immunoréactivité du sérum anti-rSmSP1 sur la kallikréine pancréatique de porc
- Figure 19:** Analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR menées sur l'ARN total de cercaires et de vers adultes à l'aide d'oligonucléotides spécifiques PC3 et PC4
- Figure 20:** Northern blot sur ARNm de vers adultes de *S. mansoni*. Sonde codant pour SmSP1 (A) et contrôle positif, sonde Sm28GST (B).
- Figure 21:** Analyse sur SDS-PAGE de l'expression de la SmSP1 recombinante en vecteur d'expression pQE 30
- Figure 22:** Analyse en western blot de l'immunoréactivité du sérum anti-rSmSP1 ou du sérum de rat sain sur la protéine recombinante purifiée et sur un extrait d'antigènes totaux de vers adultes
- Figure 23:** **A :** Analyse en ELISA immunocapture de l'expression de la protéine native correspondant à SmSP1 au cours du cycle évolutif de *S. mansoni*
B : Profil représentatif de la quantité de protéine en ng/ml de SRP
- Figure 24:** Immunoprécipitation (IP) de protéines marquées au ³⁵S de vers adultes de *S. mansoni* à l'aide de l'antisérum anti-rSmSP1
- Figure 25:** Marquage par immunofluorescence (IF) de coupes de vers adultes de *S. mansoni* à l'aide de l'antisérum anti-rSmSP1
- Figure 26:** Analyse en SDS-PAGE 15% (coloration au nitrate d'argent) des éluats de la colonne d'IgG anti-rSmSP1 après passage de 8mg de SWAP.
- Figure 27:** Analyse en western Blot de l'expression de l'élastase recombinante de *S. mansoni* par les cellules d'insectes Sf9
- Figure 28:** Etude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique détectée dans le surnageant de culture de cellules d'insectes exprimant l'élastase recombinante de *S. mansoni*
- Figure 29:** Pourcentage d'activité du surnageant de culture de cellules d'insectes exprimant l'élastase (El) en présence d'inhibiteurs spécifiques de sérine protéases et en présence d'EDTA.
- Figure 30:** Activité protéolytique du surnageant de culture de cellules d'insectes exprimant l'élastase recombinante de *S. mansoni* en présence d'IgG anti-élastase produite en système procaryote (*E. coli*) ou d'IgG de lapin sain.
- Figure 31:** Analyse en western blot des différentes étapes de purification de l'élastase (intracellulaire) recombinante de *S. mansoni*, exprimée en cellules d'insectes, par chromatographie d'affinité (p-aminobenzamidine-sépharose).

Liste des tableaux

Généralités

Tableau 1: Antigènes de *Schistosoma mansoni* à potentiel vaccinal retenus par l'OMS.

Tableau 2: Les endoprotéases

Tableau 3: Regroupement des composants du complément en fonction des principales caractéristiques structurales

Tableau 4: Inhibiteurs de protéases plasmatiques

Tableau 5: Protéases décrites chez *S. mansoni*

Matériels et Méthodes

Tableau 6: Souches cellulaires utilisées pour l'expression de la chaîne légère de SmSP1 et de l'élastase en cellules d'insectes

Tableau 7: Souches bactériennes utilisées

Tableau 8: Vecteurs phagiques utilisés dans la construction des banques de *S. mansoni*

Tableau 9: Vecteurs utilisés pour l'expression de la SmSP1 et/ou l'élastase de *S. mansoni*

Tableau 10: Vecteurs utilisés pour le séquençage

Tableau 11: Tampons utilisés

Tableau 12: Milieux utilisés

Tableau 13: Séquences des oligonucléotides dégénérés basées sur les séquences consensus du site actif des sérine protéases

Tableau 14: Séquences des oligonucléotides utilisés en RT-PCR et/ou dans la stratégie de séquençage complet du gène codant pour SmSP1

