

50316-  
1999.  
223

N° d'ordre :

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE**

**THESE DE DOCTORAT**  
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

présentée et soutenue publiquement par

**Pascal DUCLERMORTIER**

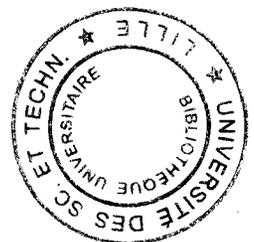
**Caractérisation d'une lectine homologue aux  
sélectines chez le mollusque *Biomphalaria  
glabrata*, hôte de *Schistosoma mansoni*.**

Soutenue le 12 Mai 1999 devant la commission d'examen :

Président : Professeur G. Spik

Rapporteurs : Docteur I. Wolowczuk  
Docteur J.F. Dubremetz

Examineurs : Docteur C. Coustau  
Docteur C. Dissous



Ce travail a été effectué dans l'unité INSERM 167 de l'Institut Pasteur de Lille, dirigé par le Pr. André CAPRON, au sein du laboratoire des "Bases moléculaires de la relation hôte-parasite" sous la responsabilité du Dr Colette DISSOUS.

Le conseil régional Nord/Pas de Calais et l'Institut Pasteur de Lille ont co-financé cette thèse.

*A mes grand-parents*

*A Marie-Christine*

*A Robin*

## REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur André Capron, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis de réaliser ce travail

A Madame le Professeur Geneviève Spik, pour avoir accepté de présider ce jury

A Monsieur le Docteur Jean-François Dubremetz, merci d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et pour l'intérêt porté à ce travail

A Madame le Docteur Isabelle Wolowczuck, merci d'être rapporteur de cette thèse et pour toutes les remarques pertinentes dont tu m'as fait part au cours de ces années

A Madame le Docteur Christine Coustau, tu as gentiment accepté d'être examinateur de ce travail, en espérant que tu y trouveras grand intérêt, merci pour ta compréhension

A Madame le Docteur Colette Dissous, merci de m'avoir accueilli dans ton groupe, pour ta compétence et ta vision de la recherche, pour avoir supporté (de bonne grâce) mes élucubrations

A Madame le Professeur Monique Capron, pour m'avoir apporté son soutien et sa collaboration

Vinca, Aïe!, tu occupes une place à part au firmament de ces années thèse où nos relations ont connus toutes les couleurs de l'arc en ciel! J'ai beaucoup appris à tes côtés et je te dois beaucoup. Combien de fois ai-je voulu t'étrangler (et toi aussi) pour conclure au final qu'il valait mieux embrasser tes joues rebondies (et toi aussi?), mais de nos joutes oratoires est né un profond respect. Merci pour ta fougue, ta générosité, ton fichu caractère (et c'est pas un cadeau), ton soutien, tes "Pâcaaal". Préviens-moi à ton avant-dernier fantasme que je puisse encore fuir,

Ton dévoué dernier fantasme

Esteban, ah! Poutain, oune grandé merssi ; A ton amitié indéfectible au delà des mers ; tu m'as énormément appris et aidé, dans de multiples domaines et je ne cacherai pas l'admiration que je te porte. A nos bouquins, nos blagues, la guitare, à tous les sentiments partagés, aux discussions et bières sans fin...A toi

Mention particulière pour deux adorables pestes dont la générosité et la compréhension m'ont beaucoup apporté :

Sophie, merci pour ton enthousiasme et ton soutien, et surtout tes précieux conseils d'amie, de mère et de femme, ta patience et ton écoute. Merci pour les joujoux pour Robinou (mais dis à ta fille d'arrêter de montrer son c.. à mon fils!)

et

Monica, ma portugaise préférée, la seule que je sache imiter, merci pour mes premiers pas de Salsa, mes quelques mots de portugais (censurés), ton Porto, les bières, tes moments de grandes formes (ouh la la !!) et tes fou rires imprévisibles, et également ton soutien et ton écoute

Bertrand, sacré Cafougnette, merci pour ton support technique et logistique, pour tes cellules, pour avoir vu des bandes là où je ne voyais rien. Merci d'avoir été là dans mes naufrages. Merci d'être aussi bête que moi (si ce n'est plus), à ton rire (idiot), à nos éclats de rire dévastateurs, à nos multiples bières (merci de payer, désolé Sandrine), à nos blagues éculées et autres contrepèteries sinueuses (il y en a une dans la séquence page 90 ), à tes propositions malhonnêtes (mais toujours bien venues). Tiens, j'en ai une petite qui va te faire hurler : qu'est-ce qui fait 29 cm, qui tient dans la main, et qui ne laisse pas indifférent quand on s'en sert?

*ma thèse*

Karine, devant ces années qui ont tissées tant de liens à l'envie entre nous, quel besoin de mots maladroits en guise de remerciements? De longs silences seraient plus éloquents pour exprimer les émotions partagées.

A tout ce que l'on a échangé depuis les bières et tartes aux citrons jusqu'aux larmes, pour une danse inachevée, pour notre quête du graal, pour tes bons et mauvais côtés car tu m'as fait tout voir, pour ton nez aussi!

Merci pour ta foi en moi et la force que tu me donnes, et pour notre empathie.

La chandelle tirant la nuit à sa fin, il est temps de poursuivre l'histoire à mon tour : ...le lapin se tourna vers son ami le lutin qui l'avait accompagné jusque là, "Où iras-tu toi?" lui dit-il, "je vais cueillir des mots pour en faire des bouquets, mais n'ai crainte, nous nous retrouverons pour le dernier acte". Le lapin reprit sa route sous un ciel mauve, dans un parfum de jacinthes porté par le vent...*Le rideau tombe*

Jean-François, fidèle cadet de thèse, merci pour ton soutien constant, ta bonne humeur et ton aide, ton goût pour les sales blagues, courageux relecteur de ma prose doctorale

Jacques, pour ton aide technique et pour tes blagues!

Ane-Carotte, reine du baculovirus, ballotée entre les élucubrations de Cafougnette et son compère, "viens, minloute, que j'te fasse en baise pour en t'n aide et t'franche camaradrie"

Tobias, Ah l'amitié franco-allemande!, mon teuton préféré (malgré ta peau de mouton) qui tricote des tartines de saindoux tout en trotinant sur son tricycle, grand jigueur devant l'éternel

Cécile, gentille chichon, merci d'avoir répondu à mes questions désespérémenturgentedanslestress

Marina, à toutes nos discussion, ta gaieté et ton soutien

Farida, merci pour ta gentillesse et ton aide, même si je t'ai fait peur!

Eric A., ma gallinette, bouniègue!

Merci aux perles des hybridomes, pour leur enthousiasme, leur compétence et leur gentillesse: Josette, grâce à toi j'ai découvert le pore génital du mollusque, quelle expérience! et "Non, J'ai pas peur de toi!"

et

Sophia, pour tes précieux conseils en ELISA et autres discussions

Jean-Lou [Enter] ô défragmenteur fou [Ctrl+Alt]merci pour m'avoir permis de "shooter dans ton zip" [Error] et d'avoir répondu à mes questions informatiques (même si j'ai pas compris les réponses!) [End]

Sophie, merci pour ta précieuse collaboration et tes molécules d'adhérence

François, sans qui la séquence BgSel ne serait pas là aujourd'hui

Didier, merci pour le lièvre de mer

Virginie, Jérôme, Melaine, Véronique, Richard, les gentils stagiaires

Jean-Marc, merci pour ta compétence, ta bonne humeur, et pour m'avoir laisser jouer dans ta pièce noire

Maria, Nadine, Monique, Chantal, Suzanne, Monique, Patricia, Daniel, Myriam, Nicole, Marie-André  
pour les différentes aides techniques

Caroline, pour ton amitié profonde, et pour "Pascal, je dois écrire un article sur le sens de l'Univers, aide-moi c'est urgent pour hier, hiiiiii"

A Damien et Valérie

A Mélanie, Horric, Manu, Lionel, Priscilla, Véronique, Maryève

Et à tous ceux et toutes celles que j'ai oubliés

## PUBLICATIONS

**Duclermortier P**, Lardans V, Serra E, Trottein F, Dissous C. "*Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins." *Parasitology Research* (1999) Sous Presse.

Lardans V, Ringaut V, **Duclermortier P**, Cadoret JP, Dissous C. "Nucleotide and deduced amino-acid sequences of *Biomphalaria glabrata* actin cDNA." *DNA sequence* (1997) 7(6) : 353-356.

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

## COMMUNICATIONS

### Communications internationales

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

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

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

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

### Communications nationales

**Duclermortier P**, Lardans V, Serra E, Dissous C. "Interactions moléculaires entre *Schistosoma mansoni* et son hôte intermédiaire *Biomphalaria glabrata*." 2<sup>ème</sup> Journée des Jeunes Chercheurs, 18 Novembre 1996, Institut Pasteur, Lille.

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

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

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

## **POSTERS**

**Duclermortier P**, Lardans V, Serra E, Aroca E, Dissous C. "Molecular studies of the interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocyte and *Schistosoma mansoni* sporocyst." British Society for Parasitology, Spring Meeting, 1997, Manchester, Royaume-Uni.

Lardans V, **Duclermortier P**, Serra E, Capron A, Dissous C. "*Biomphalaria glabrata* : characterization of the intracellular receptor for activated protein kinase C (RACK)." British Society for Parasitology, Spring Meeting, 1996, University of Wales, Bangor, Royaume-Uni.

**Duclermortier P**, Lardans V, Serra E, Coppin JF, Capron A, Dissous C. "*Biomphalaria glabrata* : étude des récepteurs hématocytaires de type lectine impliqués dans l'interaction avec le parasite *Schistosoma mansoni*." 1<sup>o</sup> Journée des Jeunes Chercheurs, 1995, Institut Pasteur, Lille, France.

Coppin JF, Dissous C, **Duclermortier P**, Lardans V, Serra E, Trolet J, Zemzoumi K. "Bases moléculaires de la relation hôte-parasite et de la signalisation chez les helminthes." Colloque Lille-ULB, 1995, Villeneuve d'Ascq, France.

# SOMMAIRE

Abréviations	11
Généralités : les relations mollusques-trématodes	12
Généralités : les lectines dans la relation mollusque-schistosome	48
Résultats	75
Discussion et perspectives	121
Matériel et méthodes	135
Bibliographie	154
Table des matières	181

## ABBREVIATIONS

$\alpha$ MSH	Melanocyte stimulating hormon
ACTH	Adenocorticotropic hormon
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
Bge	Lignée de cellules embryonnaire de <i>Biomphalaria glabrata</i>
BSA	Sérum albumine bovine
CRD	Carbohydrate recognition domain
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotides
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène phényl diamine tétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNac	N-acétylgalactosamine
Glc	Glucose
GlcNac	N-acétylglucosamine
GST	Glutathion S-transférase
HSP	Heat-Shock Protein
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D Thiogalactoside
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
KLH	Keyhole Limpet Haemocyanin
Le <sup>x</sup>	Lewis x
Man	Mannose
MBL	Mannose binding lectin
MOI	Multiplicité d'infection
MSM	Minimal salt medium
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NeuAc	Acide neuraminique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pfu	Plaue forming unit
PMSF	Phényl Méthyl Sulfonide
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sLe <sup>x</sup>	Sialyl lewis x
SSS	Sterile snail saline
SVF	Sérum de veau foetal
TNF	Tumor Necrosis Factor
X-Gal	5 bromo 4 chloro 3 indolyl $\beta$ D galactopyranoside

**GENERALITES :**

**Les relations mollusques-trématodes**



**Figure 1 : Couple de vers adultes de *Schistosoma mansoni*** (McLaren DJ).

Le mâle plus large est en bas de la photo, la femelle émerge du canal gynécophore du mâle. On distingue les ventouses buccales et ventrales du mâle.(microscopie électronique à balayage).

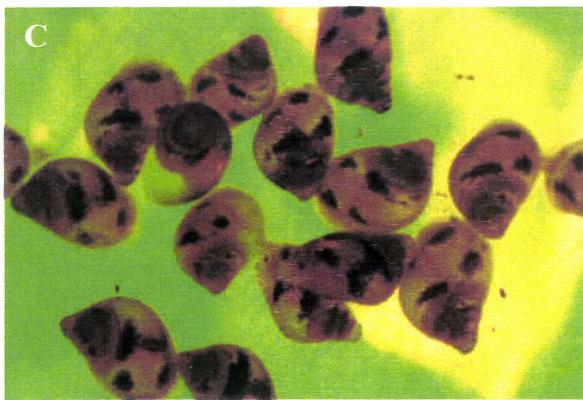
(photo issu de "Topics in International Health, Schistosomiasis", The Trustee of The Wellcome Trust, 1998, CABI publishing.)

## I LA SCHISTOSOMIASE

La maladie engendrée par les schistosomes, la schistosomiase ou bilharziose, est la plus importante infection parasitaire causée par un helminthe : elle affecte 75 pays, avec environ 200 millions d'individus probablement infectés et 500 à 600 millions exposés à l'infection. Cinq espèces de schistosomes sont des parasites pathogènes de l'homme : *Schistosoma mansoni* localisé en Afrique et en Amérique du Sud (**Figure 1**), *S.haematobium* rencontré en Afrique, *S.japonicum* endémique de l'Asie, sont les principales espèces, *S.mekongi* et *S.intercalatum* ont une distribution plus limitée. A côté de l'impact médical causé par ces infections, l'impact socio-économique est alourdi par l'existence de schistosomiasés animales qui affectent le bétail. On peut citer *S.bovis*, *S.spindale*, *S.nasalis* et *S.mattheei* qui sont des parasites des ongulés.

La pathologie est essentiellement causée par le dépôt des oeufs dans différents tissus de l'hôte vertébré. Bien que la majeure partie des oeufs soit expulsée avec les excréments, un nombre important d'oeufs se trouve piégé dans les tissus. Les vers adultes de *S.mansoni* et de *S.japonicum* vivent dans la veine porte et les oeufs se localisent principalement au niveau du foie et de l'intestin. La schistosomiase intestinale se caractérise par la formation de polypes intestinaux. Au niveau du foie les oeufs induisent une réaction granulomateuse évoluant vers une fibrose hépatique. Dans les formes les plus graves, l'hypersplénomégalie et la fibrose généralisée du foie provoquent la formation d'ascite et de varices intestinales et oesophagiennes dont la rupture peut être fatale. Les oeufs de *S.haematobium* sont pondus dans le tractus urinaire et dans une moindre mesure dans le tractus gastrointestinal. Les oeufs induisent des lésions de la vessie et de l'uretère, entraînant une hématurie, une obstruction du flux urinaire, une insuffisance rénale et l'apparition de cancers de la vessie.

Les schistosomes sont des parasites dixénes, transmis par des gastéropodes d'eau douce, hôtes intermédiaires où se produit une importante multiplication asexuée des larves (**Figure 2**). L'infection par la bilharziose requiert à la fois un contact avec le site aquatique des hôtes intermédiaires, une fréquentation des points d'eau par les individus infectés, le tout associé à un faible équipement sanitaire. La prophylaxie contre les schistosomiasés humaines a pendant longtemps été restreinte au contrôle sanitaire, consistant à réduire la contamination du biotope aquatique et à limiter les contacts des populations endémiques avec les points d'eau infestés.



**Figure 2 : Mollusques hôtes de schistosomes.**

A : 1, *Bulinus forskalii* - 2, *Bulinus truncatus* - 3, *Bulinus globosus*, hôtes de *S.haematobium*.

A : 4, *Biomphalaria pfeifferi*, hôte de *S.mansoni*. (Southgate V)

B : *Oncomelania hupensis nosophora*, hôte de *S.japonicum*. (Sonoda E)

C : *Neotricula aperta*, hôte de *S.mekongi*. (Attwood SW)

D : *Biomphalaria glabrata*, hôte de *S.mansoni*.

(photos A, B et C issus de "Topics in International Health, Schistosomiasis", The Trustee of The Wellcome Trust, 1998, CABI publishing.)

L'apparition de médicaments anti-helminthiques a permis le développement de la chimiothérapie et le traitement de la schistosomiase a été grandement amélioré par l'utilisation du Praziquantel, médicament efficace contre toutes les espèces de schistosomes (WHO, 1993). Cependant, depuis quelques années, une tolérance parasitaire au Praziquantel est apparue dans quelques foyers endémiques (Bennet *et al.*, 1997). Des études en laboratoire ont démontré l'apparition d'isolats de schistosomes résistants au médicament (Fallon *et al.*, 1996). Parallèlement aux traitements chimiothérapeutiques, ces vingt dernières années l'identification par différents laboratoires d'antigènes potentiellement protecteurs contre la bilharziose a orienté les recherches vers la mise au point de vaccins. Notre laboratoire a mis en place une stratégie vaccinale basée sur la glutathion S-transférase de 28 kDa de *S.mansoni* (Sm28GST). Le développement vaccinal est actuellement dans les premières phases de son élaboration (essais de phase I pour *S.mansoni* et *S.haematobium*) (Bergquist et Colley, 1998).

Des mesures ont été mises en oeuvre pour combattre la transmission tant sur le plan spécifique, chimiothérapie et contrôle des populations de vecteurs, que sur le plan non spécifique, amélioration du niveau sanitaire et de santé des pays en voie de développement concernés. Dans l'attente d'un vaccin et en l'absence de nouveau médicament, la lutte anti-vectorielle reste une alternative prometteuse pour interrompre la transmission de la maladie (Lardans et Dissous, 1998). Les méthodes de contrôle existantes ont pour but de maîtriser les populations de mollusques des zones d'endémies. Des procédés physiques tels que l'aménagement de l'environnement (assèchements des marigots, canalisation des cours d'eau) ont prouvé leur efficacité en réduisant la transmission de *S.haematobium* et de *S.japonicum* (WHO, 1993). Cependant la modification de l'environnement a entraîné également la création de nouveaux foyers d'infections ; c'est le cas du programme d'irrigation des rives du fleuve Sénégal où la construction du barrage de Diama à l'embouchure du fleuve, tout en supprimant les eaux saumâtres, a permis le développement du mollusque vecteur et l'émergence d'une nouvelle endémie de schistosomiase intestinale (Picquet *et al.*, 1996). Le même scénario se présente pour le barrage d'Assouan sur le Nil ainsi qu'au Ghana et au Mali. En Chine tout porte à croire que la construction du barrage des Trois Gorges sur le Yangtze devrait étendre la zone d'endémie de la province du Hunan (Ross *et al.*, 1997).

L'emploi de molluscicides a été largement étudié (Perret et Whitfield, 1996). Le plus utilisé dans les programmes de contrôle est la niclosamide, composé actif sur les mollusques et sur les larves de schistosomes. Cependant ce produit s'avère coûteux, et de plus il est toxique pour les poissons (WHO, 1993). L'utilisation des molluscicides présente un double

problème, économique et écologique. D'une manière générale, les traitements chimiques ne préviennent pas la recolonisation du site par des mollusques restants et peut entraîner l'apparition de mollusques résistants ou tolérants. Des molluscicides naturels provenant de plantes ont été caractérisés. Toutefois leur toxicité et les problèmes de production à grande échelle ont considérablement limité leur exploitation (Belot, 1993).

D'autres méthodes sont basées sur l'emploi d'agents biologiques. Des prédateurs ont été utilisés avec succès notamment en Martinique (Pointier et Guyard, 1992). L'utilisation de mollusques compétiteurs a été envisagée (*Marisa cornuarietis*, Ruiz-Tiben, 1969; *Ampullaria glauca*, Pointier *et al.*, 1991). Dans de telles études, les meilleurs compétiteurs requièrent souvent les mêmes conditions environnementales que la population cible, et sont souvent des espèces apparentées, résistantes au parasite. Par conséquent, le risque majeur est l'apparition chez ces compétiteurs de mollusques susceptibles. Ce fut le cas avec *Biomphalaria straminea*, normalement résistant à *S.mansoni*, qui a été utilisé pour remplacer *B.glabrata* au Brésil, et chez qui sont apparues des souches capables de maintenir le parasite (Sturrock, 1995).

Depuis quelques années, une nouvelle stratégie de lutte antivectorielle est apparue, sous la forme de l'élimination de l'hôte intermédiaire en le rendant génétiquement incapable de transmettre le parasite. Cette stratégie reste spéculative et n'est envisageable qu'à long terme. Elle nécessite une connaissance élaborée des processus qui gouvernent la compatibilité (susceptibilité/résistance) des mollusques envers les schistosomes, ainsi qu'une connaissance accrue de l'organisation du génome du mollusque et des moyens de le manipuler.

## **II RELATIONS MOLLUSQUES-TREMATODES**

### **A- LES TREMATODES**

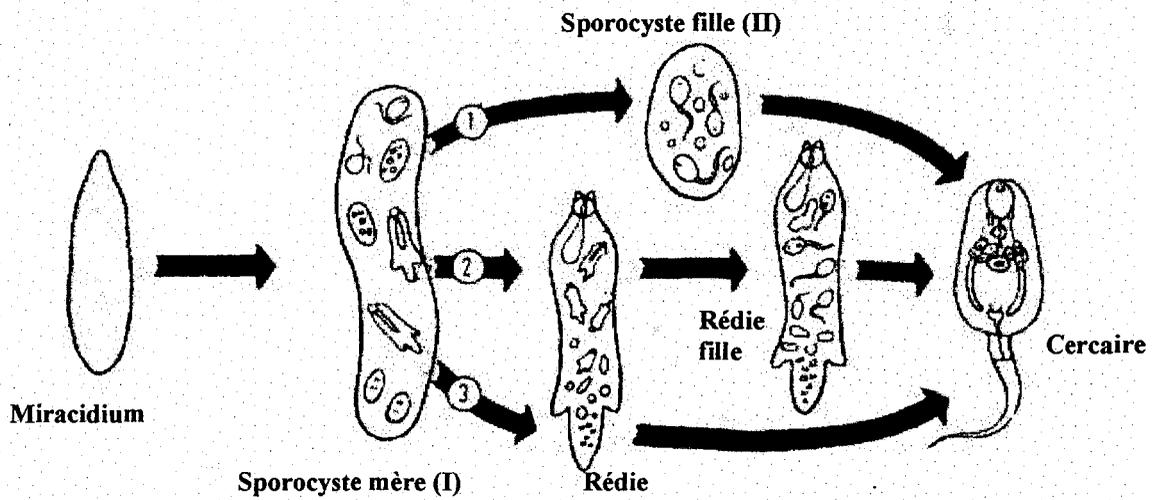
#### **1- Généralités**

Les trématodes appartiennent à l'embranchement des plathelminthes, encore appelés communément vers plats. Ce sont des animaux aplatis dorso-ventralement, sans cavité interne (acoelomates), généralement hermaphrodites, sans système respiratoire ni circulatoire. Les trématodes digènes vivent dans le canal alimentaire des vertébrés ou dans les organes associés, foie, canaux biliaires et pancréatiques, vessie, urètre et poumons, où ils se nourrissent d'aliments tels que le sang, la bile, le mucus et les débris intestinaux. Ils sont aussi

caractérisés par des cycles de vie hétéroxènes complexes. Gibson et Bray (1994) estiment le nombre des parasites trématodes digènes à 4131 espèces réparties dans 119 familles. En dépit de cette grande diversité, ces parasites ont pour trait commun le passage par un hôte mollusque pour le développement de leurs larves. Il est remarquable que parmi le considérable embranchement des mollusques, la plupart des hôtes intermédiaires des trématodes appartiennent à la classe des gastéropodes, et dans une moindre mesure aux classes des bivalves et scaphopodes. Tout porte à croire que l'hôte ancestral unique des digènes était un mollusque (Gibson, 1987). Les ancêtres des trématodes étaient des vers plats à vie libre, qui se sont adaptés très tôt comme parasites des mollusques ; l'association mollusque-trématode était probablement bien établie au début de l'ère paléozoïque (500 millions d'années environ), avec des parasites au cycle de vie ne comportant alors qu'un seul hôte. Les parasites trématodes ont accompagné les mollusques durant des millions de générations, en un processus incessant de coévolution, se différenciant avec leurs hôtes. Certains gastéropodes ont colonisé l'habitat terrestre puis sont secondairement redevenus aquatiques, tout en restant des hôtes de parasites. Ainsi sont apparus les Pulmonés d'eau douce tels que *Biomphalaria*, *Bulinus* et *Lymnaea*, vecteurs des principales espèces de schistosomes. Avec l'apparition des premiers vertébrés, de nombreuses espèces de poissons furent prédateurs de mollusques marins, ingérant accidentellement les trématodes parasites. La sélection favorisa les trématodes capables de survivre et d'atteindre leur maturité sexuelle au sein du tube digestif des poissons, jusqu'à devenir dépendant de ce deuxième hôte. La coévolution des trématodes et de leurs hôtes mollusques et vertébrés a diversifié les cycles de vie de ces parasites, étendant leur habitat à toutes les classes de vertébrés (Basch, 1991). En 1971, Yamaguti estimait de la façon suivante le nombre d'espèces de trématodes vivant au stade adulte chez les vertébrés : 2800 chez les poissons téléostéens, 400 chez les amphibiens, 750 chez les reptiles, 2400 chez les oiseaux et 1200 chez les mammifères.

L'intérêt porté aux pathogènes et parasites de gastéropodes tient essentiellement au rôle de ces mollusques dans la transmission de trématodes d'importance médicale ou vétérinaire. Il ne sera essentiellement question dans ce manuscrit que de deux classes de trématodes digènes : les schistosomes et, dans une moindre mesure, les échinostomes.

La famille des Schistosomatidae constitue un cas à part chez les trématodes, de par leurs sexes séparés et du fait que les adultes vivent dans la circulation sanguine d'animaux à sang chaud, dont l'homme causant la bilharziose.



**Figure 3: Schéma du développement des larves de trématodes**  
(d'après Smyth, 1994).

La famille des Echinostomatidae comprend également des espèces infectant l'homme, causant l'échinostomiase (*Echinostoma ilocanum*, *E.hortense*). Les espèces les plus étudiées chez les mammifères et animaux sont *E.trivolvis*, *E.caproni*, *E.paraensei*, qui sont des modèles utilisés pour les études expérimentales.

## 2- Cycles de vie des trématodes

En général les vers adultes vivent au sein de l'hôte définitif vertébré. Les œufs de trématodes sont expulsés avec les fèces voire avec l'urine ou la salive. Chez certaines espèces, les œufs doivent être ingérés par l'hôte intermédiaire, cependant le plus communément chez les espèces aquatiques, les œufs éclosent après incubation dans l'eau, libérant un miracidium, larve nageuse qui doit rencontrer et pénétrer le mollusque approprié au sein duquel elle pourra se développer. Dans les tissus de l'hôte le miracidium se métamorphose en sporocyste mère ou primaire, larve en forme de sac à la mobilité réduite (**Figure 3**). Depuis l'épithélium germinal qui tapisse la cavité du sporocyste, des grappes de cellules bourgeonnent et donnent naissance au deuxième stade intra mollusque. Chez certaines espèces ces larves sont des sporocystes filles ou secondaires ; chez d'autres espèces ces larves se développent en rédies, qui possèdent bouche, pharynx et tube digestif. Ces rédies se déplacent activement au sein du mollusque et ingèrent des morceaux de tissus. A partir de ces larves secondaires va se produire soit après une ou plusieurs nouvelles générations de larves soit directement, la production de cercaires. Les cercaires sont des larves nageuses qui quittent le mollusque ; selon les espèces différents cas de figures se présentent. Chez certaines espèces telle que *Fasciola hepatica*, la cercaire se fixe à la végétation aquatique et se transforme en métacercaire. Dans d'autres cas, la cercaire pénètre un second hôte intermédiaire qui peut être un mollusque de même ou de différente espèce que le premier hôte intermédiaire, un insecte ou un invertébré aquatique, un poisson. Dans ce cas, la métacercaire se développe ou reste enkystée, attendant d'être ingérée par l'hôte définitif convenable. Un troisième cas de figure est celui emprunté par les schistosomes, où la cercaire pénètre directement l'hôte définitif, supprimant le stade métacercaire (Basch, 1991).

### **3- Les stades larvaires des schistosomes (Figure 4)**

#### **a- Le miracidium**

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

Le miracidium assure le passage entre l'hôte vertébré et l'hôte invertébré. Les mécanismes par lesquels le miracidium va localiser son hôte intermédiaire ont été le sujet d'un nombre considérable d'études ; cependant, les résultats obtenus n'ont pas toujours été concordants. Il apparaît néanmoins que les miracidiums se localisent dans l'environnement de leur hôte intermédiaire en répondant à la fois aux stimuli externes physiques de l'environnement, et aux stimuli chimiques originaires du mollusque hôte.

Le miracidium est couvert de plaques ciliées qui lui permettent de se mouvoir dans l'eau. Généralement à une température comprise entre 24 et 28 °C, le miracidium de *S.mansoni* reste vivant pendant 8 à 12 h (Prah et James, 1977).

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

phototropisme négatif ; parallèlement, leur hôte intermédiaire du genre *Bulinus* se localise plutôt au niveau des fonds et des endroits ombragés (Prah et James 1977).

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

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

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

Plus de 60 composés organiques ainsi que des acides aminés et des ions ( $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ ) se sont révélés chimioattractifs pour les miracidiums de *S. mansoni* et d'autres espèces en laboratoire. Il a été suggéré que le mollusque émettait un complexe indéfini de substances solubles dans l'eau capable de stimuler l'activité des miracidiums et appelé « miraxone » (Chernin, 1970). La miraxone contient en fait de nombreux composés qui attirent les miracidiums comme les acides aminés, les acides gras (MacInnis *et al.*, 1974), l'ammoniaque (Mason et Fripp, 1977) et les amines (sérotonine et dopamine) (Etges *et al.*, 1975) qui sont sécrétées par le pied du mollusque. En 1984, Samuelson a montré que de l'eau conditionnée par *B.glabrata* attirait les miracidiums.

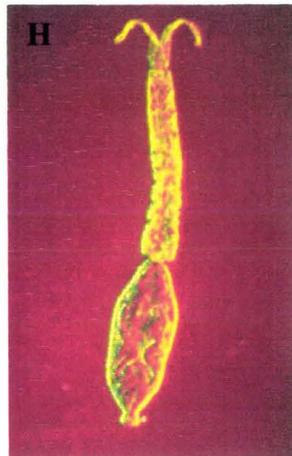
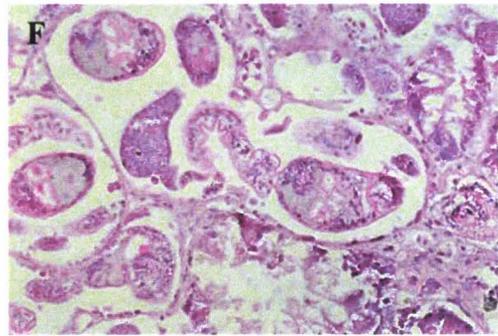
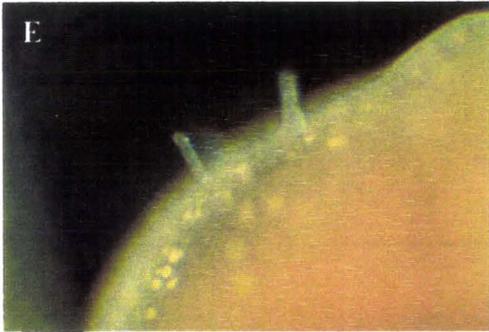
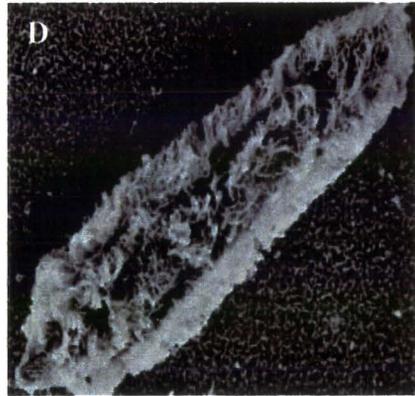
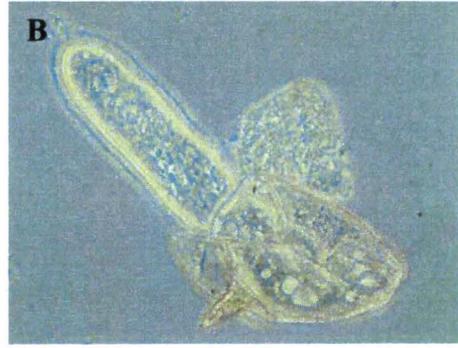
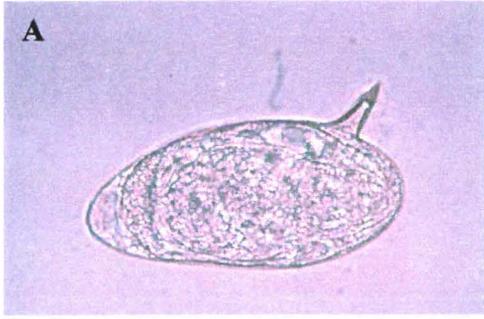
Globalement, compte tenu de la non spécificité des stimuli émis par les mollusques et de la présence de plusieurs espèces de mollusques dans une même niche écologique, on peut supposer que la plupart des miracidiums interagissent avec les hôtes de manière non spécifique (Moné et Combes 1986).

**Figure 4 : Stades larvaires de schistosomes.** (ci-contre).

A : Oeuf, avec éperon latéral. B : Miracidium sortant de l'oeuf (Howells RE).

C : Miracidium (Howells RE). D : Miracidium observé en microscopie électronique à balayage, montrant les plaques ciliées (McLaren DJ). E : Deux miracidium pénétrant un *Biomphalaria glabrata* (Sonoda E). F : Production de cercaire au sein d'un sporocyste secondaire, section de l'hépatopancréas de *Biomphalaria* (Stich A). G : Libération de cercaires (taches brillantes au dessus du mollusque) de schistosomes par un *Biomphalaria* (Striebel HP). H : Cercaire (Butterworth AE).

(photos issus de "Topics in International Health, Schistosomiasis", The Trustee of The Wellcome Trust, 1998, CABI publishing.)



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

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

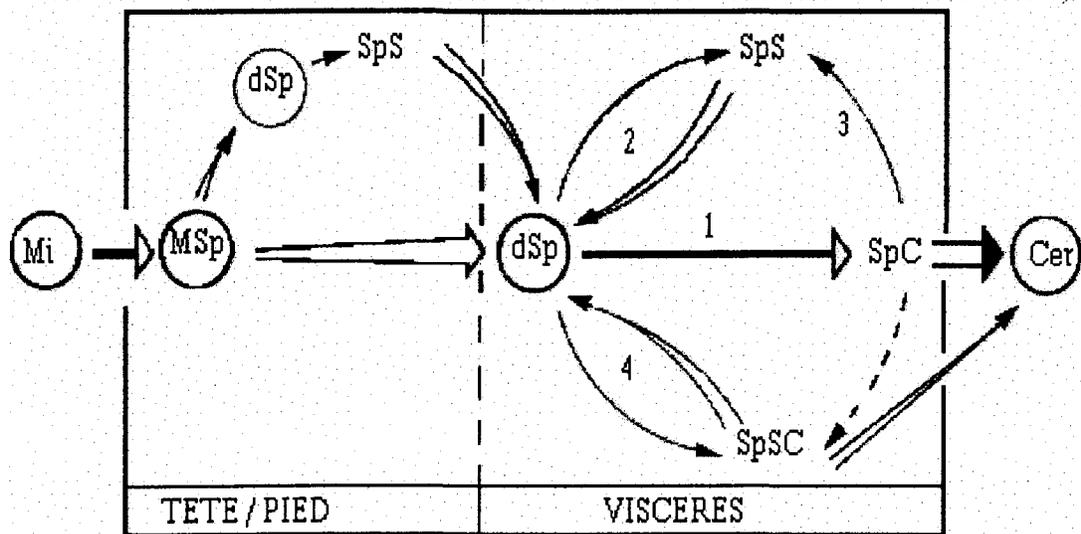
### b- Les sporocystes

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

#### *b 1- Le sporocyste mère*

Chez *S.mansoni*, le miracidium se développe en sporocyste primaire ou sporocyste mère à proximité de son point de pénétration dans le tissu conjonctif subépithélial de la zone céphalopodale (Jourdane, 1982). Le même phénomène est observé chez *S.haematobium* (Capron *et al.*, 1965) alors que dans le cas de *S.japonicum*, il a été observé un envahissement de tous les tissus du mollusque et en particulier des organes cavitaires comme les cavités générales, les cavités viscérales et le coeur (Jourdane et Xia, 1987).

Le nombre de sporocystes mère qui se développent simultanément dans le mollusque est limité dans le couple *B.glabrata/S.mansoni*. Il a été montré que le nombre de sporocystes mère n'excède pas 8 ; si un plus grand nombre de miracidiums infectent le mollusque, ils seront encapsulés (Richards, 1975 ; Kassim et Richards, 1979). Pour l'association



**Figure 5 : Développement des larves de schistosomes au sein du mollusque** (d'après Jourdane et Théron, 1987).

Mi : miracidium ; Msp : sporocyste mère ; dSp : sporocyste fille ; SpS : sporocyste sporocystogène ; SpC : sporocyste cercariogène ; SpSC : sporocyste sporocysto-cercariogène ; Cer : cercaire.

1 : production directe de cercaire ; 2 : production d'une nouvelle génération de sporocyste fille par sporocystogénèse directe ; 3 : production de sporocyste après cercariogénèse ; 4 : sporocysto-cercariogénèse.

*S.haematobium/Bulinus*, les mêmes observations ont été rapportées avec un nombre de sporocystes mère par individu allant de 2 à 8 (Capron *et al.*, 1965). Chez *O.hupensis*, le nombre de sporocystes mères de *S.japonicum* peut atteindre 32 par mollusque (Jourdane et Xia, 1987).

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

- lors d'une première phase, les cellules germinales du sporocyste mère augmentent de taille puis se multiplient abondamment

- lors de la seconde phase, les sporocystes fille s'individualisent à partir de « clusters » embryonnaires sphériques constitués de cellules germinales et somatiques (Schutte, 1974).

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

#### *b 2- Le sporocyste fille*

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

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

La sporocystogénèse peut être directe ou se produire après la cercariogénèse. Lors de la sporocystogénèse directe, les sporocystes secondaires vont produire de nouveaux sporocystes ; ces derniers sont de plus petite taille avec peu de sporocystes dans leur cavité et leur localisation est plutôt céphalo-pédiale (Jourdane et Théron, 1987) (**Figure 5**).

La sporocystogénèse intervenant après la cercariogénèse nécessite un arrêt de la production de cercaires dû à la dégénérescence des embryons cercariens dans le sporocyste. Le sporocyste fille commence alors à produire une nouvelle génération de sporocystes (Jourdan et Théron, 1987). Dans ce cas, les sporocystes sont totalement développés et se situent généralement dans la glande digestive du mollusque. Les mécanismes par lesquels les sporocystes cercariogènes régressent en sporocystes sporocystogènes sont inconnus et restent à l'heure actuelle inexplicables (Fournier et Théron, 1985).

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

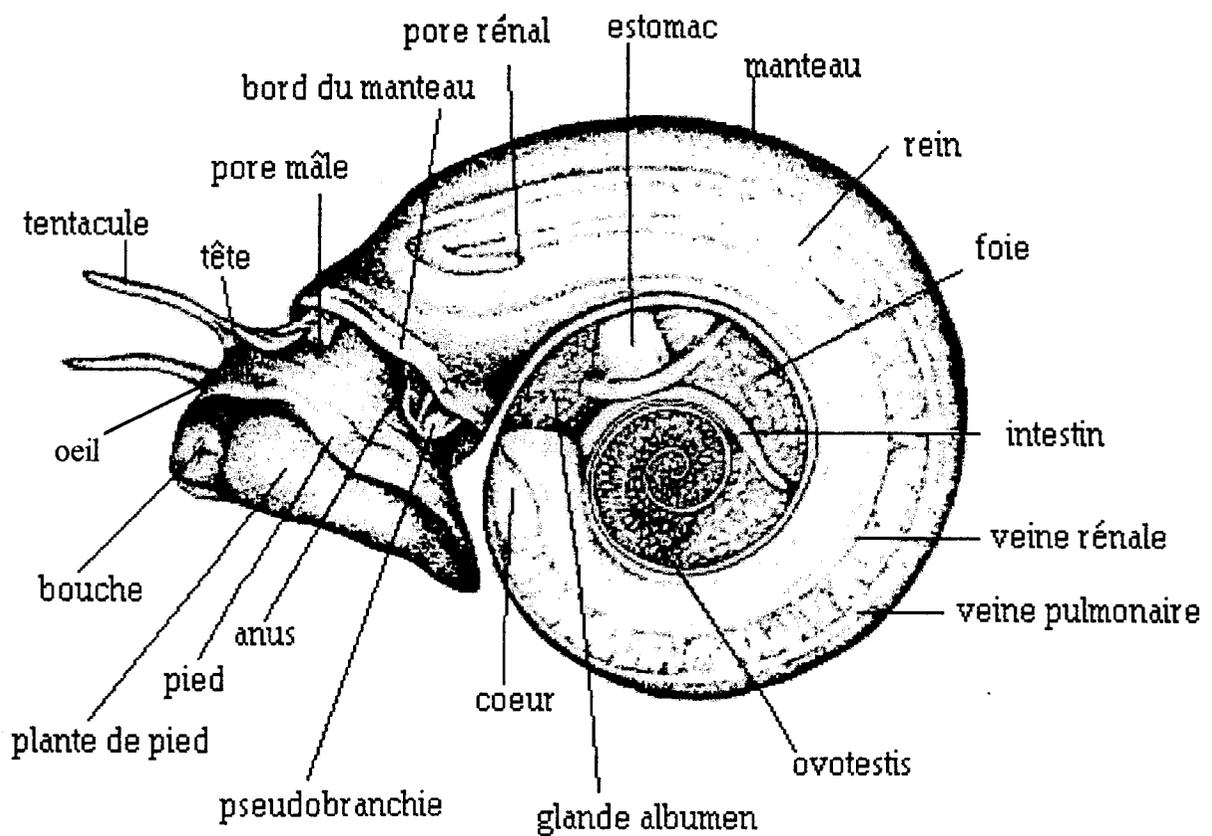
### c- La cercaire

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

La durée nécessaire pour obtenir une production de cercaires à partir du moment de la pénétration du miracidium est variable en fonction de la température ambiante : entre 30 et 35°C, le cycle peut être effectué en 18 jours alors qu'à des températures plus basses plusieurs mois peuvent être nécessaires.

La production de cercaires dépend de facteurs biotiques et abiotiques. La productivité est majoritairement déterminée par l'espèce mais dépend en grande partie également de la compatibilité hôte-parasite. Certains *B.glabrata* infectés par *S.mansoni* sont capables de produire une moyenne de 4600 cercaires par jour avec des maxima journaliers pouvant atteindre 17600. De façon plus générale, l'émission quotidienne de cercaires est de 2000 pour *S.haematobium* et de 1500 pour *S.japonicum* (Webbe, 1965).

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



**Figure 6 : Morphologie générale du gastéropode *Biomphalaria*, côté gauche (d'après Malek, 1985).**

## **B- L'HOTE INTERMEDIAIRE, LE MOLLUSQUE**

### **1- Biologie de *Biomphalaria*, gastéropode pulmoné.**

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

*Biomphalaria glabrata* est un gastéropode pulmoné de l'ordre des Basommatophores. Il vit principalement dans l'eau douce. Sa coquille est plate et discoïde (**Figure 6**).

Il possède une paire de tentacules contractiles à la base desquelles se trouvent les yeux. Le corps de l'animal est divisé en tête, pied, manteau et masse viscérale. Le pied et la tête sont unis pour former la région céphalo-pédiale qui porte les tentacules, les yeux, la bouche et les appareils génitaux. Le manteau entoure le "cou" du gastéropode et recouvre toute la masse viscérale. *B. glabrata* est hermaphrodite.

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

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

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

### **2- Le système de défense interne**

Les invertébrés en général sont capables de se défendre contre les pathogènes, qu'ils soient bactériens, parasitaires voire viraux. Les mollusques possèdent un système de défense interne, notablement différent du système immunitaire décrit chez les mammifères tels que

l'homme et la souris. La distinction majeure est l'absence de lignée lymphoïde et de réarrangement génétique. Il n'y a donc pas de reconnaissance antigénique par anticorps, ni de cellules T et B, ni de mémoire immunologique (Van der Knaap et Loker, 1990).

#### a- préambule : la défense externe

La première défense des mollusques est la barrière mécanique que représente le tégument. La peau est recouverte par un mucus, dont l'une des fonctions est d'empêcher la pénétration par des organismes étrangers. Ce mucus contient également des substances antibactériennes. L'achacine du mollusque gastéropode africain géant, *Achatina fulica*, est un exemple de glycoprotéines bactéricides (Otsuka-Fuchino *et al.*, 1992). Les sécrétions fétides de l'aplysie, *Aplysia juliana*, sont létales pour les crabes prédateurs et inhibent la croissance bactérienne (Kamiya *et al.*, 1989).

#### b- Reconnaissance

Les microorganismes qui pénètrent le tégument d'un mollusque sont reconnus comme non-soi et attaqués par les composants humoraux et cellulaires du système de défense. En l'absence d'anticorps, les lectines semblent assumer les fonctions de reconnaissance du soi et du non soi (Renwartz, 1986). Nous évoquerons peu les lectines dans ce paragraphe puisqu'un chapitre entier leur est consacré dans ce manuscrit (cf. III). Nous donnerons brièvement quelques informations nécessaires à la bonne compréhension de ce chapitre. Les lectines sont des protéines multivalentes qui se fixent avec une haute spécificité aux sucres. Elles se trouvent sous forme soluble dans l'hémolymphe, ou attachées en surface des cellules de défense jouant le rôle de récepteurs. Les résidus saccharidiques répétés tels que les lipopolysaccharides bactériens ou les glucanes et mannanes de levures sont des ligands probables des lectines. Après fixation au non-soi, la lectine transduit un signal d'activation aux composants effecteurs du système de défense, probablement via un changement de conformation (Bayne, 1990).

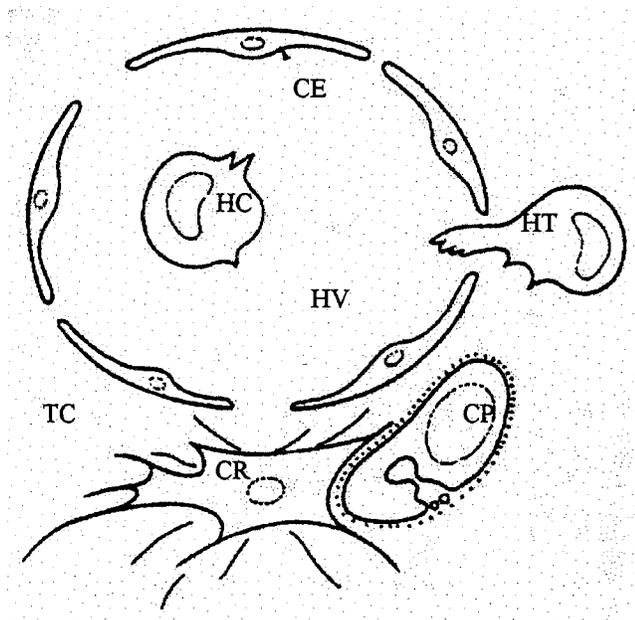
Un mollusque doit faire face à un grand nombre de pathogènes, chacun pouvant exprimer des déterminants saccharidiques différents. En l'absence de recombinaison génétique, chaque individu devrait posséder un grand nombre de gènes codant pour des lectines spécifiques afin de faire face efficacement aux microorganismes étrangers. Cet

inconvenient semble être évité si l'on considère l'organisation structurale des lectines connues chez les mammifères (cf. III-A). En effet, la plupart de ces lectines sont des oligomères constituées de sous-unités identiques ou distinctes, liées de façon covalente ou non-covalente. Cette organisation peut permettre une hétérogénéité des sites de fixation aux ligands ainsi qu'une augmentation de l'affinité de la lectine (Vasta et Ahmed, 1996). L'analyse biochimique des lectines du planorbe *Biomphalaria alexandrina* a démontré l'existence d'une famille d'isolectines, chacune composée d'une combinaison différente de trois sous-unités (Mansour *et al.*, 1995) (cf. III-B-3-b). Des différences de glycosylation d'une même lectine pourraient également modifier sa spécificité ou son affinité (voir l'exemple de *Bulinus*, III-B-3-c). Il semble donc possible qu'un nombre limité de lectines et par conséquent de gènes correspondants, permette l'obtention d'une vaste gamme de reconnaissance des sucres, nécessaire pour l'immunité des mollusques.

Chez la limnée, *Lymnaea stagnalis*, Hoek *et al.* (1996) ont identifié et séquencé un facteur probablement impliqué dans la reconnaissance, désigné sous le terme MDM (Molluscan Defence Molecule). La MDM est produite par les granulocytes, cellules de défense localisées dans le tissu conjonctif tapissant les cavités internes du mollusque. La MDM présente des homologies significatives avec les hémolines d'insectes, facteurs d'agglutination impliqués dans la défense antibactérienne, de la superfamille des immunoglobulines (Sun *et al.*, 1990). La MDM présente cinq domaines immunoglobulines, ainsi que des identités de séquence avec le NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) tout comme les hémolines. Toutefois on ne retrouve pas le motif fibronectin-like ni le motif d'ancrage à la membrane cellulaire du NCAM. La MDM à l'instar des hémolines pourrait être libérée par les granulocytes dans l'hémolymphe comme médiateur de reconnaissance du non-soi.

### c- Les cellules de défense:-Les cellules fixes

Chez les mollusques gastéropodes, on dénombre plusieurs types de cellules de défense (Figure 7). Les cellules "antigen-trapping", cellules endothéliales tapissant les cavités où circule l'hémolymphe, interviennent dans les premières étapes de défense. Elles présenteraient les corps étrangers aux cellules phagocytaires.



**Figure 7 : Représentation schématique des cellules de défense de gastéropode**

(d'après Van der Knaap et Loker, 1990).

CE : cellule endothéliale ; HC : hémocyte circulant ; HT : hémocyte tissulaire ; CP : cellule-pore ;  
CR : cellule à réticulum ; VH : vaisseau de l'hémolymphe ; TC : tissu conjonctif.

Des cellules phagocytaires fixes se trouvent dans le tissu conjonctif. Les cellules à réticulum qui ingèrent les particules étrangères et les cellules-pores impliquées dans l'endocytose et le turn-over des protéines de l'hémolymphe.

Enfin, les hémocytes résidents présent dans différents tissus ont probablement les mêmes fonctions que les hémocytes circulants (phagocytose, encapsulation...). Ils sont très nombreux dans le tissu conjonctif de la région coeur-poumon où certaines zones sont considérées comme un organe hématopoïétique. Toutefois les hémocytes circulants maintiennent leur capacité de division (Sminia et Van der Knaap, 1986).

#### d- Cellules de défense:-les hémocytes circulants

Les intervenants majeurs de la défense cellulaire sont les hémocytes circulants de l'hémolymphe. Du fait d'un système circulatoire ouvert, les hémocytes ont la possibilité de circuler librement au sein des tissus, exerçant une surveillance constante de l'organisme. Les hémocytes répondent à des stimuli chimiotactiques permettant leur recrutement. Ils interviennent dans différents processus ; la réparation tissulaire, la phagocytose des pathogènes, l'encapsulation des corps étrangers, la synthèse de facteurs humoraux.

Les hémocytes présentent une hétérogénéité morphologique et biochimique. Les cellules rondes ou hyalinocytes ont un rapport noyau-cytoplasme élevé, peu de structures lysosomiales, et une faible capacité à s'étaler, à former des pseudopodes et à la phagocytose. Les granulocytes sont des cellules adhérentes, au rapport noyau-cytoplasme faible avec de nombreux granules lysosomiaux, émettant des pseudopodes et capables de phagocytose. L'hétérogénéité des populations hémocytaires est attestée par les études utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les hémocytes de *B.glabrata* (Yoshino and Granath, 1983-1985), ou des lectines de plantes (*Lymnaea stagnalis*-Van der Knaap *et al.*, 1993).

La question du nombre de lignée hémocytaires reste controversée. Pour certains hyalinocytes et granulocytes représenteraient deux lignées distinctes ; hypothèse observée pour *B.glabrata* (Cheng, 1975), pour *Planorbarius corneus* (Ottaviani, 1983) et pour *Lymnaea truncatula* (Monteil et Matricon-Gondran, 1993). Au contraire pour Van der Knaap *et al.* (1993) à propos de *L.stagnalis*, l'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle n'est que le reflet de stades de différenciation différents. Les jeunes cellules sont petites et rondes (8µm), avec peu d'inclusions cytoplasmiques, et deviennent avec l'âge de larges cellules (20µm) riches en organelles. Les facultés d'étalement, d'émission de pseudopodes et la

capacité de phagocytose tendent à s'accroître avec l'âge des cellules, tout comme les activités d'enzymes lysosomiaux. Chez *P. corneus*, Franceschi *et al.* (1991) ont démontré une activité Natural Killer-like uniquement de la part des cellules rondes, capables de lyser des cellules cibles dans un test destiné aux cellules NK.

Après reconnaissance, les hémocytes se rassemblent et adhèrent sur le corps étranger. Selon la taille de l'envahisseur, il sera soit phagocyté par un hémocyte (bactérie), soit encapsulé (trématode incompatible) par une multicouche d'hémocytes puis éliminé par cytotoxicité voire par dommages mécaniques dus aux pseudopodes des cellules.

L'élimination des microorganismes est largement tributaire de la cytotoxicité dépendante des cellules. Les hémocytes différenciés contiennent une gamme d'enzymes lysosomiaux, phosphatases alcalines et acides, estérases, peroxydases, aminopeptidase, lipase. Le contenu des granules lysosomiaux peut varier selon les espèces ou les souches de mollusques. La peroxydase par exemple est absente de certaines souches de *B. glabrata*. Stockées dans les lysosomes, les enzymes sont activement synthétisées lors de la rencontre avec un agent pathogène. Leur action combinée avec une baisse du pH à l'intérieur des phagosomes entraîne une destruction des microorganismes ingérés (Moore et Gelder, 1985). Il semble également que ces enzymes soient libérées dans le milieu extracellulaire ; plusieurs d'entre elles ont été détecté dans l'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata*, lipase, lysozyme et hydrolases (Cheng et Yoshino, 1976 ; Cheng *et al.*, 1977 ; 1978).

Lors de contact avec le non-soi, les hémocytes sont capables de produire des métabolites oxygénés. La présence de NADPH-oxydase, qui transforme l'oxygène moléculaire en réactifs oxygénés, a été détectée chez certains mollusques. Il a été démontré chez de nombreux mollusques que les hémocytes stimulés produisent au sein des phagosomes et à l'extérieur de la cellule des ions superoxyde,  $O_2^-$ , et du peroxyde d'hydrogène. Secondairement ces composés peuvent engendrer des radicaux hydroxyle et des singulets oxygène. La cytotoxicité s'exerce alors par inhibition enzymatique, perturbant le métabolisme, par réaction avec les lipides insaturés, endommageant la membrane, et par dommage génétique. Peroxydase et halides forment des hypohalides qui à leur tour réagissent avec des  $\beta$ -aminoacides, générant des N-halideamines toxiques (Adema *et al.*, 1991). Ces réactifs oxygénés peuvent agir en synergie avec les enzymes lysosomiaux.

## C- INTERACTIONS SCHISTOSOMES-MOLLUSQUES

### 1- La spécificité d'hôte

Un des phénomènes marquants de l'étude des trématodes est leur importante spécificité d'hôte intermédiaire. Sur 55 familles de trématodes digènes étudiées, 15 utilisent uniquement un gastéropode prosobranche, 14 se développent uniquement au sein d'un gastéropode pulmoné, 4 sont restreintes aux bivalves, et 22 peuvent utiliser plus d'un de ces groupes de mollusques (Gibson et Bray, 1994). Depuis l'origine des trématodes digènes, supposée se situer entre 200 et 400 millions d'années, il semble que de nombreuses familles se soient spécialisées afin d'exploiter en particulier quelques lignées de mollusques (Gibson, 1987). Au niveau de l'espèce, un parasite ne peut se développer que chez un nombre restreint d'hôtes, c'est à dire quelques espèces de mollusques d'une même famille voire d'un même genre. Chez les schistosomes, le développement de *S.mansoni* est limité à certaines espèces de planorbes du genre *Biomphalaria*, tout comme celui de *S.haematobium* est limité à quelques espèces du genre *Bulinus* (Rollinson et Southgate, 1987 ; Preston et Southgate, 1994).

Cette spécificité contraste avec la spécificité pour l'hôte définitif qui est beaucoup moins restreinte ; ainsi, si les cycles de vie des schistosomes s'effectuent dans 24 genres de mollusques, ils empruntent par contre 117 genres de vertébrés (Combes *et al.*, 1991).

En réalité la spécificité est encore plus fine, comme il ressort de l'examen des relations entre les schistosomes et leurs hôtes de localisation géographique précise, reflets des variabilités génétiques entre souches d'une même espèce, hôte ou parasite. *S.intercalatum* du Zaïre se développe chez les mollusques du groupe *Bulinus africanus* mais pas au sein du groupe *B.forskalii* ; par contre ce même parasite originaire de Guinée se développe dans le groupe *B.forskalii* et non dans le groupe *B.africanus* (Brown, 1994).

Les conclusions quant à la spécificité d'hôte observé chez les schistosomes ne peuvent être généralisées à tous les trématodes digènes. Certains membres des familles des Dicrocoeliidae, des Paramphistomidae et des Echinostomidae ont une spécificité d'hôte moins prononcées (Adema et Loker, 1997 pour revue). La petite douve du foie, *Dicrocoelium lanceolatum (dendriticum)* est un exemple frappant d'absence de spécificité ou de spécificité perdue ; son développement peut s'effectuer chez trente-huit espèces réparties dans neuf familles (Tarry, 1969). Cependant on ne peut exclure que ce manque de spécificité ne soit en

fait qu'un manque d'information sur des espèces apparentées et regroupées sous le terme *D.lanceolatum*.

La spécificité d'hôte ne peut être attribuée à un éventuel comportement discriminatoire des miracidiumus envers des hôtes inadaptés. Les miracidiumus pénètrent en effet fréquemment des mollusques inappropriés où ils sont détruits par la réponse cellulaire. Cependant il est parfois possible de modifier artificiellement en laboratoire la compatibilité entre larves de parasite et hôte, en supprimant la barrière de pénétration par exemple. Kechemir et Combes (1982) ont pu obtenir le développement et la production de cercaires de *S.haematobium* après transplantation de sporocystes fils chez *Planorbarius metidjensis*, mollusques naturellement non impliqué dans la transmission de ce schistosome mais de la même famille (Planorbidae) que les hôtes naturels de *S.haematobium*.

Un transfert d'un type d'hôte à un autre a pu s'installer en de rares occasions au cours de l'évolution, c'est du moins ce qu'il ressort de l'étude de l'association mollusque-schistosome. En effet si l'on considère les espèces du genre *Schistosoma*, l'on constate que *S.japonicum* et les espèces apparentées se développent chez des prosobranches de la famille des Pomatiopsidae, tandis que toutes les autres espèces (environ 80% du genre) utilisent des gastéropodes pulmonés de la famille des Lymnaeidae ou des Planorbidae. La divergence entre prosobranches et pulmonés précéderait l'apparition des schistosomes, laissant supposer qu'un transfert des hôtes pulmonés aux prosobranches serait intervenu durant la diversification du genre *Schistosoma* (Adema et Loker, 1997a). Ceci expliquerait la profonde distance génétique observée entre les schistosomes dépendant de prosobranches et le reste du genre *Schistosoma*, dépendant de pulmonés. La divergence génétique entre espèces de schistosomes reflète la distance phylogénétique existant entre leurs hôtes mollusques, ce qui indique que le transfert d'hôte est un phénomène rare (Johnston *et al.*, 1993). Autre conséquence de cet événement rare et de la spécificité, la barrière reproductive entre schistosomes ; les hybrides entre schistosomes de mammifères ne se réalisent qu'entre espèces dont les hôtes intermédiaires appartiennent au même genre (Jourdane et Southgate, 1992).

## **2- Susceptibilité/Résistance. Bases génétiques**

La restriction d'hôte pour un parasite peut être due tout d'abord à la nécessité de rencontre et de contact entre les mollusques et les stades infectieux du parasite au sein de leur

microenvironnement. Passé ce stade, l'hôte rencontré peut être inapproprié, inadapté, pour des raisons physiologiques ou biochimiques. Dans ce cas, le parasite invasif dégénère et meurt. Le miracidium peut rencontrer un hôte adapté, c'est à dire réunissant les conditions nécessaires au bon développement du trématode. La réussite ou l'échec de l'installation du parasite va alors dépendre d'une part des capacités du système de défense interne du mollusque, et d'autre part de l'habilité du parasite à lutter contre la réponse de l'hôte. (Van der Knaap et Loker, 1990). Quand le résultat de l'association est la destruction du parasite on parle d'hôte résistant, par opposition à l'hôte susceptible où le trématode survit, se multiplie et accomplit son cycle de vie. Cette capacité à se développer au sein de l'hôte mollusque est désignée sous le terme de compatibilité immunobiologique (Bayne et Yoshino, 1989).

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

- 1) le parasite se développe normalement sans réaction de l'hôte sensible ou compatible
- 2) le parasite échoue à se développer et ne provoque pas de réaction de l'hôte incompatible
- 3) le parasite est reconnu, encapsulé et détruit chez l'hôte résistant
- 4) le développement du parasite aura lieu (généralement après une phase de latence) car les larves sont reconnues, encapsulées mais pas détruites.

Le terrain génétique de l'hôte invertébré a une influence non négligeable sur le succès d'invasion et de développement du parasite. Ainsi, une même souche de *S.mansoni* aura un profil d'infection différent chez les souches de *B.glabrata*. De plus, il semble que la sensibilité soit influencée par l'âge du mollusque. Quatre groupes de mollusques ont été distingués par Richards en fonction de leur sensibilité (**Figure 8**):

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

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

**Figure 8 : Relations entre *S. mansoni* (souche PR-1) et *B. glabrata*** (d'après Richards *et al.*, 1992) : S (sensible) indique une infection avec développement de sporocystes primaires et secondaires ou une production de cercaires ; R (résistant) aucune évidence d'infection après exposition des mollusques aux miracidiums.

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

De plus, l'infection d'une même souche de *B.glabrata* par des souches de *S.mansoni* issues de différentes régions géographiques montre l'influence génétique du parasite sur le processus infectieux. Le déterminisme génétique de l'infectivité du parasite a été mis en évidence chez plusieurs espèces de schistosomes (Wright, 1974 ; Jourdane, 1980).

La compatibilité résulterait de nombreux éléments liés à la diversité génétique des mollusques et des parasites. Un polymorphisme de résistance, côté mollusque, ferait donc face à un polymorphisme de virulence, côté parasite. Ceci laisserait envisager l'existence d'un système similaire à celui rencontré entre les plantes et leurs pathogènes avec une réponse gène pour gène faisant intervenir des gènes de virulence et d'avirulence.

Les mécanismes physiologiques de l'interaction mollusque-trématode ont fait l'objet de nombreux travaux qui suggèrent fortement le rôle de certaines protéines. Ces dernières restent cependant à caractériser. A ce jour, aucun gène impliqué dans les mécanismes de résistance et sensibilité n'a été identifié. Différentes techniques sont actuellement mises en œuvre pour conduire à l'identification de ces gènes. La méthode de RAPD (random amplification of polymorphic DNA) a conduit à l'identification de marqueurs de polymorphismes chez

*B. glabrata*, permettant la distinction entre les phénotypes résistant et susceptible (Larson *et al.*, 1996). L'utilisation de clonage par soustraction (RNA differential display) a permis l'identification de deux ARNm dont l'expression est plus abondante chez une souche résistante que chez une souche susceptible de *B. glabrata*. L'un de ces transcrits présente un polymorphisme de restriction (RFLP) entre souche susceptible et résistante (Miller *et al.*, 1996). Ces premiers résultats suggèrent l'utilisation de ces marqueurs pour l'identification et l'étude des gènes de résistance.

### **3- Impacts physiologiques de l'interaction trématode-mollusque**

Dans la plupart des infections de mollusques par des schistosomes, on constate un accroissement de la taille des individus infectés. Le gigantisme observé chez *L. stagnalis* infecté par *T. ocellata*, qui démarre lors de la production cercarienne par les sporocystes secondaires, correspond à l'accroissement de l'espace occupé par l'hémolymphe, autrement dit l'espace où se développent et se multiplient les parasites. Au contraire chez *B. glabrata* et *B. pfeifferi* infectés par *S. mansoni*, l'accélération de croissance n'est que temporaire, voire même la croissance se trouve finalement réduite chez *B. glabrata*. Ces différences entre *Biomphalaria* et *Lymnaea* seraient relatives au faible taux de production cercarienne chez *Biomphalaria* en comparaison de *Lymnaea* (revue, De jong-Brink, 1995).

L'infection parasitaire affecte le métabolisme des mollusques infectés. Un déclin des taux de glucose, protéines, acides aminés et lipides de l'hémolymphe ainsi que du taux de sucres des tissus, est notable lors d'infection par un schistosome (Kölher et Voight, 1988 ; Thompson, 1990). Dans les deux semaines qui suivent l'infection, il a été constaté une augmentation du volume de la glande digestive de *B. glabrata* parasité (Théron *et al.*, 1992a). Elle est corrélée à une augmentation des réserves de glycogène de la glande digestive qui pourront être utilisées dans les quinze jours suivants lors de la production des cercaires. De plus, le volume occupé par la population de sporocystes est directement fonction du volume de la glande digestive (Théron *et al.*, 1992b). Entre la troisième et la quatrième semaine post-infection, une diminution de 50 % du volume de la glande digestive peut être enregistrée s'expliquant par une diminution des stocks de glycogène (Carter et Bogitsh, 1975).

Dans les modèles *B. glabrata-S. mansoni* et *L. stagnalis-T. ocellata*, le développement des tractus génitaux et l'oviposition sont inhibés par l'infection parasitaire (Meier et Meire-Brook,

1981 ; De Jong-Brink, 1992). Lorsque les mollusques juvéniles sont infectés, ils deviennent stériles. Toutefois lors d'infections à l'âge adulte, il s'ensuit une augmentation de la fécondité rapidement suivie par une très importante diminution (Thornhill *et al.*, 1986 ; De Jong-Brink, 1995). L'inhibition de la fécondité des mollusques infectés par des parasites a été envisagée de plusieurs façons, selon les auteurs. Cette diminution de la fécondité peut être interprétée comme la conséquence de l'appauvrissement en nutriments par les parasites alors que d'autres auteurs pensent qu'il se produit une inhibition de la reproduction imposée par le parasite afin que ce dernier dispose de suffisamment de nutriments pour son développement et sa multiplication (Crews et Yoshino, 1989). Chez *T.ocellata-L.stagnalis*, le schistosome semble indirectement moduler le système de défense interne du mollusque via le système nerveux central (SNC). Des surnageants de culture de sporocystes de *T.ocellata* en présence de ganglions cérébraux de *L.stagnalis* inhibent l'activité phagocytaire d'hémocytes *in vitro* (Amen et De Jong-Brink, 1992). Hordijk *et al.* (1991) ont démontré que sous l'influence du parasite le SNC de la limnée libère un peptide, la schistosomine, antagoniste des hormones gonadotropes femelles. Elle interfère avec la croissance et la fécondité du mollusque. L'apparition de la schistosomine dans l'hémolymphe des animaux infectés coïncide avec l'apparition des cercaires. Ces dernières n'ayant aucun contact avec le SNC, on a supposé que la libération de schistosomine est causée par un facteur humoral provenant des cercaires (De Jong-Brink, 1992). Schallig *et al.* (1992) ont démontré que seul un extrait de cercaires peut déclencher la libération de schistosomine *in vitro* à partir de tissu du SNC. Longtemps considéré comme un neuropeptide, la schistosomine provient en réalité des cellules gliales du tissu conjonctif entourant le SNC. De plus la schistosomine est également libérée dans l'hémolymphe par les hémocytes circulants (De Jong-Brink, 1995). Un facteur à l'activité similaire à la schistosomine est retrouvé chez d'autres mollusques, *B.glabrata* et *B.pfeifferi* parasités par *S.mansoni*. Au contraire, lorsque *L.stagnalis* est parasité par *Diplostomum spathaceum* (de la famille des Diplostomatidae) on ne détecte pas de schistosomine, suggérant que ce type de peptide n'est libéré que lors d'infection par des Schistosomatidae. L'effet de la schistosomine semble spécifique ; en effet l'hémolymphe d'une espèce parasitée n'affecte pas la réponse hormonale d'une autre espèce parasitée (De Jong-Brink *et al.*, 1991). Le facteur parasitaire déclenchant cette modulation de la fécondité et de la croissance via un peptide de l'hôte n'est pour l'instant pas identifié.

#### 4- Mécanismes de défense de l'hôte

Les hémocytes sont capables de se fixer sur les larves de trématodes et de les tuer *in vitro* en absence de plasma (*L.stagnalis/S.mansoni*, Dikkeboom *et al.*, 1988). Ceci indique que les hémocytes peuvent produire seuls les lectines et autres facteurs nécessaires à la reconnaissance et à l'élimination du parasite (Van der Knaap et Loker, 1990). La concentration en hémocytes circulants est différente selon les espèces de mollusques (Adema *et al.*, 1992), mais peut aussi varier en fonction de l'âge (Richards, 1977), de l'infection (Abdul-Salam et Michelson, 1980) et des conditions environnementales (Wolmarans et Yssel, 1988). La concentration en hémocytes ne semble pas un bon indicateur des capacités de résistance ou susceptibilité de l'hôte vis à vis d'un trématode (Granath et Yoshino, 1993).

Les phénomènes de susceptibilité/résistance chez *B.glabrata* pourraient s'expliquer par l'influence de facteurs humoraux impliqués dans la reconnaissance et les mécanismes de destruction dépendant des hémocytes. Bayne *et al.* (1980) ont obtenu la destruction *in vitro* de sporocystes par des hémocytes de *B.glabrata* (PR albino) susceptibles placés dans du plasma de souche résistante (10R2). Le transfert passif de résistance peut également s'obtenir *in vivo* ; l'injection de plasma de la souche résistante (10R2) chez les mollusques susceptibles (PR albino ou M-line) induit une entière protection face à une première infection par *S.mansoni* (Granath et Yoshino, 1984).

La phagocytose est grandement influencée par les composants de l'hémolymphe, et démontre des différences entre souches R et S (Fryer et Bayne, 1996). Le plasma de souche R présente des propriétés d'opsonisation supérieures au plasma de souches S, qui pourraient intervenir dans les phénomènes de compatibilité (Fryer et Bayne, 1989).

Dans les 72h qui suivent la pénétration par le miracidium d'un hôte résistant, un granulome se forme autour des sporocystes, constitué de granulocytes, qui entraîne la destruction du parasite (Cheng et Garrabrant, 1977). L'encapsulation recrute plusieurs couches de cellules étalées, plates, qui englobent le parasite, l'isolant des nutriments de l'hémolymphe. Au niveau ultrastructural, Loker *et al.* (1982) ont observé que les pseudopodes des hémocytes de *B.glabrata* s'insinuent sous le tégument des sporocystes de *S.mansoni*, comme pour désorganiser la surface du parasite. Il est possible que le parasite soit ainsi accessible aux molécules et métabolites cytotoxiques. Les hémocytes phagocytent également les microvilli et

autres parties du tégument. Un compartiment se forme donc autour des larves encapsulées dans lequel les hémocytes peuvent libérer leur contenu cytotoxique (Dikkeboom *et al.*, 1988). Les hémocytes de souches susceptibles ne forment pas d'encapsulation autour des larves de schistosomes compatibles.

L'identification des molécules impliquées dans ces phénomènes pourrait éclairer les différences de réponse entre hémocytes. A ce propos, une étude récente (Davids et Yoshino, 1998) démontre l'implication d'une séquence RGD dans les mécanismes d'étalement et d'agrégation des hémocytes de *B.glabrata*, mécanismes inhibés spécifiquement par le térapeptide RGDS. Ces résultats démontrent que l'adhésion progressive au substrat, nécessaire à l'étalement, à l'émission de pseudopodes et à la mobilité, est médiée par un récepteur membranaire fonctionnellement analogue aux intégrines de vertébrés. Les auteurs ont testé les capacités d'étalement des hémocytes selon leur provenance, mollusques susceptibles ou résistants. Les deux souches réagissent au peptide RGDS, mais l'inhibition d'étalement est obtenue à des concentrations beaucoup plus basses en peptides pour les hémocytes de souches susceptibles que pour ceux de souches résistantes. Soit le récepteur pour la séquence RGD est plus exprimé chez les cellules de mollusques résistants, soit l'affinité dudit récepteur est plus élevée chez les susceptibles. Ces résultats sont à rapprocher des constatations faites sur les capacités d'opsonisation et d'adhérence des cellules des différentes souches de *B.glabrata* (Fryer et Bayne, 1989 ; 1996). Reconnaissance et adhérence sont soumises à l'influence de stimuli affectant l'affinité des récepteurs cellulaires tout comme la présence de ligands spécifiques chez le parasite. En particulier les produits d'excrétion/sécrétion libérés par le parasite (Lodes et Yoshino, 1989) et les "cytokines-like" inflammatoires (IL-1, Granath *et al.*, 1994 ; TNF $\alpha$ , Ouwe-Missi-Oukem-Boyer *et al.*, 1994) produites par le mollusque au cours de l'infection pourraient agir sur la modulation de récepteurs hémocytaires et sur les comportements d'agrégation et de migration des cellules.

## **5-Stratégies d'évasion des parasites**

### **a- Défense**

Face à la réponse cytotoxique de l'hôte que constituent les enzymes lysosomiaux et les radicaux oxygénés, les larves de schistosomes sont pourvues de protéases et d'enzymes neutralisant les composés oxygénés. Les miracidiums de *S.mansoni* stimulent la production

d'ions superoxyde par les hémocytes (Shozawa *et al.*, 1989), toutefois les larves de schistosomes possèdent une superoxyde dismutase qui neutralise l'ion  $O_2^-$  (Connors *et al.*, 1991).

Yoshino *et al.* (1993) ont détecté une activité protéinase dans le milieu de culture de larves de *S.mansoni* ainsi que dans des extraits de miracidiums et sporocystes. Des extraits de sporocystes incubés avec le plasma de *B.glabrata* entraînent une dégradation des protéines de haut poids moléculaire telle que l'hémoglobine. La sécrétion permanente par le sporocyste de produits parasitaires associés à cette activité cystéine protéase suggère l'implication de cet enzyme dans l'établissement de l'infection. Cependant la protection assurée par les enzymes parasitaires est limitée et ne peut rendre compte à elle seule de la compatibilité.

Les sporocystes de deux espèces de schistosomes telles que *T.ocellata*, compatible avec *L.stagnalis*, et *S.mansoni* immunologiquement incompatible avec ce mollusque, sont également résistants aux dommages causés par les radicaux oxygénés et engendrent une production de métabolites oxygénés par les hémocytes de *L.stagnalis*. Néanmoins *in vitro* les sporocystes de *T.ocellata* survivent au contact des hémocytes tandis que les sporocystes de *S.mansoni* sont encapsulés et détruits (Adema *et al.*, 1994).

#### b- Non-reconnaissance et mimétisme moléculaire

Les déterminants glycaniques en surface des larves de trématodes sont des cibles potentielles pour le système de reconnaissance du non-soi de l'hôte. La composition en sucres de surface varie considérablement entre les espèces de trématodes comme en témoignent différents marquages de surface par des lectines (pour revue voir Horak et Van der Knaap, 1997). D'où l'idée selon laquelle les larves de trématodes présenteraient des déterminants non reconnus par les lectines de l'hôte (blind spot), leur permettant en quelques sortes de passer inaperçues. A l'appui de cette hypothèse, l'exemple des mollusques du genre *Bulinus* qui possèdent un groupe de lectines de 135 kDa dont la spécificité varie selon l'espèce. Les espèces de *Bulinus* abritent des espèces distinctes de trématodes, ce qui laisse envisager l'implication de ces lectines spécifiques dans la compatibilité (Harris *et al.*, 1993). Autre argument provenant de l'interaction *B.glabrata/S.mansoni*, on constate une plus large et plus fréquente distribution d'antigènes de sporocystes réagissant de façon croisée avec les hémocytes de souches résistantes qu'avec les hémocytes de souches susceptibles (Granath et

Aspevig 1993). Les auteurs suggèrent que cette réactivité croisée soit impliquée dans la destruction par les cellules des parasites. Cependant les contre-exemples sont nombreux. Ainsi les cercaires de six espèces de trématodes ayant *L.stagnalis* pour hôte et donc exposées au même répertoire de molécules de reconnaissance, montrent des épitopes saccharidiques distincts (Horak et Mikes, 1995). De la même façon les déterminants saccharidiques de surface de *S.mansoni* et *E.paraensei*, parasites de *B.glabrata*, varient considérablement (Uchikawa et Loker 1991).

Pour éviter d'être reconnu par l'hôte, le parasite peut utiliser un "déguisement moléculaire" ("molecular disguise"). Ce "camouflage" du parasite peut s'effectuer par mimétisme moléculaire, phénomène dans lequel le génome du parasite code pour des déterminants semblables à ceux de l'hôte, exprimés en surface du tégument (Damian, 1987), ou par masquage moléculaire qui consiste en l'adsorption de molécules d'hôte en surface du parasite. La compatibilité résulterait alors de l'inefficacité de la surface du parasite à déclencher une réponse de l'hôte. L'acquisition de molécules d'hôte a été démontrée dans l'interaction entre *T.ocellata-L.stagnalis* (Van der Knaap *et al.*, 1985) et dans l'interaction *B.glabrata-S.mansoni* (Yoshino et Boswell, 1986).

L'existence de communautés antigéniques entre le parasite et son hôte sont une démonstration du déguisement moléculaire.

Considérant les lectines comme effectrices de la reconnaissance chez le mollusque, on peut envisager que le déguisement moléculaire des trématodes soit assuré par les sucres. L'utilisation de lectines de plantes a démontré que miracidium et sporocystes partagent des épitopes glycaniques avec des molécules de l'hôte (Yoshino *et al.*, 1977; Zelck et Becker, 1990). *S.mansoni* possède un épitope oligosaccharidique très immunogène porté par de nombreuses protéines et présent aux différents stades du parasite, qu'on retrouve associé chez le mollusque à une protéine de 90 kDa. Cette structure oligosaccharidique a été découverte chez d'autres gastéropodes d'eau douce, hôtes de schistosomes comme *B.truncatus* et *L.stagnalis*, ainsi que non hôte, *L.limosa*; cet épitope a été également identifié dans l'hémocyanine du mollusque marin *Megathura crenulata* (KLH, keyhole limpet hemocyanin) (Dissous *et al.*, 1986). A côté du rôle potentiel des oligosaccharides de surface dans la dissimulation du parasite, il est probable que ces structures seraient essentielles aux trématodes pour leur adaptation rapide aux variations de pression osmotique subies au cours de leur développement.

L'existence d'épitopes communs entre *S.mansoni* et *B.glabrata* a été largement démontrée ; les larves intramollusques présentent des communautés antigéniques avec des macromolécules de l'hémolymphe (Yoshino et Bayne, 1983) et avec les hémocytes (Granath et Aspevig, 1993). Dissous *et al.* (1990) ont démontré l'identité importante entre les tropomyosines de *S.mansoni* et *B.glabrata*. La tropomyosine est associée chez le sporocyste, aux vésicules des crêtes épidermiques, organites destinées à former le futur tégument du sporocyste. Cette localisation permet d'envisager que la tropomyosine parasitaire ne soit pas reconnue comme étrangère par le système de défense interne du mollusque. Cependant on ne peut exclure que ces similarités moléculaires n'aient pas de signification immunobiologique mais qu'elles ne soient que le résultat d'une simple conservation phylogénétique.

Bien qu'il ait été souvent suggéré que ces différentes molécules communes entre le schistosome et le mollusque puissent jouer un rôle dans l'échappement du parasite vis-à-vis de la réponse du gastéropode, il est possible qu'une certaine communauté épitopique entre hôte et parasite corresponde à une convergence phylogénétique et à l'adaptation à un même environnement plutôt qu'à une stratégie d'évasion de la part du parasite (Capron et Dessaint, 1992). De plus comme il a été dit précédemment, certains auteurs envisagent au contraire que la communauté antigénique soit en faveur de l'incompatibilité immunologique entre mollusques et trématodes.

### c- Immunomodulation-Interférence

Des faits exposés précédemment il semble que la survie des schistosomes puisse reposer sur la prévention de reconnaissance débouchant sur une absence de réponse de l'hôte. Néanmoins, indépendamment de l'évitement de reconnaissance, les sporocystes de schistosomes et leurs produits d'excrétion-sécrétion (E/S) inhibent les fonctions hémocytaires telles que la biosynthèse intracellulaire (Lodes *et al.*, 1991), la mobilité (Lodes et Yoshino, 1990), la phagocytose (Amen et de Jong-Brink, 1992 ; Fryer et Bayne, 1990) et l'élimination bactérienne (Nunez *et al.*, 1994), comme le démontrent les études menées sur les couples *B.glabrata-S.mansoni* et *L.stagnalis-T.ocellata*. Les fonctions hémocytaires sont directement modulées ; les résultats sont obtenus d'expériences *in vitro* où les hémocytes sont exposés aux larves intramollusques ou aux E/S provenant de cultures de sporocystes et miracidiums. L'analyse des E/S a permis d'identifier un produit de 105 kDa chez *S.mansoni* responsable de l'inhibition de biosynthèse hémocytaire (Lodes *et al.*, 1991). Chez *T.ocellata* c'est un produit

E/S de 40kDa qui affecte la destruction de bactéries par les hémocytes de *L.stagnalis* (Nunez, 1992).

Les schistosomes affectent le système neuroendocrine de leur hôte intermédiaire de façon considérable, entraînant une croissance démesurée dans certains cas et une castration dans d'autres (cf. II-C-3). Chez le couple *B.glabrata-S.mansoni*, on a détecté par des essais radioimmunologiques la présence chez le mollusque infecté de neuropeptides ACTH,  $\alpha$ -MSH et  $\beta$ -endorphine. L'origine de ces neuropeptides, bien que non détecté chez le mollusque sain, reste à déterminer puisque que ces trois neuropeptides sont également détectés aux différents stades du parasite. L' $\alpha$ -MSH recombinante humaine a un effet direct sur les hémocytes en réduisant leur faculté d'étalement (Duvaux-Miret *et al.*, 1992). Il a aussi été suggéré que les parasites produisent de la morphine, opioïde connu pour provoquer une immunosuppression par inhibition des propriétés d'adhérence des cellules immunitaires (Leung *et al.*, 1995). Toutefois il semble délicat d'envisager l'inhibition de la réponse hémocytaire par un neuropeptide comme un processus spécifique, et par conséquent ce genre d'approche est difficilement applicable aux associations mollusques-trématodes.

Les larves de trématodes digènes interfèrent avec le système de défense de *B.glabrata in vivo* (Lie *et al.*, 1981). Les échinostomes possèdent une capacité d'interférence élevée. Celle des schistosomes bien que plus lente à se mettre en place est toutefois notable. Adema et Loker (1995) ont suivi cinématographiquement l'interaction entre hémocytes et sporocystes de schistosomes ou d'échinostomes. Quand les larves de *E.paraensei* sont placés en présence d'une monocouche d'hémocytes de *B.glabrata*, l'observateur voit se former dans les deux heures un halo autour du parasite, c'est-à-dire une zone dépourvue d'hémocytes. Les cellules adhérentes se sont éloignées du parasite, leur morphologie s'arrondit voire même les hémocytes se détachent de leur support (Loker *et al.*, 1989). Un tel halo n'apparaît pas autour des sporocystes de *S.mansoni*, les hémocytes restent à proximité des larves et se fixent à leur surface.

Les hémocytes de *B.glabrata* R ou S sont capables de se fixer en surface des larves de *S.mansoni*. Au contraire les larves d'*Echinostoma paraensei*, sporocystes et rédies, ne sont pas encapsulées par les hémocytes de *B.glabrata*. *E.paraensei* affecte directement les fonctions hémocytaires ; les hémocytes de *B.glabrata* sains n'adhèrent pas aux sporocystes vivants *in vitro*, mais sont capables d'encapsuler les sporocystes morts. Cette interférence *in vitro* est spécifique de l'interaction avec l'hôte susceptible ; en effet les larves d'échinostomes

n'affectent pas le comportement ni la morphologie des cellules d'un mollusque non hôte tel que *Helix aspersa* (Adema *et al.*, 1994).

Les hémocytes provenant de mollusques infectés par *S.mansoni* ne présentent pas ces altérations comportementales. Cependant les deux genres de trématodes réduisent les capacités phagocytaires des hémocytes, dans les premiers jours de l'infection par un échinostome (Noda et Loker, 1989) mais seulement après quatre semaines pour *S.mansoni* (Abdul-Salam et Michelson, 1980). Ce sont dans les produits d'excrétion/sécrétion (ES) que se trouvent les facteurs responsables de ces interférences avec la réponse hémocytaire. Les ES de culture de sporocystes d'*E.paraensei* inhibent l'adhérence, la phagocytose de même qu'ils empêchent l'encapsulation des sporocystes de *S.mansoni in vitro* (Loker *et al.*, 1992). Dans une moindre mesure, les ES de culture de sporocystes de *S.mansoni* affectent également les fonctions hémocytaires, inhibant la mobilité (Lodes et Yoshino, 1990) et réduisant la phagocytose et la production d'ions superoxyde (Connors et Yoshino, 1990).

#### d- Développement d'une immunité à la réinfection.

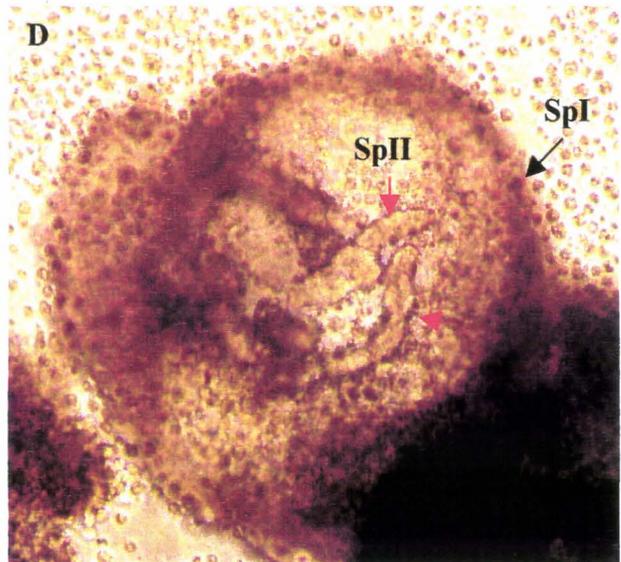
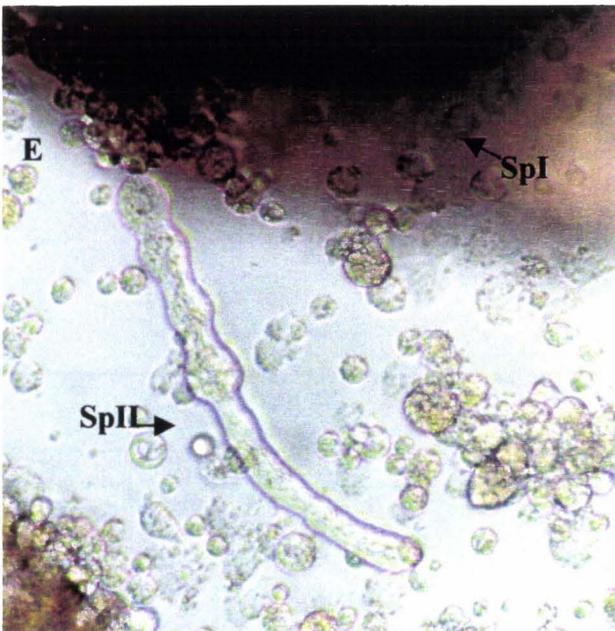
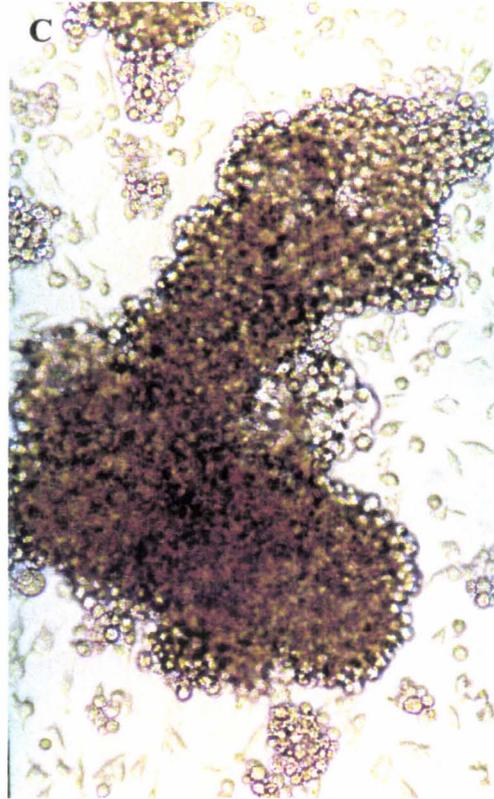
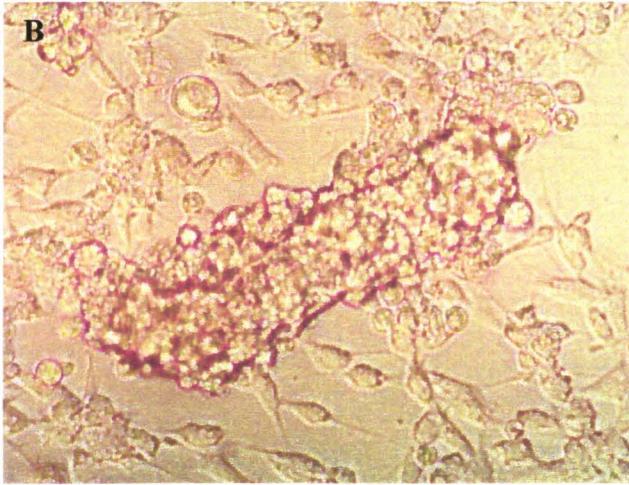
Des expériences réalisées pour étudier l'existence d'une résistance acquise démontrent des différences notables dans la réponse de l'hôte selon l'infection. Des mollusques sont sensibilisés par l'exposition à des miracidiums irradiés ; ceux-ci pénètrent l'hôte et se transforment en sporocystes sans toutefois pouvoir développer de cellules germinales. Les individus ainsi sensibilisés sont soumis ultérieurement à des miracidiums viables et leurs taux d'infection sont comparés à ceux d'individus naïfs soumis à la même condition. Quand il s'agit de miracidium d'échinostomes, on constate un certain degré de résistance acquise. Les parasites irradiés sont encapsulés dans les individus sensibilisés. A leur tour les larves non irradiées sont également encapsulées chez les individus sensibilisés, tandis que chez les individus contrôles ces larves non irradiées se développent normalement. Par contre lorsque l'expérience est réalisée avec des larves de schistosomes irradiées, les parasites s'installent, et bien que ne se développant pas normalement, ils ne sont pas ou peu encapsulés. Dans la plupart des cas, les mollusques soumis à des schistosomes irradiés ne développent pas de résistance pour des expositions ultérieures (Lie *et al.*, 1982).

Cependant les travaux de Sire *et al.* (1998) indique une résistance de *B.glabrata* à la réinfection par *S.mansoni*, sans toutefois déterminer s'il s'agit d'une réelle immunité acquise ou plutôt d'un antagonisme intra-spécifique des larves de *S.mansoni*.

## 6- Les cellules Bge : modèles de coculture et outils de transfection.

L'étude du développement et de la différenciation des larves intra-mollusques, ainsi que l'étude de la compatibilité, sont rendues plus aisées suite à la mise au point de modèles *in vitro* de culture entre cellules de gastéropodes et schistosomes. Une lignée cellulaire dérivée d'embryon de *B.glabrata*, la lignée Bge (Hansen, 1976a), a été utilisée en coculture avec des sporocystes de *S.mansoni* (Yoshino et Laursen, 1995). Le milieu Bge, complété par du sérum de veau fœtal permet le maintien et un développement partiel des sporocystes. Cependant, les larves finissent par dégénérer dans les deux à trois semaines de culture. Lorsque des cellules Bge sont placées dans le milieu, il s'est avéré que les cellules procurent les conditions environnementales nécessaires au développement et à la différenciation des sporocystes : de nombreux sporocystes dégèrent mais d'autres vont survivre et croître. Les auteurs ont ainsi démontré qu'il était possible d'obtenir *in vitro* les différentes étapes du développement intra-mollusque de *S.mansoni*, depuis le stade miracidium jusqu'au stade de sporocystes secondaires.

Au laboratoire, nous disposons de ce modèle de coculture entre cellules Bge et *S.mansoni*. Sur la **figure 9** sont présentées les différentes étapes du développement des larves intra-mollusque que l'on peut observer. Dès les premières heures de la coculture, on constate la présence de quelques cellules isolées, ou en grappes, au contact des sporocystes. Miracidiums et sporocystes semblent se localiser de préférence dans les zones où les cellules Bge sont plus denses. On peut observer le miracidium tentant de pénétrer un amas cellulaire, où il subira sa transformation. En 48 h, les sporocystes sont complètement encapsulés. Cette encapsulation va se poursuivre au cours des semaines suivantes ; les sporocystes vont disparaître sous des amas très importants de cellules. Dans le même temps, la taille des larves s'accroît continuellement. Les observations histologiques et de microscopie électronique de Yoshino et Laursen (1995) montrent que les capsules qui entourent les sporocystes sont constituées de plusieurs couches de cellules rondes aggrégées à la surface des larves. Les cellules forment une association étroite avec le tégument parasitaire, avec des interdigitations entre des extensions cytoplasmiques des cellules et des microvilli du parasite. Les auteurs ont observé les cellules phagocytant les plaques ciliées et des débris provenant de la transformation de la larve.



**Figure 9 : Coculture de cellules Bge et de sporocystes de *S.mansoni*.**

A : Sporocyste de 24h, coculture 0h (x400). B : Sporocyste encapsulé par les cellules, 48h (x400). C : Amas de cellules sur des sporocystes, 3 semaines (x200). D : Sporocyste primaire contenant de nouveaux sporocystes, 5 semaines (x200). E : Sporocyste secondaire libéré du sporocyste primaire (x400).

SpI : sporocyste primaire. SpII : sporocyste secondaire.

Dans les 6 à 7 semaines de coculture, les sporocystes forment des "sacs" au sein desquels l'on peut distinguer des sporocystes secondaires en mouvement. Ces sporocystes secondaires émergent du sporocyste primaire, évoluent quelques jours dans le milieu, puis sont également entourés d'une fine couche de cellules Bge. Ils ont une forme allongée, avec une structure en papille à l'extrémité antérieure et présentent une grande mobilité. Ces sporocystes vont croître durant quelques jours, sans aboutir à un développement ultérieur. D'après Yoshino et Laursen (1995), ils peuvent contenir des grappes de cellules embryonnaires. On n'observe pas de différenciation en cercaires.

Le contact étroit entre cellules Bge et parasites est un prérequis indispensable au bon développement des larves de *S.mansoni*. Notons que des produits sécrétés par les cellules ont un effet positif sur les schistosomes. Des sporocystes primaires peuvent être maintenus en culture dans le milieu Bge/SVF en présence de surnageant de culture de cellules Bge, avec un meilleur développement qu'en milieu Bge/SVF seul, sans toutefois aboutir à l'obtention de sporocystes secondaires. Les cellules Bge semblent donc procurer un microenvironnement physiologique, favorable aux larves intra-mollusques.

La reconnaissance et l'adhésion sont nécessaires au déclenchement des signaux, échangés entre cellules de l'hôte et parasite, qui vont aboutir à l'établissement de la compatibilité. Mais d'autres signaux échangés à distance sont également mis en jeu ; dans certains cas ils peuvent aboutir à un résultat similaire. Les travaux de Coustau *et al* (1997) ont établi la culture *in vitro* de larves de *S.japonicum*, en présence de cellules Bge. Tout comme dans le cas de *S.mansoni*, la coculture permet le passage du stade miracidium au stade sporocyste secondaire. Cependant dans ce cas, aucune encapsulation des sporocystes par les cellules ne se produit. La capacité des cellules Bge à adhérer uniquement aux sporocystes de *S.mansoni* pourrait être interprétée en terme de spécificité d'hôte. Il convient de remarquer que *S.japonicum* et *S.mansoni* sont génétiquement distants. Les environnements biochimiques, physiologiques, où se développent ces schistosomes diffèrent ; *S.japonicum* a pour hôte un prosobranch du genre *Oncomelania*, tandis que *S.mansoni* a pour hôte un pulmoné du genre *Biomphalaria*, dont est issue la lignée Bge. Le comportement des cellules Bge envers les différentes espèces de schistosomes est certainement en relation avec ces différences. Il est possible que des facteurs chimiotactiques ou des récepteurs de surface reconnus par les cellules Bge soient absents chez *S.japonicum*. Une autre hypothèse privilégie

le fait que la grande mobilité des sporocystes de *S.japonicum* pourrait empêcher, pour des raisons mécaniques, l'encapsulation des larves. Toutefois un résultat similaire, développement sans encapsulation, a été obtenu dans des cocultures de sporocystes d'*Echinostoma caproni* et cellules Bge (Ataev *et al*, 1998). Des facteurs solubles libérés par les cellules Bge permettent le développement *in vitro* des sporocystes d'*E.caproni*, jusqu'à une embryogénèse au sein des larves ; néanmoins cette coculture n'aboutit pas à la production d'une seconde génération de larves. Dans le cas d'*E.caproni*, bien qu'utilisant également *B.glabrata* comme hôte intermédiaire, le fait qu'il ne parvienne pas à poursuivre son développement au-delà du stade sporocyste primaire, pourrait être mis sur le compte de l'absence d'encapsulation. Celle-ci ne serait pas imputable à des facteurs mécaniques, les sporocystes d'*E.caproni* ayant une mobilité similaire à celle des sporocystes de *S.mansoni*. Il est possible que la non-reconnaissance des larves par les cellules soit le résultat d'une interférence sur les fonctions cellulaires due à des produits parasites, à l'image de l'inhibition des fonctions hémocytaires décrite dans la relation échinostome-mollusque.

Tout récemment Laursen et Yoshino (1999) ont rapporté la transformation des miracidiums et un début de développement des sporocystes du trématode *Fascioloides magna* en coculture avec des cellules Bge. Là encore, aucune encapsulation des larves ne se produit. Ce trématode utilise pour hôte intermédiaire des gastéropodes de la famille des Lymnéides. Ce nouveau résultat confirme l'existence probable chez les cellules Bge de facteurs de développement communs à différentes espèces de trématodes.

La mise au point de méthode de transfection de la lignée Bge a été entrepris depuis quelques années, dans le but de parvenir à moduler l'expression de gènes impliqués dans les relations hôte-parasite, ou de permettre l'expression de gènes hétérologues qui pourraient influencer cette interaction. Différentes techniques de transfection ont été étudiées au laboratoire (Lardans, 1997). Une transfection transitoire par lipofection a ainsi été mise au point ; elle a permis de démontrer le fonctionnalité de promoteurs hétérologues chez la cellule Bge, en l'occurrence le promoteur constitutif du CMV et le promoteur inductible de l'HSP70 de *Drosophila* (Lardans *et al*, 1996). Des résultats récents démontre l'efficacité du promoteur homologue inductible de l'HSP70 de *B.glabrata* chez les cellules Bge (Yoshino *et al*, 1998).

Ces résultats encouragent le développement de la transformation génétique stable de cellules Bge par intégration d'élément transposable ou de rétrovirus, afin d'établir des lignées exprimant des gènes d'intérêt en vue d'étudier *in vitro* les interactions avec les schistosomes. Bien que la génétique de *B.glabrata* soit la mieux caractérisée de tous les vecteurs de

schistosomes humains, il y a peu d'information disponible sur son génome. Le seul élément d'intégration connue chez *B.glabrata* est un élément de type rétrotransposon-like LINE (long interspersed nuclear element) dont la fonctionnalité n'est pas connue (Knight *et al*, 1992). L'utilisation d'éléments transposables d'insectes connus pour s'intégrer chez d'autres espèces hétérologues a été testée sans succès (Lardans, 1997). L'emploi de vecteurs rétroviraux pseudotypés (à spectre d'hôte étendu) est actuellement envisagée.

Par l'apparition des systèmes de coculture et la mise au point de méthodes de transfection, les cellules Bge constituent un formidable outil pour l'étude des facteurs cellulaires, mais également parasitaires, qui déterminent la compatibilité et la spécificité entre les schistosomes (et échinostomes) et leur hôte gastéropode (Lardans et Dissous, 1998).

## **GENERALITES :**

# **Les lectines et la relation mollusque- schistosome**

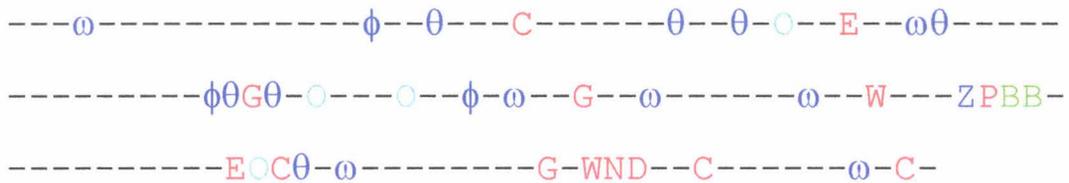
### **III LES LECTINES DANS LA RELATION MOLLUSQUE- SCHISTOSOME**

Lectine, du latin "legere" qui signifie prendre ou choisir.

Les lectines sont définies comme des molécules de nature non enzymatique, ni immunologique, capable de fixer de façon spécifique des structures oligosaccharidiques (Sharon et Lis, 1972). L'attachement au ligand saccharidique s'effectue par un domaine de reconnaissance appelé "Carbohydrate Recognition Domain" ou CRD.

L'existence de nombreuses lectines animales laissent supposer que les domaines oligosaccharidiques des glycoconjugués portent une information biologique, information pondérée par les propriétés physiques des sucres ainsi que par leurs interactions avec les protéines et lipides auxquels ils peuvent être associés. Une fonction des lectines pourrait être de décoder le message porté par les structures sucrées (Drickamer, 1993a). Les lectines reconnaissent des ligands endogènes (soi) ou des ligands exogènes (non-soi). Elles interviennent dans de nombreux processus biologiques mettant en jeu des interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire telles que l'organisation tissulaire et le développement, le métabolisme des glycoprotéines, l'inflammation, la phagocytose, l'attachement microbien...(Drickamer et Taylor, 1993).

Les interactions protéine-sucre sont directement ou indirectement impliquées dans les réactions de défense : directement en tant qu'opsonines, facteurs d'activation du complément, "LPS-binding" protéines, toxines ; indirectement en tant que "homing receptor", molécule d'adhérence, activateur cellulaire (fonction mitogène ou cytokine). De nombreuses fonctions font partie de la phase aiguë de la réponse à l'infection, fonctions de défense et de reconnaissance conservées au cours de l'évolution. L'absence chez les invertébrés des caractéristiques du système immunitaire des vertébrés (immunoglobulines, récepteur T, lymphocytes, mémoire immunitaire), a conduit à considérer les lectines, humorales ou attachées aux cellules, comme les principaux effecteurs de la défense interne des invertébrés. La diversité de reconnaissance est obtenue par l'existence de nombreuses lectines de spécificité distincte. Cette diversité est rendue possible par deux caractéristiques des lectines : la présence de plusieurs sites de liaison par lectine, éventuellement spécifique de différents



**Figure 10 : Motif des lectines de type C** (d'après Drickamer, 1993).

Les résidus strictement conservés sont indiqués en rouge (X).

$\omega$  : résidus aromatiques ou aliphatiques. -  $\phi$  : résidus aromatiques. -  $\theta$  : résidus aliphatiques. -  $Z$ = E ou Q.

Sur la figure ont été ajouté les résidus suivants :  $O$  : groupe carbonyle sur chaîne latérale. -  $B$ = D ou N.

sucres, et pour chaque CRD une spécificité "floue" qui lui permet de fixer des sucres structurellement proches (Vasta *et al.*, 1994).

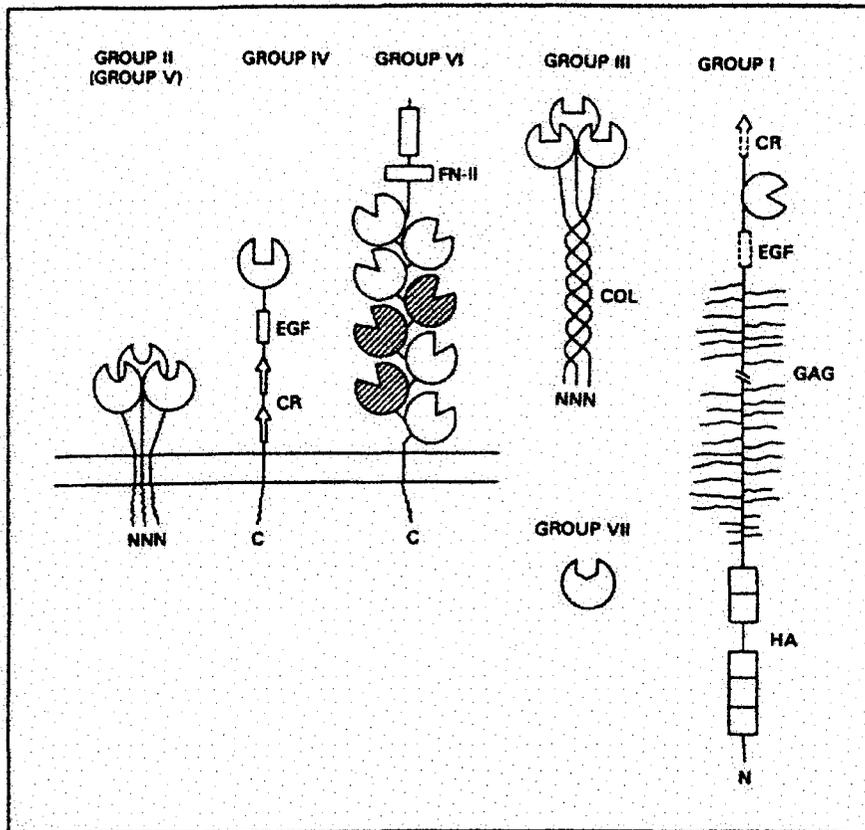
La plupart des lectines sont des oligomères constitués de sous-unités identiques ou distinctes, liées de façon covalente ou non-covalente. Cette organisation peut permettre une hétérogénéité des sites de fixation aux ligands ainsi qu'une augmentation de l'affinité de la lectine. L'organisation moléculaire des sous-unités peut varier selon la nature soluble ou liée à la membrane de la lectine. La plupart des lectines membranaires de vertébrés ont une structure commune aux protéines transmembranaire de type II : un domaine carboxyterminal extracellulaire de taille variable présentant éventuellement des sites de glycosylation, suivie d'une portion hydrophobe transmembranaire et la région aminoterminal intracytoplasmique de taille variable pouvant présenter des sites de phosphorylation. On rencontre moins fréquemment l'orientation de type I où la partie C-terminale est intracytoplasmique. Le(ou les) CRD est(sont) en général situé(s) dans la portion carboxyterminal tandis que le reste des protéines présente des domaines d'autre nature (Vasta et Ahmed, 1996).

Les lectines animales sont classées selon la nature de la séquence peptidique responsable de l'attachement au ligand saccharidique (le CRD).

## **A- LES LECTINES ANIMALES**

### **1- Les lectines de type C**

Les lectines animales de type C se rencontrent dans le sérum, la matrice extracellulaire et les membranes. Ce vaste groupe de lectines est dépendant des ions calcium pour sa fixation au ligand glucidique, d'où le terme "type C". La comparaison des séquences de multiples lectines, de mammifères et d'oiseaux, a permis de définir un motif caractéristique pour le CRD de type C de 115 à 130 amino-acides, comprenant 14 amino-acides invariants (dont quatre cystéines impliquées dans deux ponts disulfures) et 18 résidus hautement conservés (**Figure 10**). Ces résidus interviennent dans la formation des ponts disulfures, dans la liaison aux ions calcium, dans la formation de coude et dans l'établissement d'une poche hydrophobe (Weis *et al.*, 1991).



**Figure 11 : Structures des différents groupes de lectines de type C**

(d'après Drickamer, 1995)

Les groupes II et V sont représentés par la lectine hépatique de poulet. Le groupe IV est représenté par la L-sélectine. Le récepteur au mannose du macrophage constitue le groupe VI. Le groupe III est représenté par la "mannose-binding protein" ou MBP. Le groupe I est constitué de protéoglycans de la matrice extracellulaire. Le groupe VII est représenté par un CRD isolé, sans autre domaine associé.

EGF : domaine de type EGF ; CR : motifs répétés fixateurs du complément ; FN-II : domaine de type fibronectine ; COL : séquences du type collagène ; GAG : glycosaminoglycans ; HA : domaine riche en acide hyaluronique. N : extrémité N terminale ; C : extrémité C terminale.

La fonction des lectines est définie par la nature du/des domaine(s) auxquels le CRD est associé. De plus, on classe ces lectines soit en fonction de l'architecture de la protéine et de la position relative du CRD par rapport aux autres domaines, soit en fonction du degré de similarité entre les CRD (Drickamer, 1993b). Dans les deux cas, on obtient la même classification avec sept catégories, quatre pour les lectines associées à la membrane (groupes II, IV, V et VI) et trois pour les lectines solubles (groupes I, III et VII) (**Figure 11**).

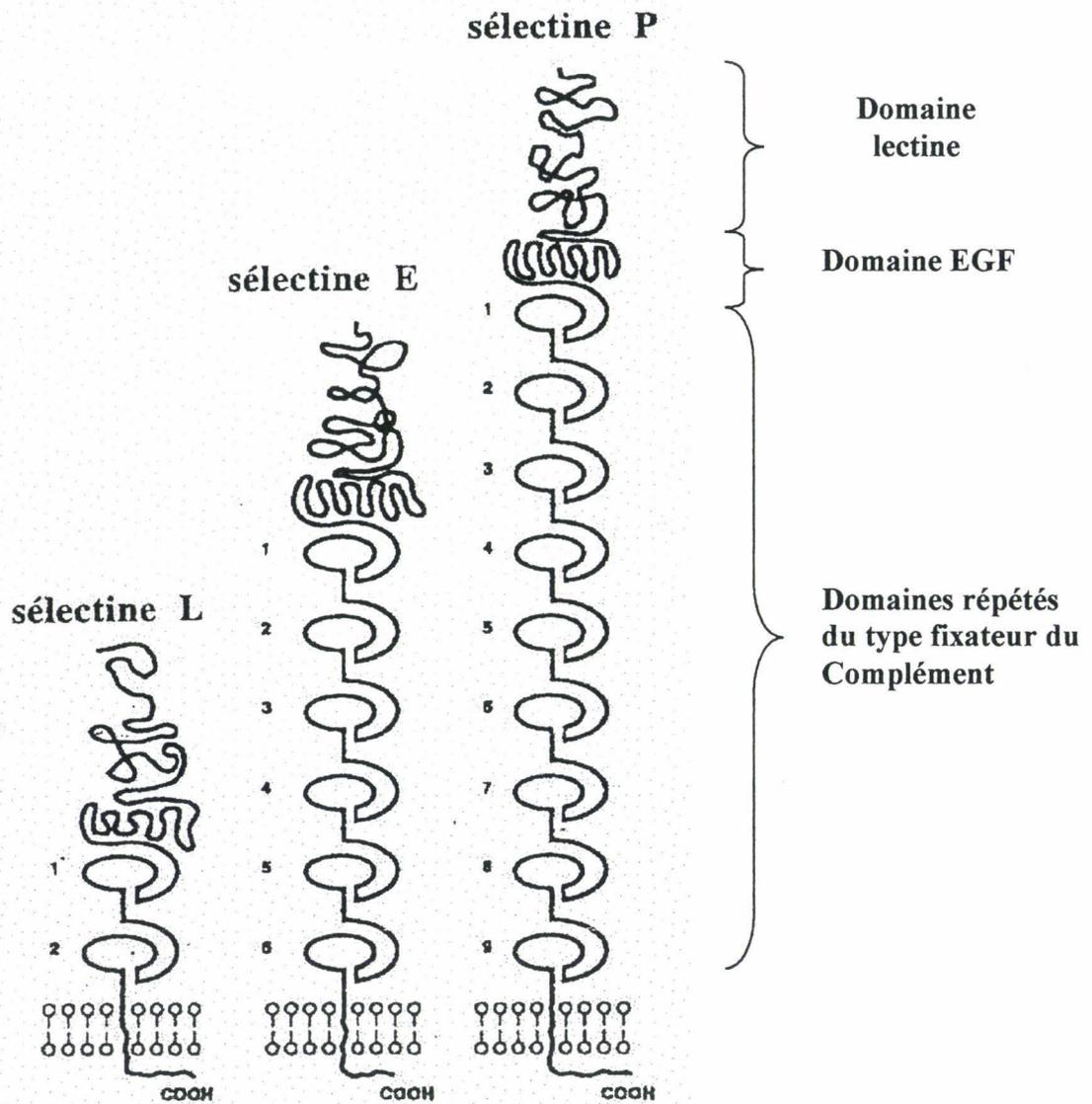
### a- Lectines membranaires

#### *a 1- Groupes II et V*

Les groupes II et V sont représentés par des récepteurs transmembranaires, qui interviennent dans l'endocytose et la dégradation des protéines. Ces protéines consistent en une partie N-terminale cytoplasmique et une portion extracellulaire qui contient le CRD en position carboxy-terminale. L'oligomérisation de polypeptides ne contenant qu'un CRD (de faible affinité pour un monosaccharide) conduit à l'accroissement de l'affinité pour des ligands multivalents (Drickamer et Taylor, 1993). Ce phénomène (clustering) est un trait commun de nombreuses lectines de type C. Outre les récepteurs d'endocytose, il se rencontre chez les collectines et les récepteurs au mannose. Le récepteur pour les asialoglycoprotéines est présent à la surface des hépatocytes et est spécifique du galactose et du N-acétylgalactosamine (Spiess, 1990). Il reconnaît les glycoprotéines sériques dont les chaînes oligosaccharidiques ont perdu l'acide sialique, laissant exposé le galactose terminal. Ces protéines sont alors internalisées et transportées vers le lysosome pour être dégradées (Drickamer, 1991). La lectine hépatique de poulet est l'homologue du récepteur des asialoglycoprotéines (Kawasaki et Ashwell, 1977). Certains récepteurs leucocytaires appartiennent à ce groupe dont le récepteur de faible affinité pour la portion Fc des IgE des lymphocytes, le CD23 (Ludin *et al.*, 1987) ainsi que le récepteur au galactose des macrophages (Ii *et al.*, 1990).

#### *a 2- Groupe IV.*

Le groupe IV constitue la famille de molécules d'adhésion appelée Sélectines (**Figure 12**). Cette famille comprend trois membres : la L(leucocyte)-sélectine, la E(endothélium)-sélectine et la P(plaquette)-sélectine. La L-sélectine est exprimé par les leucocytes tandis que sélectines E et P sont exprimés par les cellules endothéliales. Elles interviennent dans la phase



**Figure 12 : Structure des Sélectines**  
 (d'après Imhof et Dunon, 1995).

initiale des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales, participant au passage transendothélial des leucocytes vers les sites inflammatoires ainsi qu'à la domiciliation et la recirculation des lymphocytes (Bevilacqua, 1993). De récents travaux ont démontré que les sélectines sont également impliquées dans la signalisation intracellulaire (Lorenzon *et al*, 1998).

Les sélectines sont des molécules transmembranaires de type I ; la partie N terminale comprend un domaine CRD de type C, suivi d'un domaine homologue à l'EGF (Epidermal Growth Factor), et un nombre variable de séquences consensus répétées similaires à celles rencontrées dans les protéines fixatrices du complément. Enfin après la région transmembranaire se trouve un court domaine C terminal intracytoplasmique.

Les sélectines présentent 40 à 60% d'identité entre elles au niveau protéique, et jusqu'à 60-70% en ce qui concerne les domaines EGF et lectine (Lasky, 1992).

Les domaines lectines et EGF sont impliqués dans la liaison aux ligands. Les ligands des sélectines sont de nature carbohydratée. Sur la base d'expériences de liaison aux sélectines ou d'inhibition d'adhérence, il s'avère que de nombreux sucres simples ou complexes sont reconnus par les sélectines ; la plupart de ces ligands ont en commun une structure lactosamine, le fucose, et des groupements chargés tels l'acide sialique, un groupement sulfate, ou l'acide uronique. Les premiers motifs communs démontrés comme étant reconnus par les sélectines sont les tétrasaccharides sialyl Lewis x (sLe<sup>x</sup>) et sialyl Lewis a (sLe<sup>a</sup>). Le sLe<sup>x</sup> est capable de se fixer sur les trois sélectines ; la forme Lewis x (Le<sup>x</sup>) est reconnu par la P-sélectine ; les formes sulfatés des Le<sup>x</sup> et Le<sup>a</sup> sont reconnus par la L- et la P-sélectines ; ces deux dernières reconnaissent divers sulfatides, des glycolipides sulfoglucuronyl, et des polysaccharides sulfatés tels le fucoïdan et l'héparine (pour revue cf. Rosen et Bertozzi, 1994 ; Varki, 1994 ; Vestweber, 1996).

Des ligands biologiques de sélectines ont été identifiés, dont plusieurs de type mucine. Cette famille de molécule d'adhérence possède des régions riche en sérine et thréonine, fortement O-glycosylées. Elles possèdent les motifs sLex, sLea ou leur forme sulfatée. Il s'agit pour la L-sélectine de GlyCAM-1 (Lasky *et al*, 1992) et du CD34 (Baumhater *et al*, 1993), deux sialomucines possédant des chaînes oligosaccharidiques riches en acides sialiques. L'adressine MadCAM-1, présentant un domaine sialomucine et connue comme ligand de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , est également un ligand de la L-sélectine (Berg *et al*, 1993).

Une autre sialomucine est le ligand de la P-sélectine, PSGL-1 (Moore *et al*, 1992).

A propos des ligands sialomucines, Varki (1994) a proposé que des ensembles de chaînes oligosaccharidiques s'associent pour former des épitopes uniques ; soit en contraignant une chaîne unique à adopter une conformation inusuelle, soit en combinant différentes chaînes pour former un nouvel épitope.

ESL-1, molécule homologue au Fibroblast Growth Factor riche en cystéine, est un ligand de la E-sélectine. Il ne s'agit pas d'une mucine, mais d'une protéine N-glycosylée (Vestweber, 1996). Enfin, la L-sélectine pourrait être un ligand pour les sélectines E et P, par ses oligosaccharides sialylés (Picker *et al*, 1991).

De ces différents résultats, il ressort que la reconnaissance des ligands par les sélectines est basée sur la nature des oligosaccharides et non pas sur la structure du squelette protéique (voire lipidique). Toutefois, devant la variété des ligands identifiés, il apparaît que les motifs structuraux des saccharides qui déterminent la liaison aux sélectines ne sont pas identifiées.

### *a 3- Groupe VI.*

Le groupe VI est constitué par les lectines possédant la structure des récepteurs au mannose du macrophage ; il s'agit de l'enchaînement de huit CRD associés à un domaine fibronectine. Ces récepteurs assurent la fixation et l'internalisation de glycoconjugués se terminant par le mannose, le fucose ou le N-acétylglucosamine (Stahl, 1990). Ces résidus normalement absents des glycoconjugués de mammifères, se rencontrent à la surface de bactéries, champignons ou parasites. Ces récepteurs interviennent donc dans l'immunité innée envers les microorganismes pathogènes.

### b- Lectines solubles.

#### *b 1- Groupe III.*

Le groupe III représente les collectines, oligomères de polypeptides présentant un CRD carboxyterminal associé à une séquence collagène. Tout comme les lectines précédentes, les collectines fixent des résidus oligosaccharidiques présents en surface des pathogènes. La "mannose-binding" lectine (MBL), rencontrée dans les fluides extracellulaires est similaire en fonction et structure au C1q qui se fixe aux immuncomplexes pour initier l'activation du complément par la voie classique. La MBL entraîne une lyse bactérienne dépendante du complément en parallèle à son activité d'opsonine indépendante du complément. Outre le

mannose, la MBL fixe la N-acétylglucosamine, la N-acétylmannosamine, le fucose, le maltose, le glucose, le galactose et la N-acétylgalactosamine. (Turner, 1996). Les apolipoprotéines A et D du surfactant pulmonaire appartiennent aux collectines. Ces lectines tapissent les alvéoles pulmonaires et interviennent dans la défense du poumon contre les infections.

#### *b 2- Groupe I.*

Le groupe I est représenté par des protéoglycans de la matrice extracellulaire; il s'agit de l'aggrécane de la matrice cartilagineuse (Doerge *et al.*, 1991), du versicane, protéoglycane de haut poids moléculaire produit par les fibroblastes (Zimmermann et Ruoslahti, 1989) et le neurocane du cerveau (Rauch *et al.*, 1992).

#### *b 3- Groupe VII.*

Le groupe VII est composé de CRD libres, c'est à dire non associés à d'autres domaines, principalement découverts chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés (Drickamer, 1993). mais aussi dans le pancréas humain (deCaro *et al.*, 1987 ; Lassere *et al.*, 1992).

On rencontre enfin deux protéines de mammifère constituées de CRD isolés mais dont les séquences divergent par rapport aux lectines du groupe VII, la tetranectine (Fuhlendorff *et al.*, 1987) et la protéine basique majeure des éosinophiles (Yoshimatsu *et al.*, 1992).

#### c- Lectines de type C chez les invertébrés.

Des séquences homologues au CRD de type-C ont été identifiées dans une large variété d'organismes depuis les procaryotes jusqu'aux mammifères. Cependant il y a peu de lectines de type C isolées et séquencées chez les invertébrés. Actuellement on connaît un récepteur tyrosine kinase de l'hydre *Hydra vulgaris* présentant un CRD C-terminal (Steele, 1993), une lectine-like chez le plathelminthe turbellarié *Girardia tigrina* (Lukyanov, 1995), le facteur C de coagulation de la limule (chélicérate) *Tachypleus tridentatus* qui possède un CRD interne (Muta *et al.*, 1991), une lectine issue du fluide coelomique chez la balane (crustacé) *Megabalanus rosa* (Muramoto et Kamiya, 1990), une lectine humorale chez la mouche *Sarcophaga peregrina* (Takahashi *et al.*, 1985), une lectine spécifique du galactose chez

*Drosophila melanogaster* (Haq et al., 1996), une "LPS-binding" protéine issue de l'hémolymphe de la blatte *Periplaneta americana* (Jomori et Natori, 1991), les incilarines du mucus de surface chez la limace *Incilaria fruhstorferi* (Yuasa et al., 1998), l'échinoïdine, lectine impliquée dans la défense envers les microorganismes chez l'oursin *Anthocidaris crassispina* (Giga et al., 1987), deux lectines chez les concombres de mer *Stichopus japonicus* (Himeshima et al., 1994) et *Cucumaria echinata* (Hatakeyama et al., 1994), une lectine chez le tunicier *Polyandrocarpa misakiensis* (Suzuki et al., 1990).

## 2- Les Galectines

Autrefois désignées sous le nom de lectine de type S en raison de la nécessité de groupements thiols réduits pour le maintien de leur activité lectine, elles sont désormais regroupées sous le vocable "galectine", du fait de leur affinité pour les  $\beta$ -galactosides. Tout comme pour lectines animales de type-C, les galectines se distinguent par un CRD spécifique reconnaissable par une série d'acides aminés conservés (Drickamer, 1988). La fixation aux sucres est indépendante de la présence d'ions divalents, et requiert la présence de groupements SH libres. Leur localisation est principalement intracellulaire, dans le compartiment cytoplasmique.

Les galectines sont classées selon leur architecture moléculaire en trois groupes.

Le type "Proto" comprend de petites protéines de 15 kDa ne contenant qu'un seul CRD; ces protéines forment des homodimères divalents, liant des glycoconjugués de même nature.

Le type "Chimère" rassemble des protéines d'une trentaine de kDa constituées de deux domaines différents, la moitié C-terminale contenant le CRD et la moitié N-terminale contenant un domaine semblable au complexe ribonucleoprotéique hétéronucléaire ; le domaine non lectinique permet certainement l'interaction avec d'autres molécules que des glycoconjugués.

Le type "tandem-repeat" est constitué de protéines présentant deux CRD dont la spécificité peut être différente (Kasai et Hirabayashi, 1996).

Les galectines présentent une affinité pour les  $\beta$ -galactosides, principalement pour le lactose (Gal $\beta$ 1-4Glc), la N-acétyllactosamine (Gal $\beta$ 1-4GlcNac). Ces structures sont incluses dans de nombreux glycoconjugués, et servent de motifs de base aux antigènes de groupe sanguin ainsi qu'aux antigènes de type Lewis. Ce sont donc des motifs importants de la

glycobiologie, et pour reprendre l'expression de Kasai et Hirabayashi (1996), il semble que les galectines soient capables de déchiffrer les mots clés que constituent ces  $\beta$ -galactosides.

La famille des galectines comprend peu de membres en comparaison des lectines de type-C (un mammifère possède au moins huit galectines; on connaît plus de cinquante lectines de type-C chez les vertébrés supérieurs). De plus, si la plupart des lectines de type-C ont une fonction bien définie, il est difficile d'assigner un rôle définitif quel que soit la galectine considérée. Leur fonction biologique varie d'un site à un autre, ainsi qu'au cours du temps. On les rencontre chez les vertébrés dans un grand nombre de tissus (peau, muscle, cerveau, intestin, foie, rate, placenta...); elles semblent impliquées dans de nombreux phénomènes tels que le développement, la différenciation, la morphogenèse, l'immunité...(Kasai et Hirabayashi, 1996).

Les galectines sont largement distribuées dans le règne animal ; elles ont tout d'abord été identifiées chez de nombreuses espèces de vertébrés: l'anguille électrique, le poulet, la souris, le rat, le bœuf, l'homme (pour revue cf. Kasai et Hirabayashi, 1996 ; Vasta et Ahmed, 1996). Leur présence chez différents embranchements d'invertébrés a été découverte: chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Hirabayashi *et al.*, 1992), chez l'éponge *Geodia cydonium* (Pfeifer *et al.*, 1993), chez le tunicier *Clavelina picta* (Vasta et Ahmed, 1996) et enfin chez la seiche *Todarodes pacificus* (Ozeki, 1997). Ainsi l'origine des galectines remonte à plus de 800 millions années, avant la divergence entre protostomes et deuterostomes.

### **3- Les Pentraxines**

Les propriétés lectines des pentraxines de vertébrés permet de les considérer comme un groupe particulier de lectines (Vasta, 1990). Il s'agit de protéines telles que la protéine C-réactive (CRP), les sérum amyloïdes P et A ; pentamères cycliques constitués de sous-unités identiques. Certaines pentraxines sont des protéines de la phase aiguë dont la concentration plasmatique augmente considérablement en réponse à un stress. Bien que la fonction de la plupart des pentraxines ne soit pas clairement définie, elles semblent impliquées dans la discrimination du soi et non-soi. En effet leurs ligands phosphocholine et dérivés du galactose, sont répandus chez les microorganismes (Vasta et Ahmed, 1996). La protéine C-réactive complexée à son ligand active le complément par la voie classique (Kilpatrick et Volanakis, 1985).

Chez les invertébrés, le crabe *Limulus polyphemus* possède une lectine (Nguyen *et al.*, 1986) dont les sous-unités présentent 25% d'homologie avec la CRP humaine. De plus, la CRP de *L.polyphemus* tout comme la CRP humaine induit une cytotoxicité des plaquettes contre les parasites *Schistosoma* spp (Bout *et al.*, 1986). La limuline, l'une des lectines spécifiques des acides sialiques présentes dans le plasma de *L.polyphemus*, est une autre pentraxine, plus abondante que la CRP. La limuline est responsable de l'activité cytolytique du plasma de *L.polyphemus* (Armstrong *et al.*, 1996).

Le tunicier *Didemnum candidum* possède également une lectine homologue à la CRP de vertébrés (Vasta *et al.*, 1986).

#### **4 Les lectines "Héparine-binding"**

Il s'agit de lectines qui médient l'interaction entre les cellules et leur environnement extracellulaire ; elles fixent les héparines et d'autres glycosaminoglycanes (Kjellen et Lindahl, 1991). On peut citer le N-CAM (neural cell adhesion molecule) et la calreticuline.

Une lectine de cette catégorie, l'anadarine, a été isolée et caractérisée chez le bivalve *Anadara granosa* (Dam *et al.*, 1994).

#### **5- Les lectines de type P**

Deux récepteurs pour le mannose-6-phosphate présents dans les membranes plasmiques et de l'appareil de Golgi ont été décrits et possèdent un CRD unique parmi les lectines animales. Ils interviennent dans l'adressage des enzymes lysosomiaux ainsi que dans la transduction de signaux transmembranaires (Kornfeld, 1992).

#### **6- Les lectines de type I**

Les lectines de ce groupe appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des protéines transmembranaires, dont les propriétés de reconnaissance sont liées à la présence d'acide sialique au niveau du ligand. Il s'agit principalement du CD22 et de la sialoadhésine (Powell et Varki, 1995).

#### **7- Autres lectines animales**

Les travaux sur l'assemblage et le trafic intracellulaire des protéines ont mis en évidence deux groupes de lectine. La calnexine est une protéine du réticulum endoplasmique qui interagit avec les glycoprotéines à la fois au niveau des glucides et au niveau de la chaîne protéique. Elle interviendrait dans les mécanismes de conformation des protéines, et retiendrait les protéines non conformes dans le réticulum. Cette lectine ne présente pas d'homologie avec les autres groupes connus (Hammond *et al*, 1994).

Un second groupe de lectines intracellulaires intervient dans l'adressage des protéines après leur sortie du réticulum endoplasmique, vers le Golgi, telle la protéine ERGIC-53 (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment) (Arar *et al*, 1995). Ces protéines présentent des homologies avec les lectines de plantes du groupe des légumineuses, comme la concanavaline A (Fiedler *et al*, 1994). On les désigne de type L.

La plupart des lectines décrites chez les invertébrés ne peuvent pas se classer dans les catégories citées précédemment, soit, comme c'est souvent le cas, en raison du manque d'information concernant la structure primaire, soit parce que cette structure primaire ne présente aucune ressemblance avec les lectines déjà décrites.

## **B- LECTINES ET RELATIONS MOLLUSQUES-TREMATODES**

### **1- Les lectines chez les mollusques**

A l'origine les lectines ont été souvent caractérisées en tant qu'agglutinines d'érythrocytes de mammifères. En général, les lectines sont identifiées par un ou plusieurs sucres spécifiques qui inhibent leur capacité d'agglutination. Les structures polysaccharidiques couramment employées proviennent de mammifères, car il y a comparativement peu d'information concernant le métabolisme des sucres et la glycosylation chez les mollusques. Cependant tout porte à croire que les mollusques, et les invertébrés en général, possèdent des structures saccharidiques nouvelles et uniques, qui diffèrent des structures rencontrées chez les mammifères. Un exemple récent est celui d'un nouveau glycosaminoglycane découvert chez *Achatina fulica* (Kim *et al.*, 1996). Devant la spécificité des lectines, toute approche basée sur des sucres de mammifères limiterait donc considérablement la gamme de lectines de mollusques accessibles, notamment les lectines impliquées dans la reconnaissance des pathogènes (Neeleman, 1996).

La présence d'agglutinines de bactéries chez les invertébrés a souligné l'importance des lectines dans la défense interne. Lorsqu'un microorganisme tel qu'une bactérie atteint les cavités internes d'un invertébré, il est immédiatement agglutiné par des lectines humorales. Cette agglutination immobilise le pathogène et empêche sa dispersion au sein de différents tissus. Ce phénomène induirait la libération de matériel bactérien dont l'effet chimiotactique induirait la migration et la dégranulation des hémocytes, ce qui par la suite entraînerait la phagocytose et la destruction des pathogènes par les molécules effectrices des cellules de défense. Les lectines interviennent également comme opsonines et comme récepteurs en surface des hémocytes pour permettre la reconnaissance et favoriser la phagocytose des microorganismes.

Fisher et DiNuzzo (1991) ont étudié six espèces de mollusques marins, l'huître, la palourde, le poulpe, le calmar, la seiche et l'aplysie. Ils ont montré que leur sérum est capable d'agglutiner 64 isolats bactériens sur 94 testés (représentant 15 genres et 36 espèces) et sept types d'érythrocytes de vertébrés. Différentes agglutinines sont produites par *Planorbarius corneus* en réponse à des infections bactériennes (Ottaviani, 1992a,b).

Les lectines ont été détectées dans l'hémolymphe ; une activité d'agglutination se rencontre aussi dans les oeufs, le tractus génital et le mucus de différentes espèces de mollusques. La source principale de lectines chez les gastéropodes pulmonés est la glande albumen. Cet organe est en contact direct avec le système circulatoire ouvert des gastéropodes, permettant la sécrétion de lectines dans l'hémolymphe. Renwranz (1986) signale que des lectines ont été purifiées de l'hémolymphe des lamellibranches *Crassostrea virginica*, *Tridacna maxima*, *Mytilus edulis*, du gastéropode *B.glabrata*, du céphalopode *Octopus vulgaris*. L'activité hémagglutinante de l'hémolymphe de *B.glabrata* (pour revue voir Horak et van der Knaap, 1997) est inhibée par différents monosaccharides, le D-glucose (Michelson et Dubois, 1977), la N-acétylgalactosamine (Boswell et Bayne, 1984), le L-fucose et L-rhamnose (Couch *et al.*, 1990), indiquant l'implication des lectines dans ces phénomènes. Les lectines du plasma peuvent aussi provenir des hémocytes comme en témoignent les résultats immunocytochimiques obtenus chez *Lymnaea stagnalis* (Van der Knaap *et al.*, 1981) et *Planorbarius corneus* (Ottaviani, 1992).

Les lectines sont présentes en surface des hémocytes, sous la forme de lectines associées à la membrane, de façon réversible (récepteur cytophile, Van der Knaap *et al.*, 1983). Ceci est illustré par la réactivité croisée entre des anticorps dirigés contre des lectines plasmatiques et

la surface des hémocytes circulants (*Lymnaea stagnalis*, Van der Knaap *et al.*, 1981; *Mytilus edulis*, Renwranz et Stahmer, 1983 ; *Helix pomatia*, Richards et Renwranz, 1991). La spécificité de ces lectines membranaires peut être la même que celle des lectines circulantes. Les lectines associées aux membranes se rencontrent également au niveau des cellules qui tapissent les vaisseaux (Van der Knaap *et al.*, 1981). L'existence de récepteurs lectiniques, c'est-à-dire de lectines intégrées à la membrane et non pas de protéines cytophiliques, a été démontrée chez les hémocytes de l'huître, *Crassostrea virginica* (Vasta *et al.*, 1982). On rencontre ainsi des lectines membranaires dont la spécificité diffère de celle des lectines plasmatiques ; c'est le cas chez *H.pomatia* (Richards et Renwranz, 1991), chez *B.glabrata* où Fryer et Bayne (1989) ont identifié une lectine plasmatique spécifique des mannanes et une lectine de surface spécifique des  $\beta$ 1-3 glucanes. Toujours chez *B.glabrata*, Zelck(1993) a montré l'existence de récepteurs hémocytaires pour la N-acétylglucosamine et la N-acétylgalactosamine.

## **2- Reconnaissance basée sur les lectines et phagocytose dépendante de lectines**

L'immunoreconnaissance est assurée par les lectines de surface et les lectines circulantes. Les lectines de surface participent à l'adhérence et la phagocytose du non-soi. Cette reconnaissance directe par les hémocytes semble dépendante du calcium (Zelck et Becker, 1992). Les lectines plasmatiques, quant à elles, semblent effectuer un pontage entre l'hémocyte et le pathogène, en un mécanisme d'opsonisation où la lectine reconnaît des structures sucrées sur les deux entités. Ces phénomènes de reconnaissance peuvent être inhibés par des monosaccharides spécifiques. De plus des lectines exogènes sont capables de favoriser la reconnaissance et la phagocytose (Fryer et Bayne, 1989 ; Loker *et al.*, 1989 ; Richards et Renwranz, 1991 ; Zelck et Becker, 1992). C'est chez le gastéropode terrestre, *H.pomatia* (Mullainadhan et Renwranz, 1989 ; Richards et Renwratz, 1991), qu'a été décrit avec précision ce phénomène d'immunoreconnaissance. Les hémocytes de ce gastéropode ont deux mécanismes de reconnaissance du soi et non-soi. Les hémocytes possèdent une lectine membranaire calcium-dépendante, spécifique de la N-acétylgalactosamine. D'autre part, l'hémolymphe contient une autre lectine, spécifique aussi de la N-acétylgalactosamine, mais calcium-indépendante. L'opsonisation entraînerait un changement de conformation de cette lectine plasmatique, exposant un site cryptique D-mannose-6-phosphate. L'objet opsonisé peut alors être reconnu par une lectine membranaire hémocytaire spécifique du D-mannose-6-phosphate, en absence d'ion calcium. Un mécanisme similaire a été proposé chez *B.glabrata*.

Les hémocytes présenteraient une lectine membranaire spécifique des  $\beta$ 1-3 glucanes, permettant la reconnaissance et la phagocytose de levures. Parallèlement une opsonine plasmatique spécifique des mannanes se fixerait aux levures, découvrant un site cryptique de l'opsonine dont la structure  $\beta$ 1-3 glucane permettrait la reconnaissance de la levure opsonisée par les hémocytes (Fryer *et al.*, 1989 ; Bayne, 1990).

### **3- Role des lectines dans la relation mollusque-trématode**

#### **a- *Biomphalaria glabrata* / *Schistosoma* et *Echinostoma***

Les lectines plasmatiques (agglutinines) de différentes souches de *B.glabrata*, qu'elles soient susceptibles ou résistantes à *S.mansoni* ou *E.paraensei*, se fixent sur les larves de trématodes (Stein et Basch, 1979 ; Hertel *et al.*, 1994 ; Zelck *et al.*, 1994 ; Loker et Adema, 1995). Le plasma de souche résistante de *B.glabrata* agglutine les sporocystes de *S.mansoni*, contrairement au plasma de souche susceptible (Loker *et al.*, 1984 ; Bayne *et al.*, 1985). Les hémocytes de *B.glabrata* (M-line : susceptible) sont capables d'adhérer aux sporocystes de *S.mansoni*, vivants ou fixés, et de *E.paraensei* fixés ; cependant le prétraitement des sporocystes par une lectine de plante, la concanavaline A, favorise l'adhérence dans le cas d'*E.paraensei* (Loker *et al.*, 1989) et induit même une cytotoxicité de la part des hémocytes dans le cas de *S.mansoni* (Boswell et Bayne, 1985).

L'hémolymphe de *B.glabrata* contient des lectines dont la nature et l'abondance varie selon la souche de mollusque considéré et selon l'infection. En comparant les souches susceptibles (M-line) et résistantes (13-16-R1) à *S.mansoni*, Monroy *et al.* (1992) ont trouvé peu de différences au niveau des lectines circulantes chez les individus contrôles (non infectés), par contre ils ont observé une augmentation des lectines plasmatiques chez la souche M-line soumise indifféremment à l'infection par *S.mansoni* ou *E.paraensei*, cette augmentation n'est retrouvée chez la souche 13-16-R1 que dans le cas d'une exposition à *E.paraensei*. De plus, cette réponse à l'exposition parasitaire concerne des lectines différentes. Les trématodes induiraient donc une production de lectines spécifiques à la fois du parasite et du degré de compatibilité de la souche de mollusque. De la même façon, l'exposition à *E.paraensei* entraîne une augmentation des titres d'agglutination d'érythrocytes du plasma de *B.glabrata*, agglutination inhibée par différents monosaccharides. Les plus hauts titres sont obtenus chez les individus abritant des parasites ayant réussi leur installation (Loker *et al.*,

1994). Les souches résistantes posséderaient des opsonines absentes du plasma de la souche susceptible M-line (Fryer et Bayne, 1989). Ceci permet d'expliquer que des facteurs plasmatiques présents uniquement chez les souches résistantes puissent activer les hémocytes de souches susceptibles afin de détruire les sporocystes de *S.mansoni* (Bayne *et al.*, 1980 ; Granath et Yoshino, 1984).

Les produits d'excrétion/sécrétion (E/S) des larves d'*E.paraensei* provoquent des précipités au sein du plasma de *B.glabrata*. Parmi les molécules d'hôtes impliquées dans ces phénomènes, se trouvent deux groupes de polypeptides aux propriétés lectiniques, c'est-à-dire présentant des facultés d'agglutination inhibables par des monosaccharides : un groupe de 150-220 kDa (G1M) et un groupe de 75-130 kDa (G2M) (Uchikawa et Loker, 1992). Ces facteurs humoraux sont inductibles de façon spécifique ; leur abondance et leur variété s'accroissent sous l'effet d'une infection par un trématode. Les plasmas d'individus contrôles ou exposés à *S.mansoni* contiennent peu ou pas de G1M, tandis que le plasma d'individus exposés à *E.paraensei* contient le groupe G1M de manière significative. Quant au groupe G2M, il est représenté par 1 à 2 isoformes chez les individus contrôles et 4 isoformes peu abondantes chez les individus infectés par *S.mansoni*, contrairement aux 5 à 6 isoformes présentes lors de l'infection par *E.paraensei* (Monroy et Loker, 1993). Certaines lectines de G1M/G2M sont capables de se fixer à la surface des sporocystes d'*E.paraensei* (Hertel *et al.*, 1994).

Un autre complexe polypeptidique apparaît suite à l'infection par *E.paraensei*, mais n'est pas détecté chez les individus sains ou soumis à *S.mansoni* ; il s'agit de sous-unités de 65 kDa qui s'associent en complexes d'environ 1600 kDa, que l'on retrouve au sein des précipités associés aux E/S des larves intra-mollusques. Ces sous-unités semblent présenter une activité lectine calcium-dépendante. La précipitation suit l'adjonction de hautes doses de produits E/S, c'est-à-dire qu'elle est dépendante du rapport entre la quantité de complexes de 65 kDa et la quantité de produits E/S, évoquant une réaction de précipitation antigène-anticorps. Par contre les complexes G1M/G2M précipitent après l'adjonction de faibles doses de produits E/S. Ces complexes G1M/G2M apparaissent quatre jours après l'infection, indicateurs de la présence de larves en développement tandis que les complexes 65kDa apparaissent plus tôt, suite à l'exposition au parasite (deux jours), quel que soit le devenir de l'infection, succès ou échec de l'installation du parasite (Adema *et al.*, 1997a).

Adema *et al.* (1997b) ont isolé et séquencé des cDNAs correspondants aux sous-unités de 65kDa; ces lectines présentent un domaine apparenté au fibrinogène (fibrinogen-related

protein=FREP) ainsi que des régions présentant des similarités avec la superfamille des immunoglobulines. Le fait que les transcrits correspondant aux FREP soient détectés au sein des hémocytes de *B.glabrata* et que la quantité de FREP augmente au sein des mollusques abritant des sporocystes, laisse supposer un rôle pour ces molécules dans la défense interne. Les FREP pourraient se lier aux produits parasitaires solubles pour les éliminer de la circulation, les produits E/S d'*E.paraensei* étant connus pour bloquer les fonctions hémocytaires (Loker *et al.*, 1992). Une autre lectine du mollusque *Limax flavus*, présente aussi une séquence FREP (Knibbs *et al.*, 1993). Si chez les vertébrés, le fibrinogène intervient dans l'agrégation des plaquettes et la formation du caillot de fibrine, l'absence de système de coagulation chez les mollusques conduit à envisager les FREP comme des protéines de reconnaissance du non-soi, fonction d'ailleurs attribuée aux lectines. Cette fonction primordiale se retrouve chez une FREP de vertébré, la lectine P35 du sérum humain (Matsushita *et al.*, 1996) qui tout comme la lectine de *L.flavus* agit en opsonine.

#### b- *Biomphalaria alexandrina* / *Schistosoma mansoni*

Trois isolectines (BaSI, II et III) ont été identifiées et purifiées de l'hémolymphe de *Biomphalaria alexandrina*, un autre hôte intermédiaire de *S.mansoni* (Mansour, 1995; Mansour *et al.*, 1995). Cette famille d'isolectines est constituée de molécules tétramériques aux sous-unités non liées covalamment ; les trois lectines reconnaissent le déterminant fucosyllactose, (Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4Glc, présent chez des glycoprotéines du miracidium. Fonctionnellement, ces isolectines diffèrent par leur affinité envers le ligand fucosyllactose. BaSII reconnaît également deux glycoprotéines cercariennes et une glycoprotéine de ver mâle adulte (Sm37) portant le déterminant fucosyllactose (Negm, 1996; Mansour, 1996).

#### c- *Bulinus* / *Schistosoma*

Chez le genre *Bulinus*, Schoenberg et Cheng (1981) ont démontré la capacité de fixation de lectines spécifiques des hémocytes de *B.truncatus*, hôte intermédiaire de *Schistosoma bovis*. La surface des différents stades intra-mollusques de *Schistosoma margrebowiei* marquée par des lectines, montre l'existence de sucres spécifiques de chaque stade, miracidium, sporocyste et cercaire. L'hémolymphe de *B.nasutus*, vecteur de *Schistosoma haematobium* mais non-compatible avec *Schistosoma margrebowiei*, contient une agglutinine (135 kDa) capable d'agglutiner les érythrocytes de mammifères. Cette agglutinine ne

reconnaît pas les larves de *S.haematobium*, mais par contre se fixe sur le miracidium mais pas sur les autres stades intramollusques de *Schistosoma margrebowiei* (Daniel *et al.*, 1992). Cette lectine humorale interviendrait donc dans l'incompatibilité entre *B.nasutus* et *S. margrebowiei*. Harris *et al.* (1993) ont purifié cette agglutinine à partir du plasma de *B.nasutus* ; ils ont également détecté des protéines de poids moléculaire semblable (135kDa) chez seize espèces du genre *Bulinus*. Ces lectines présenteraient des variations au niveau de leur glycosylation. Elles montrent des degrés divers dans leur capacité à se fixer aux miracidiums de *S.margrebowiei*. Ces différences pourraient intervenir dans la compatibilité ou non des espèces *Bulinus* envers les schistosomes.

#### d- Lymnaea / Trichobilharzia

Dans le cas de *Lymnaea stagnalis*, hôte des schistosomes aviaires du genre *Trichobilharzia*, Van der Knaap *et al.* (1981) ont démontré la présence d'une agglutinine/opsonine probablement synthétisée par les hémocytes et détectée immunocytochimiquement dans le cytoplasme et en surface des hémocytes. La présence d'une lectine servant de récepteur cytophilique est également attestée au niveau des hémocytes (Van der Knaap *et al.*, 1983). Van der Knaap *et al.* (1982) distinguent deux populations de mollusques sur la base de l'habilité des agglutinines plasmatiques à agréger différentes particules et sur des variations dans les titres d'agglutination. Le développement de *Trichobilharzia ocellata* au sein de *L.stagnalis* est retardé dans la sous-population de mollusque présentant un titre élevé d'hémagglutination, par rapport à la sous-population au titre bas (Van der Knaap *et al.*, 1987). Cependant sous l'effet du trématode cette activité hémagglutinante décroît au cours des premières semaines d'infection, signe de l'altération du système de défense du mollusque.

### C- LES GLYCANES DE SCHISTOSOMES

L'importance des glycanes de schistosomes dans la réponse immune de l'hôte a conduit à étudier la nature des glycoconjugués présents aux différents stades du parasite.

#### 1- Importance des déterminants glycaniques

L'exposition de sucres à la surface des trématodes est dépendante de l'espèce et du stade de développement (pour revue voir Horak et van der Knaap, 1997). De nombreuses études sont basées sur la fixation de lectines et l'utilisation de monosaccharides bloquants. Uchikawa et Loker (1991) ont de cette manière comparé la surface des sporocystes de *S.mansoni* et d'*E.paraensei*. Ils observent la présence de Man, Gal et GalNac chez les deux espèces, tandis que le Fuc et le GlucNac ne sont trouvés que chez *S.mansoni*, et le NeuAc uniquement chez *E.paraensei*. Ainsi ces deux espèces de trématodes qui ont développé deux stratégies différentes pour se développer chez le même hôte, *B.glabrata*, présentent également des expressions différentes de saccharides de surface.

Des observations similaires ont pu être faite avec six trématodes de *L.stagnalis* (Horák et Mikeš, 1995). Chez un même trématode, on observe des différences entre les structures de surface des stades libres et des stades intra-mollusques. Chez différentes espèces les auteurs ont constaté que des lectines se fixant spécifiquement au stade miracidium ne reconnaissent pas le stade sporocyste ; c'est le cas pour des lectines spécifiques du Gal/GalNac chez *T.ocellata* (Gerhardus, 1991), du Gal chez *S.margrebowiei* (Daniel *et al.*, 1992), du Fuc chez *T.szidati* (Horák, 1995). Cette perte de déterminant saccharidique est très certainement liée au détachement des plaques ciliées lors de la transformation du miracidium en sporocyste. D'autres lectines ne reconnaissent que les espaces entre les plaques ciliées (Gerhardus, 1991 ; Horák, 1995).

La combinaison des techniques SDS-PAGE et de marquage par des lectines a démontré que la plupart des polypeptides (27 à 113 kDa) de surface du sporocyste de *S.mansoni* sont glycosylées et présentent une hétérogénéité dans la structure et la composition des parties oligosaccharidiques. Dans ces expériences la lectine spécifique du Fuc (lectine de *Tetragonolobus purpureas*), reconnaît la moitié des glycoprotéines de surface (Johnston et Yoshino, 1996).

La cercaire est recouverte d'un manteau fibrillaire de 1 à 2 mm d'épaisseur constitué essentiellement d'oligosaccharides reliés à un peptide, le glycocalyx (Caufield *et al.*, 1988). Le miracidium possède également un glycocalyx ; cette structure semble conférer une protection envers les importants changements de pression osmotique que subissent ces stades larvaires lors de leur vie libre. Le glycocalyx, qui se détache de la cercaire après pénétration à travers la peau et transformation de la cercaire en schistosomule s'avère très immunogène. Lors de la transformation de la cercaire en schistosomule le glycocalyx se détache pour laisser

place à un nouveau tégument ; on observe alors un changement dans le profil de reconnaissance par des lectines (Horák, 1995). La surface des schistosomules est également riche en glycoconjugués ; en effet la plupart des anticorps qui reconnaissent la surface de la jeune larve sont dirigés contre des épitopes oligosaccharidiques (Omer-Ali *et al.*, 1988). Là encore un changement dans les déterminants de surface apparaît lors de la transformation du schistosomule en vers adulte (Simpson *et al.*, 1983).

Malgré les différences observées en matière de constituants glycaniques entre les différents stades, il existe toutefois des épitopes que l'on retrouve au travers des différents stades du parasite. Dans le cas de *Schistosoma mansoni*, un anticorps monoclonal protecteur de rat reconnaît un épitope présent en surface du schistosomule, dans le glycocalyx de la cercaire et au niveau des plaques ciliées du miracidium (Dissous *et al.*, 1986). Les glycolipides d'oeuf, de cercaire et de ver adulte ont en commun des épitopes oligosaccharidiques présents également chez des glycoprotéines du schistosome ; ces épitopes sont exprimés de façon différentielle entre glycolipides et glycoprotéines des différents stades (Weiss *et al.*, 1986).

## 2- Structures

La structure des sucres de *S.mansoni* a été particulièrement étudiée pour les différents stades. La composition du glycocalyx cercarien indique une prédominance du Fuc (40%) et dans une moindre mesure la présence de Gal, de GlcNac et de GalNac (Xu *et al.*, 1994). Khoo *et al.* (1995) ont identifié à partir de O-glycanes du glycocalyx un ensemble hétérogènes de nouveaux oligosaccharides complexes constitués du motif répété multifucosylé -3Gal $\beta$ 1-4GlcNac $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-. Les auteurs suggèrent que ces structures oligofucosylés sont probablement responsables de l'effet immunomodulateur du glycocalyx sur la réponse de l'hôte vertébré.

De nombreuses protéines de surface des vers adultes contiennent des O-glycanes communs chez les mammifères, GalNac-Ser/Thr, Gal $\beta$ 1-3GalNac-Ser/Thr. Une grande partie des glycoprotéines se terminent par un unique résidu GlcNac-Ser/Thr (Nyame *et al.*, 1987), structure que l'on retrouve aussi chez les schistosomules (Nyame *et al.*, 1988). Il s'agit d'un O-glycane courant chez les glycoprotéines intracellulaires et nucléaires de mammifères (Hart *et al.*, 1988).

L'antigène circulant anodique (CAA) provenant du tube digestif du schistosome contient 30% de glucides. Il possède une structure nouvelle de O-glycane : un motif répété de GalNac substitué par un résidu GlcA (Bergwerff *et al.*, 1994). L'antigène circulant cathodique (CCA), qui provient également du tube digestif, est en grande partie (80%) constitué de O-glycanes de haut poids moléculaires ; ces O-glycanes possèdent de façon répétée le motif -3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNac $\beta$ 1-, qui est l'antigène Lewis x (Van Dam *et al.*, 1994).

Les vers adultes synthétisent des N-glycanes riche en mannose et de type complexe. Les N-glycanes riche en mannose sont semblables à ceux rencontrés chez les vertébrés. Parmi les N-glycanes complexes, se trouve un glycane bi-antenné, le lacdiNac, composé de N,N'-diacétyllactosédiamine, plus courant chez le schistosome que le N-acétyllactosamine, lacNac ou Gal $\beta$ 1-4GlcNac (Srivastan *et al.*, 1992). De nombreux N-glycanes antigéniques ont des structures tri- ou tétra-antennées, contenant des séquences polylactosamine. Fréquemment les résidus GlcNac sont fucosylés en  $\alpha$ 1-3, générant des structures Le<sup>x</sup> et polyLe<sup>x</sup>, similaires aux structures rencontrées dans le CCA (Srivastan *et al.*, 1992).

Il existe d'autres structures fucosylées inhabituelles chez le schistosome. Des glycolipides antigéniques présents chez l'oeuf, la cercaire et le ver adulte sont constitués d'un motif appelé core "schisto", GalNac $\beta$ 1-4Glc, sur lequel sont greffés des motifs répétés fucosylés, Fuc1-4(Fuc1-3)GlcNac1-2 (Leverly *et al.*, 1992). Cette structure est reconnue par un anticorps monoclonal (128C3/3), originellement préparé contre le glycocalyx cercarien, qui se lie à la surface des stades larvaires et non à la surface des adultes (Köster et Strand, 1994).

Il est à noter que contrairement aux glycoprotéines animales en général, on n'observe pas la présence d'acide sialique ni de glycoprotéines sulfatées chez *Schistosoma mansoni* (Nyame *et al.*, 1987, 1988).

### **3- Glycosyltransférases parasitaires**

Les nombreuses structures oligosaccharidiques rencontrées chez les schistosomes impliquent l'existence chez ces parasites d'un grand nombre de glycosyltransférases. Des

homogénats de *S.mansoni* présentent les activités galactosyltransférase (GalT), glucosyltransférase (GlcT) et mannosyltransférase (ManT) sur les lipides de schistosomes (Rumjanek et Smithers, 1978 ; Rumjanek *et al.*, 1979). Simpson *et al.* (1981) ont décrit des activités GalT et ManT associées au tégument de vers adultes.

Les vers adultes de *Schistosoma mansoni* contiennent une  $\beta$ 1-4GalT qui transfère le Gal depuis un donneur UDP-Gal vers un accepteur GlcNac pour former le disaccharide Gal $\beta$ 1-4GlcNac, N-acétyllactosamine (lacNac) (Rivera-Marrero et Cummings, 1990). Cette activité est similaire à celle rencontrée chez les mammifères ; toutefois la  $\beta$ 1-4GalT de schistosome n'est pas altérée par l' $\alpha$ -lactalbumine. Chez les mammifères la  $\beta$ 1-4GalT interagit avec l' $\alpha$ -lactalbumine pour former le complexe lactose-synthase, enzyme qui transfère le Gal sur un résidu Glc pour former le lactose. Comme il a été dit précédemment, les schistosomes présentent des motifs diacétyllactosédiamine (lacdiNac). Srivastan *et al.* (1994) ont décrit une nouvelle enzyme,  $\beta$ 1-4N-acétylgalactosaminyltransférase ( $\beta$ 1-4GalNacT), qui transfère le GalNac depuis l'UDP-GalNac vers le GlcNac sur des glycopeptides bi-antennés pour former le lacdiNac. Une enzyme similaire a été isolée à partir de cercaires de *T.ocellata* (Neeleman *et al.*, 1994).

De nombreux glycoconjugués de *Schistosoma mansoni* contiennent des structures fucosylées avec des liaisons variées. C'est le cas des glycolipides d'oeufs (Levery *et al.*, 1992), des O-glycanes du CCA (Van Dam *et al.*, 1994), des N-glycanes complexes (Srivastan *et al.* 1992) et de O-glycanes de la cercaire (Khoo *et al.*, 1995). Parmi ces oligosaccharides se trouvent les motifs Le<sup>x</sup> et polyLe<sup>x</sup>, présentant la liaison Fuc $\alpha$ 1-3GlcNac. Ces différentes structures impliquent la présence de différentes fucosyltransférases (FucT), dont plusieurs capables de synthétiser la même liaison.

Chez *T.ocellata* une activité  $\alpha$ 1-3FucT et une nouvelle activité  $\alpha$ 1-2FucT ont été observées chez la cercaire où ces activités enzymatiques sont responsables de la biosynthèse de structures polyLe<sup>x</sup> et Fuc $\alpha$ 1-2Fuc $\alpha$ 1-3(Gal $\beta$ 1-4)GlcNac (Hokke *et al.*, 1998). De tels motifs ont également été décrit dans des O-glycanes de cercaires de *S.mansoni* (Khoo *et al.*, 1995).

Les vers adultes de *S.mansoni* possèdent une  $\alpha$ 1-3FucT qui transfère le Fuc du GDP-Fuc vers le GlcNac sur le disaccharide Gal $\beta$ 1-4GlcNac pour donner le Le<sup>x</sup>, et vers le tétrasaccharide Gal $\beta$ 1-4GlcNac $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc pour donner le lacto-N-fucopentaose III (Ko *et al.*, 1990) antigène présent en surface des vers adultes (DeBose-Boyd *et al.*, 1996). Chez l'homme, les glycoconjugués-Le<sup>x</sup> sont synthétisés par une famille de FucT dont les membres

se distinguent par leur spécificité de substrat accepteur. La  $\alpha$ 1-3FucT de *S.mansoni* présente une activité enzymatique semblable à celle de la FucT humaine de type IV, connue pour utiliser préférentiellement des accepteurs non sialylés, et moins efficacement des accepteurs sialylés. Récemment, Marques *et al* (1998) ont caractérisé une FucT de *S.mansoni* dont la séquence est similaire de celle de la FucT humaine de type VII responsable de la synthèse de structures sLe<sup>x</sup> (Sasaki *et al*, 1994). Tout comme la FucT humaine, l'enzyme de *S.mansoni* est capable d'utiliser des accepteurs sialylés pour synthétiser le déterminant sLe<sup>x</sup>.

#### **4- Les sucres dans la relation avec l'hôte intermédiaire**

Les sucres présents en surface des différents stades intramollusques sont bien évidemment autant de cibles potentielles pour des lectines de l'hôte. Comme il a été dit précédemment, il apparaît un changement de déterminants saccharidiques de surface lors de la perte des plaques ciliées du miracidium se transformant en sporocyste. Ces plaques ciliées recouvrent la majeure partie du miracidium et sont éliminées par les hémocytes après leur détachement, ce qui peut expliquer que le miracidium soit la cible des lectines/agglutinines de l'hôte (Stein et Basch, 1979 ; Daniel *et al.*, 1992 ; Mansour, 1995). Johnston et Yoshino (1996) ont démontré que l'interaction entre les molécules plasmatiques de *B.glabrata* et les glycoprotéines de surface des sporocystes est en partie tributaire des sucres.

Une famille d'isolectines de *B.alexandrina* (BaS) est spécifique du trisaccharide fucosyllactose, (Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4Glc, présent dans des glycoprotéines du miracidium de *S.mansoni* (Mansour *et al.*, 1995) (cf. III-B-3-b). L'utilisation de la lectine BaSII a permis d'identifier deux glycoprotéines, de 37 kDa et 40 kDa, portant le déterminant fucosyllactose chez la cercaire de *S.mansoni*. Il s'agit d'une même protéine de 33 kDa, différenciellement glycosylée, avec un ou deux déterminants portés par des N-glycanes de type complexe, bi-antennés voire tri- ou tétra-antennés (Negm, 1996). Une molécule identique, Sm37 a été identifié chez le ver mâle adulte (Mansour, 1996). L'implication de ces lectines de *B.alexandrina* et du déterminant fucosyllactose de *S.mansoni* dans l'interaction hôte-parasite n'a pas été déterminée.

On ne peut exclure que les structures saccharidiques détectées en surface des trématodes ne puissent être des glycomolécules de mollusque adsorbées en surface des larves

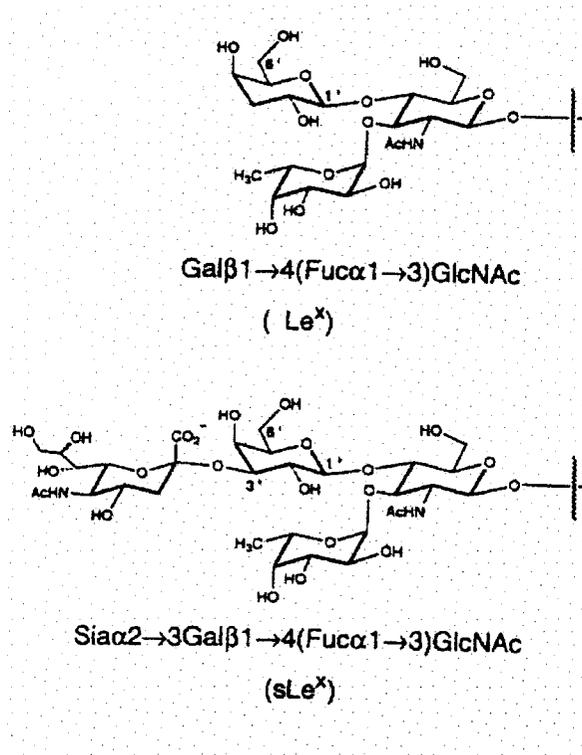


Figure 13 : Structures des oligosaccharides Lewis x et sialylLewis x.

intramollusques. Chez *T.szidati*, la cercaire émergeant du mollusque, qui a donc été en contact avec l'hémolymphe de l'hôte, fixe à sa surface plus de lectines qu'une cercaire mature provenant directement d'un sporocyste-mère. Cela laisse envisager que des sucres de l'hémolymphe se soient liés au tégument cercarien (Horák, 1995). Ce phénomène d'acquisition de molécules d'hôtes a déjà été évoqué au chapitre concernant le mimétisme moléculaire du parasite en matière de stratégie d'évasion (cf. II-C-5-b). Dans ce cadre il a été démontré que les larves de *S.mansoni* et *B.glabrata* partagent des épitopes glycaniques (Yoshino *et al.*, 1977 ; Dissous *et al.*, 1986 ; Zelck et Becker, 1990). Un exemple est le glycocalyx cercarien de *S.mansoni* qui présente des déterminants communs avec les tissus et l'hémolymphe de *B.glabrata* (Vieira et Kusel, 1991).

Si l'hypothèse du mimétisme moléculaire peut être basée sur l'acquisition de molécules d'hôte, elle peut également résulter de la synthèse de déterminants communs à ceux de l'hôte par le parasite. Mulder *et al.* (1995) ont purifié une  $\beta$ 1-4GalNacT à partir de la glande albumen de *L.stagnalis*, hôte intermédiaire de *T.ocellata*. Cet enzyme est impliqué dans la synthèse de glycoconjugués portant l'oligosaccharide lacdiNac, présent chez le parasite et dans l'hémocyanine du mollusque. L'enzyme de *L.stagnalis* se distingue des autres  $\beta$ 1-4GalNacT connues, par la nature de ces accepteurs. En ce sens, l'enzyme de *L.stagnalis* est semblable à la  $\beta$ 1-4GalNacT de *T.ocellata*. Cette constatation renforce l'hypothèse que le parasite *T.ocellata* synthétise des structures oligosaccharidiques qui contribuent au mimétisme moléculaire lui permettant d'échapper à la réponse de *L.stagnalis* (Neeleman *et al.*, 1994). Les résultats en matière d'accepteurs et de produits synthétisés par les  $\beta$ 1-4GalNacT de *L.stagnalis* et *T.ocellata* suggèrent que les deux enzymes soient très apparentées et pourraient dériver d'un gène ancestral commun (Neeleman, 1996).

### **5- Importance du Lewis x chez les schistosomes**

Parmi les oligosaccharides étudiés chez le schistosome, le trisaccharide Le<sup>x</sup>, Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNac, a été plusieurs fois évoqué. L'antigène Le<sup>x</sup> est originellement connu sous diverses nomenclatures, SSEA-1, CD15 ou haptène X. Il a tout d'abord été identifié comme antigène de différenciation de l'embryon de souris (SSEA-1, Stage-Specific Embryonic Antigen-1). Cet antigène est présent chez un grand nombre de glycolipides et glycoprotéines de cellules humaines : monocytes, neutrophiles, granulocytes, cellules du tractus urogénital..., ainsi que sous forme d'oligosaccharide libre dans le lait et l'urine. (**Figure 13**)

Chez *Schistosoma mansoni*, de nombreux travaux ont démontré la présence du Le<sup>x</sup> (Ko *et al.*, 1990; Srivastan *et al.*, 1992; Van Dam *et al.*, 1996). Des structures Le<sup>x</sup> et/ou polyLe<sup>x</sup> sont présentes au niveau du CCA, des N-glycanes, du glycocalyx cercarien. Köster et Strand (1994) ont utilisé un anticorps monoclonal anti-Le<sup>x</sup> (504B1) pour localiser l'expression de cet épitope. L'anticorps monoclonal 504B1 ne reconnaît pas la surface de la cercaire mais du matériel sécrété à proximité de la glande acétabulaire et au niveau de la ventouse ventrale. Le Le<sup>x</sup> apparaît en surface après la transformation en schistosomule et s'observe au niveau de la surface des vers adultes des deux sexes ainsi que sur l'épithélium intestinal des vers.

Nyame *et al.* (1998) ont démontré la présence de l'antigène Le<sup>x</sup> dans des protéines de hauts poids moléculaires chez deux autres schistosomes, *S.haematobium* et *S.japonicum* ; par contre il n'est pas exprimé chez d'autres helminthes, que ce soit le trématode parasite *Fasciola hepatica*, les nématodes parasites *Dirofilaria immitis* et *Haemonchus contortus* ou le nématode libre *Caenorhabditis elegans*. Cependant tous ces helminthes possèdent les structures Fuc $\alpha$ 1-3GlcNac et lacdiNac ; par conséquent l'antigène Le<sup>x</sup> semble être caractéristique des schistosomes.

De nombreuses études ont trait au Le<sup>x</sup>, dans l'interaction hôte-schistosome, du fait de la présence de cet antigène chez le parasite et de l'induction d'auto-anticorps chez les animaux et les patients infectés par *S.mansoni* (Nyame *et al.*, 1996), *S.haematobium* et par *S.japonicum* (Nyame *et al.*, 1998). C'est donc essentiellement la fonction du Le<sup>x</sup> chez l'hôte vertébré qui a été documentée. Il semblerait que les anticorps anti-Le<sup>x</sup> soient impliqués dans l'altération de la réponse immune de l'hôte, en induisant la cytolysse complément-dépendante de leucocytes humains *in vitro* (Nyame *et al.*, 1996), en altérant les propriétés de phagocytose des neutrophiles (Skubitz *et al.*, 1985), en affectant les fonctions du complément au niveau du C3bi (Hickstein *et al.*, 1986). L'antigène Le<sup>x</sup> ou tout au moins les glycoconjugués portant ce motif seraient directement impliqués dans la modulation du système immunitaire de l'hôte vertébré. En effet les glycanes-Le<sup>x</sup> seraient capables d'induire le changement de réponse immune observé dans la schistosomiase chronique (Velupillai et Harn, 1994), c'est à dire le passage d'une réponse à dominante cellulaire (type Th1) à une réponse à dominante humorale (type Th2) qui serait responsable de l'échec de la réponse immune de l'hôte observée dans ces infections (James et Sher, 1990). Ces glycanes-Le<sup>x</sup> sont capables d'induire la synthèse d'IL10

par les cellules B d'animaux infectés (Velupillai et Harn, 1994), l'IL10 exerçant alors une régulation négative sur la réponse Th1 (Sher *et al.*, 1991). Il est envisagé que d'autres glycanes contenant des motifs fucosylés (glycolipides d'oeuf, glycocalyx cercarien) soient également impliqués dans les phénomènes de modulation de la réponse de l'hôte (Cummings et Nyame, 1996).

Il existe une famille de molécule (d'adhérence) découverte chez les mammifères, les sélectines, qui comprennent parmi leurs ligands des lactosaminoglycanes fucosylés, sialylés voire sulfatés dont font partis les déterminants sLe<sup>x</sup> et Le<sup>x</sup> (cf. III-A-1-a). Les sélectines sont présentes chez les leucocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales. Ces sélectines appartiennent également aux lectines de type-C, leur domaine lectine est profondément impliqué dans l'interaction avec le ligand. L'existence de ces molécules laisse envisager une éventuelle interaction des glycoconjugués-Le<sup>x</sup> du schistosome et des sélectines de l'hôte dans des mécanismes d'adhérence cellulaire entre le parasite et l'hôte. Des motifs lacdiNac fucosylés, semblables à la structure rencontrée chez le schistosome, sont capables d'interagir avec la E-sélectine et de bloquer la réponse induite par cette molécule d'adhérence (Grinnel *et al.*, 1994). Une telle interaction pourrait intervenir lors des phénomènes de migration des parasites au sein du système circulatoire de l'hôte, bien qu'à ce jour aucun élément probant n'ait été apporté en faveur d'une telle hypothèse.

Par contre les travaux de Trottein *et al.* (1997) dans notre laboratoire ont démontré l'implication *in vitro* des molécules sélectines et Le<sup>x</sup> dans l'ADCC de macrophages envers les schistosomules de *Schistosoma mansoni*. L'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquant dirigés contre les sélectines et les motifs sLe<sup>x</sup> du macrophage inhibent la cytotoxicité des cellules contre les larves. De la même façon ce phénomène d'ADCC est bloqué par un anticorps monoclonal anti-Le<sup>x</sup> dirigé contre les schistosomules. Par contre un anti-sLe<sup>x</sup> n'a pas d'effet significatif, ce qui est en accord avec l'observation de l'absence d'acide sialique chez les schistosomes (Nyame *et al.*, 1988). Dans ces expériences des résultats identiques sont obtenus avec des anticorps anti-sélectine utilisés contre le schistosomule, suggérant l'existence d'une molécule sélectine-like en surface du parasite. Les auteurs évoquent la participation d'un double système lectine-sucre dans l'interaction entre macrophages et parasites. Ces résultats sont confirmés également par l'utilisation de sucres libres dans les expériences d'inhibition de la cytotoxicité (Trottein *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont également été obtenus au laboratoire dans le modèle de cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis

des schistosomules (Nutten *et al*, sous presse). Il est envisageable que l'existence de motifs  $Le^x$  chez le schistosome, en particulier dans des molécules libérées par le parasite, puisse avoir un effet négatif *in vivo* sur la réponse de l'hôte, via l'inhibition de mécanismes d'ADCC.

L'intervention du motif Le<sup>x</sup> dans la modulation de la réponse immune de l'hôte, l'existence de molécule d'adhérence du type lectine capable de reconnaître ce trisaccharide, sa présence qui semble restreinte aux schistosomes, tous ces arguments confèrent au déterminant Le<sup>x</sup> une importance capitale dans la relation hôte-parasite, et nous conduisent à envisager son existence et son rôle aux stades intra-mollusque de *S.mansoni*. Conséquence directe de cette hypothèse, il convient de rechercher l'existence d'une molécule réceptrice pour le Le<sup>x</sup> chez *B.glabrata*, molécule du type lectine et apparentée aux sélectines.

La présence d'un système récepteur-ligand analogue au système sélectine-Le<sup>x</sup> est à envisager dans le cadre des relations cellules effectrices (hémocytes, Bge)-sporocystes. A ce propos, le modèle de coculture cellules Bge-sporocystes est particulièrement adapté pour l'étude de phénomènes de reconnaissance et/ou adhérence. La démonstration d'un tel système récepteur ligand dans la relation *B.glabrata-S.mansoni* apporterait un éclairage nouveau sur les mécanismes de spécificité et de compatibilité de la relation hôte-parasite.

# **RESULTATS**

# I RECHERCHE D'UN SYSTEME "SELECTINE-LEWIS X" DANS LA RELATION HEMOCYTES-SPOROCYSTES.

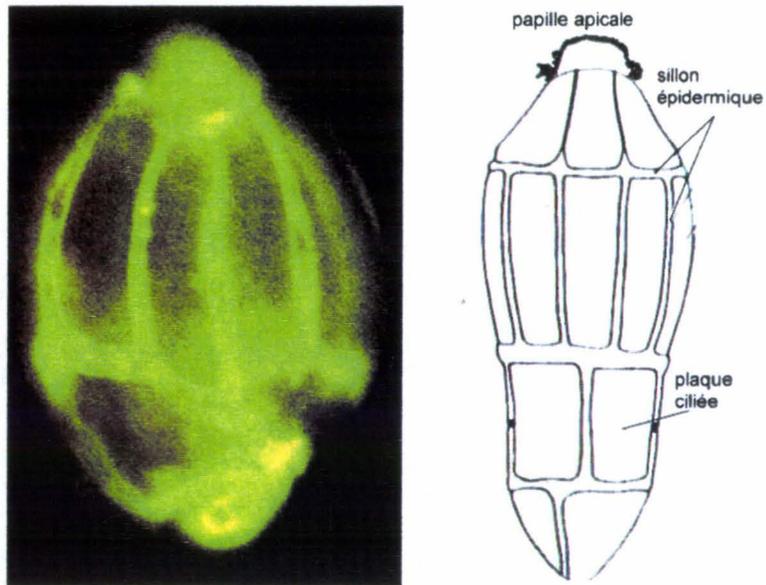
## 1- Immunomarquage anti-Le<sup>x</sup> sur les larves de *S.mansoni*.

La présence attestée du déterminant Le<sup>x</sup> à différents stades parasitaires de *Schistosoma mansoni* (ver adulte, schistosomule, oeuf), nous a conduit à rechercher ce trisaccharide au niveau des stades intramollusque. Cette investigation a été effectuée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD15 (Le<sup>x</sup>) sur des miracidiums et sporocystes (24h) fixés au paraformaldéhyde (PAF). L'observation en immunofluorescence révèle la présence de l'épitope CD15 en surface des sporocystes, de façon diffuse et uniforme. Par contre au niveau du miracidium, l'immunoréactivité n'est apparente qu'au niveau des sillons épidermiques entre les plaques ciliées, là où apparaîtra le futur tégument du sporocyste (**Figure 14**). Ces observations indiquent donc que le déterminant Le<sup>x</sup> semble être un composant des glycoconjugués de surface du stade sporocyste de *S.mansoni*.

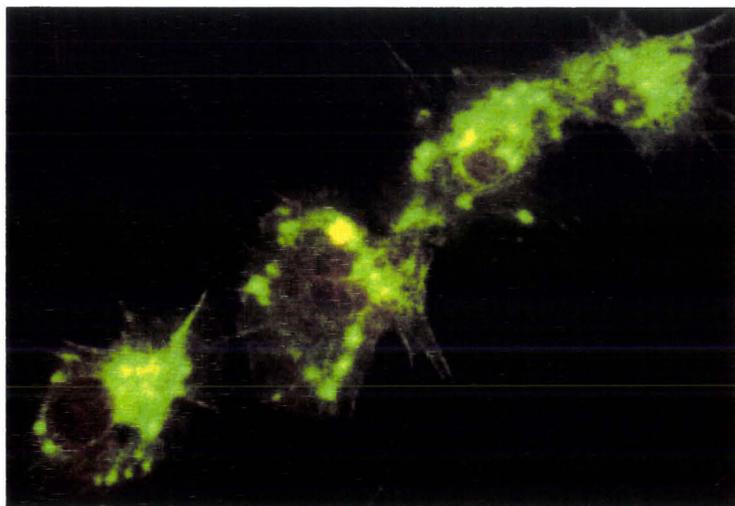
## 2- Immunomarquage anti-sélectine sur les hémocytes de *B.glabrata*.

La confirmation de la présence du trisaccharide Le<sup>x</sup> au stade intra-mollusque et l'implication de cette molécule dans des phénomènes de reconnaissance et d'immunité dans la relation hôte définitif-parasite (cf. Généralités III C-5), soulignent l'intérêt de la recherche d'une molécule réceptrice pour le Le<sup>x</sup> chez *B.glabrata*. Nous nous sommes tournés vers les récepteurs connus pour les motifs apparentés au Le<sup>x</sup>, chez les mammifères, les sélectines. Nous avons tout d'abord recherché ce type de molécules en surface des hémocytes du mollusque. Nous avons utilisé différents anticorps monoclonaux dirigés contre les trois types de sélectines connus (anti-E, anti-L, anti-P). Seul l'anticorps de spécificité anti-E/P révèle une immunoréactivité de surface sur les hémocytes fixés au PAF (**Figure 15**). Cette observation permet d'envisager l'existence d'une molécule "sélectin-like" chez *B.glabrata*.

Dans ces expériences, l'immunoréactivité des anticorps anti-sélectine a été testée vis-à-vis des miracidiums et des sporocystes, de même que l'anti-CD15 a été utilisé sur les hémocytes. Dans les deux cas aucun immunomarquage n'a été observé.



**Figure 14 : Marquage de surface d'un sporocyste (24h) de *S.mansoni* par un anticorps monoclonal anti-CD15. (x400)**



**Figure 15 : Marquage de surface d'hémocytes de *B.glabrata* par un anticorps monoclonal anti-E/P-sélectine. (x1000)**

### 3- Effet du fucoïdan sur les cellules Bge

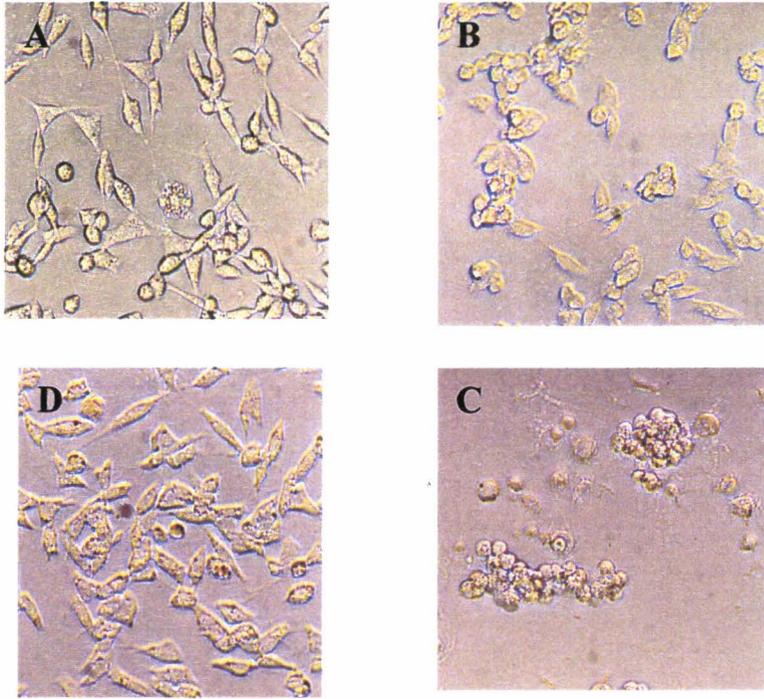
L'existence éventuelle d'une molécule apparentée aux sélectines chez *B.glabrata*, sous-entend son rôle probable dans les phénomènes d'adhérence cellulaire. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons utilisé un composé connu pour inhiber spécifiquement les fonctions d'adhérence des sélectines, le fucoïdan, polysaccharide sulfaté riche en fucose (Nasu *et al*, 1997). Nous avons mis en évidence que les cellules Bge en culture, en présence de fucoïdan, perdent leur adhérence au support, deviennent rondes et s'aggrègent (**Figure 16A**). Des expériences similaires ont été réalisées dans des cocultures de sporocystes de *S.mansoni* et de cellules Bge. Le même phénomène est observé, de plus l'adhérence des cellules aux parasites est également bloquée (**Figure 17**).

Dans ces expériences, nous avons utilisé comme contrôle un autre polysaccharide, le mannane. Ce polymère de mannose s'avère ne pas avoir d'effet, du point de vue morphologique sur les cellules Bge, en simple culture ou en coculture avec des sporocystes.

Nous avons mesuré l'incorporation de méthionine  $^{35}\text{S}$  sur des cellules Bge mises en culture en milieu dépourvu de méthionine (Minimal Salt Medium, MSM), soumise ou non à la présence de fucoïdan. La **figure 16B** montre que l'adjonction de fucoïdan sur les cellules Bge en culture a pour effet d'augmenter la synthèse protéique, de façon dose-dépendante, et témoigne d'une modification de l'activation des cellules. En présence de mannane, on ne constate pas de modification notable de la synthèse protéique.

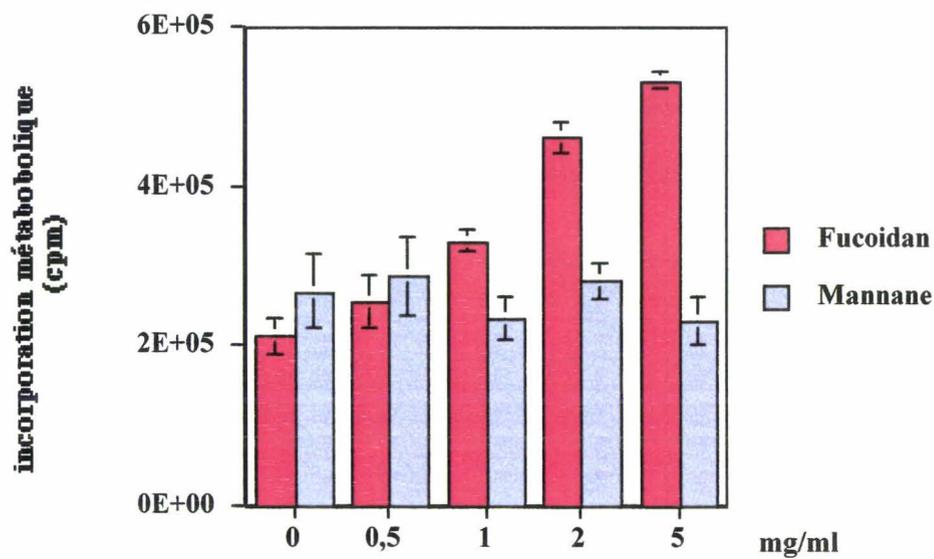
L'action spécifique du fucoïdan sur les cellules Bge, et qui plus est son effet au niveau des cocultures cellules-parasites, renforce l'hypothèse de l'existence et de l'intervention d'un système sélectine-ligand dans l'interaction cellules Bge-schistosome.

L'arrondissement et l'agrégation des cellules, couplées à une synthèse protéique accrue, témoignent d'un état d'activation des cellules. L'agrégation est un phénomène également observé chez les cellules Bge en présence de sporocystes, où dans les premiers jours de coculture les cellules forment d'important amas au contact des parasites. Sous l'effet du fucoïdan, les cellules se détachent du parasite pour former des conglomérats entre elles. Tout se passe comme si ce polysaccharide parvenait à mimer une structure présente sur le tégument du parasite et/ou émise par les larves de schistosome.

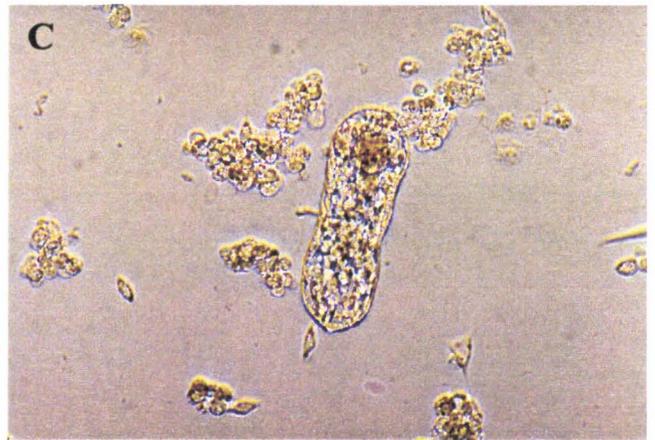
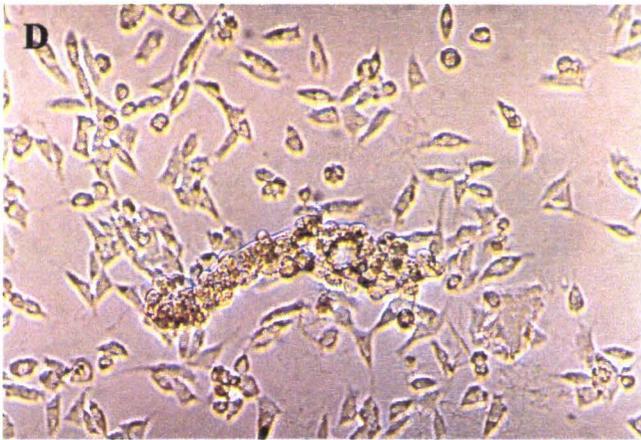
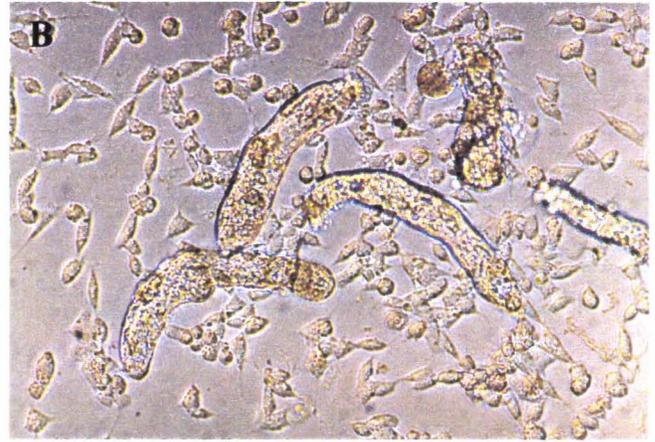
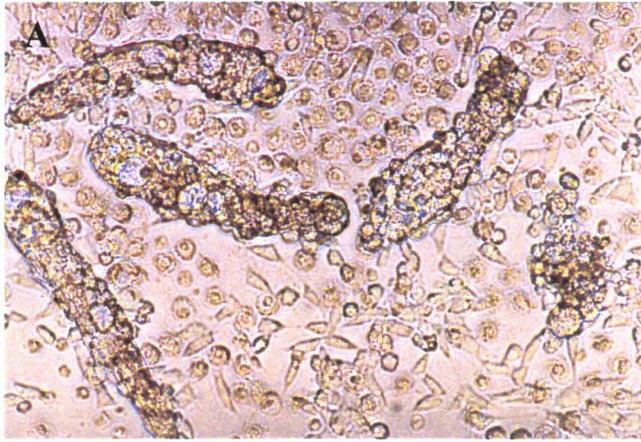


**Figure 16A : Effet du fucoïdan sur la morphologie des cellules Bge en culture.**

A : Contrôle. B : Fucoïdan 1mg. C : Fucoïdan 2mg. D : Mannane 2 mg.



**Figure 16B : Effet du fucoïdan et du mannane sur la synthèse protéique des cellules Bge.**



**Figure 17 : Effet du fucoïdan sur l'adhérence des cellules Bge aux sporocystes de *S.mansoni*, (cocultures de 48h).**

A : Contrôle. B : Fucoïdan 1mg. C : Fucoïdan 2mg. D : Mannane 2mg.

## II CLONAGE ET CARACTERISATION D'UNE MOLECULE

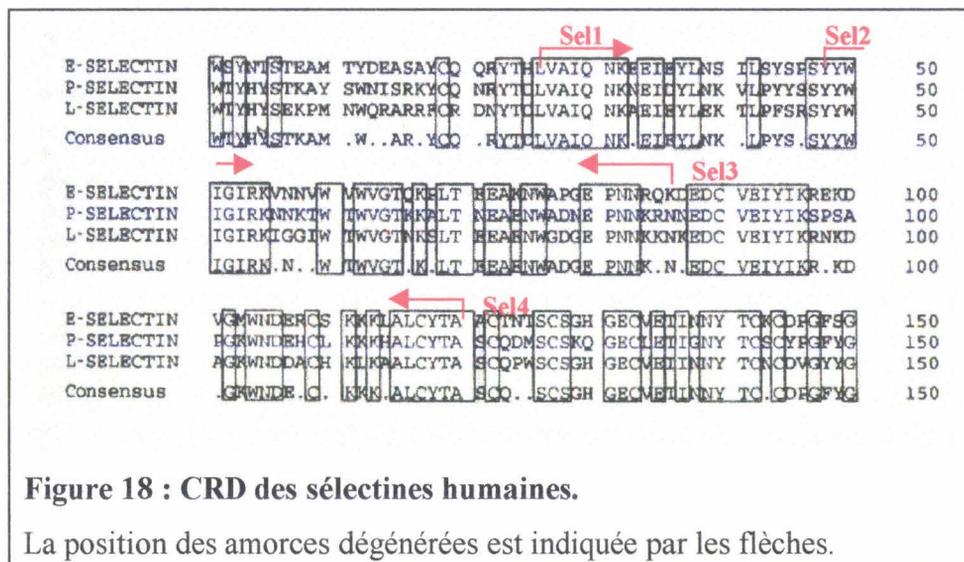
### APPARENTEE AUX SELECTINES CHEZ *B.glabrata*.

#### 1- Recherche d'un domaine lectine homologue aux sélectines.

La recherche d'une séquence apparentée aux sélectines dans le génome de *B.glabrata* a été effectuée par amplification de l'ADN génomique à partir d'oligonucléotides dégénérés établis selon les séquences du domaine lectine des sélectines humaines.

Les positions des amorces au sein de la séquence des sélectines sont indiquées sur la **figure 18**. Plusieurs raisons justifient le choix des amorces uniquement dans le domaine lectine des sélectines:

- l'importance des lectines chez les mollusques dans les phénomènes de reconnaissance, et *a fortiori* dans l'adhérence à des corps étrangers ;
- la fonction directe du domaine lectine dans la fixation à la partie glucidique du ligand ;
- le risque, en déterminant les amorces dans une autre région (le domaine EGF-like par exemple), d'amplifier une ou plusieurs molécules non apparentée à la lectine recherchée.



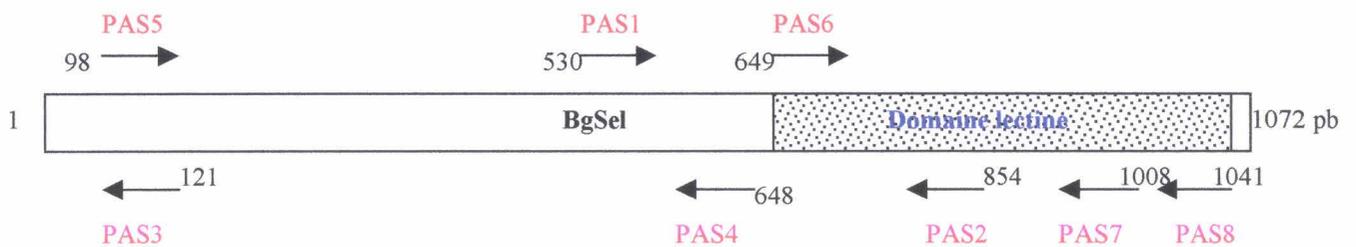
Différentes combinaisons d'oligonucléotides ont été utilisées permettant d'obtenir plusieurs produits d'amplification de tailles diverses, à partir d'ADN génomique de mollusques entiers. Les produits d'amplification ont été sous-clonés en vecteurs pCR<sup>TM</sup>II et séquencés ; un seul produit d'amplification s'est avéré présenter un cadre ouvert de lecture

affichant des homologies avec le domaine lectine des sélectines ; il s'agit d'une séquence obtenue avec les amorces "Sel1" et "Sel3".

## 2- Clonage de la séquence BgSel à partir d'ARN de mollusque

### a- RT-PCR

Afin de vérifier que la séquence obtenue correspond à un gène effectivement transcrit, cette séquence a été recherchée au niveau de l'ADNc de *B.glabrata*. Une réaction de transcription inverse a été réalisée à partir d'ARN polyA<sup>+</sup> de mollusque. Deux oligonucléotides, PAS1 et PAS2 (**Figure 19**), ont été désignés aux extrémités de la séquence amplifiée par "Sel1" et "Sel3", et ont permis de procéder à une amplification par PCR à partir de l'ADNc d'un produit unique de 322pb (**Figure 23**) dont la séquence est identique à celle amplifiée précédemment à partir d'ADN génomique. Ce résultat nous a conduit à rechercher le transcrit entier dans la banque d'ADNc de *B.glabrata*.



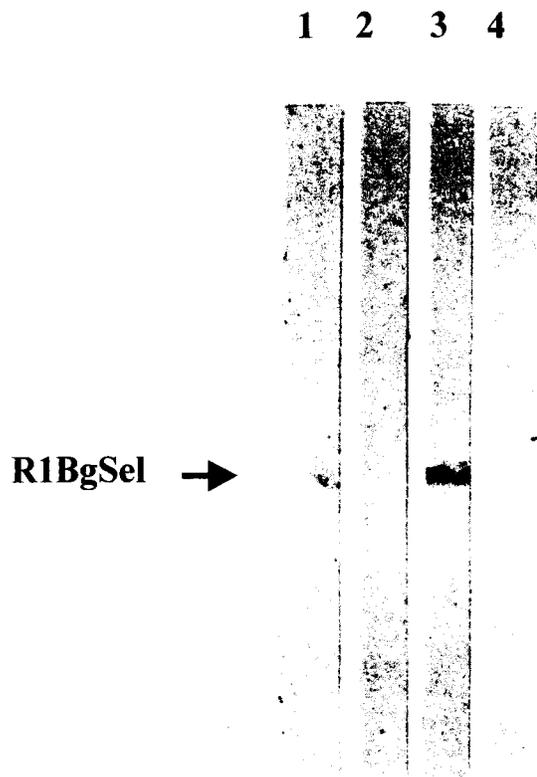
**Figure 19 : Position et sens des amorces pour PCR dans la séquence BgSel.**

### b- Criblage d'une banque d'ADNc de *B.glabrata*.

Le produit d'amplification obtenu à partir de l'ADNc a servi de sonde pour cribler une banque  $\lambda$ ZAPII d'ADNc de *B.glabrata*. Après trois criblages successifs d'environ  $5.10^6$  clones, douze clones ont été sélectionnés et analysés. Trois clones indépendants contenaient des inserts de longueur légèrement variable présentant une séquence commune renfermant la séquence de la sonde. L'insert le plus long (clone 12) présente une séquence de 1053 pb avec un cadre de lecture ouvert codant pour une séquence de 329 amino-acides, nommée BgSel (**Figure 26**).

### **3- Analyse du domaine lectine recombinant**

Il a paru intéressant, à cette étape du travail, de rechercher l'existence d'une immunoréactivité croisée entre BgSel et les sélectines. Une protéine recombinante (rBgSel/CRD) a été produite chez *E.coli* (seul le domaine homologue aux sélectines a été sous-cloné et produit, cf. V-1). Un immunoblotting de rBgSel a été réalisé, l'immunodétection a été faite à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-E- et anti-P-sélectine ainsi que par un sérum polyclonal anti-P-sélectine. La **figure 20** présente la reconnaissance de rBgSel par l'anticorps monoclonal anti-E-sélectine et par le sérum polyclonal anti-P-sélectine.



**Figure 20 : Analyse de R1BgSel (BgSel/CRD recombinante) par Western blot, avec des anticorps anti-sélectine.**

1 : Sérum anti-P-sélectine. 2 : sérum sain.

3 : Anti ELAM-1 (Anti-E-sélectine). 3 : contrôle.

### III ETUDE DE LA PROTEINE BGSEL CHEZ LES CELLULES BGE

#### 1- Analyse du génome des cellules Bge

La recherche du gène BgSel dans le génome de la lignée cellulaire de *B.glabrata* a été effectuée par Southern blotting. De l'ADN génomique de cellules Bge a été digéré par les enzymes de restriction EcoRI, BamHI et XhoI ; l'insert complet issu du clone 12 a été utilisé comme sonde.

Le résultat indique la présence de la séquence BgSel au niveau du génome des cellules Bge. On observe deux bandes dans la piste EcoRI, comme attendu du fait de la présence d'un site EcoRI dans la séquence de BgSel (**Figure 21**).

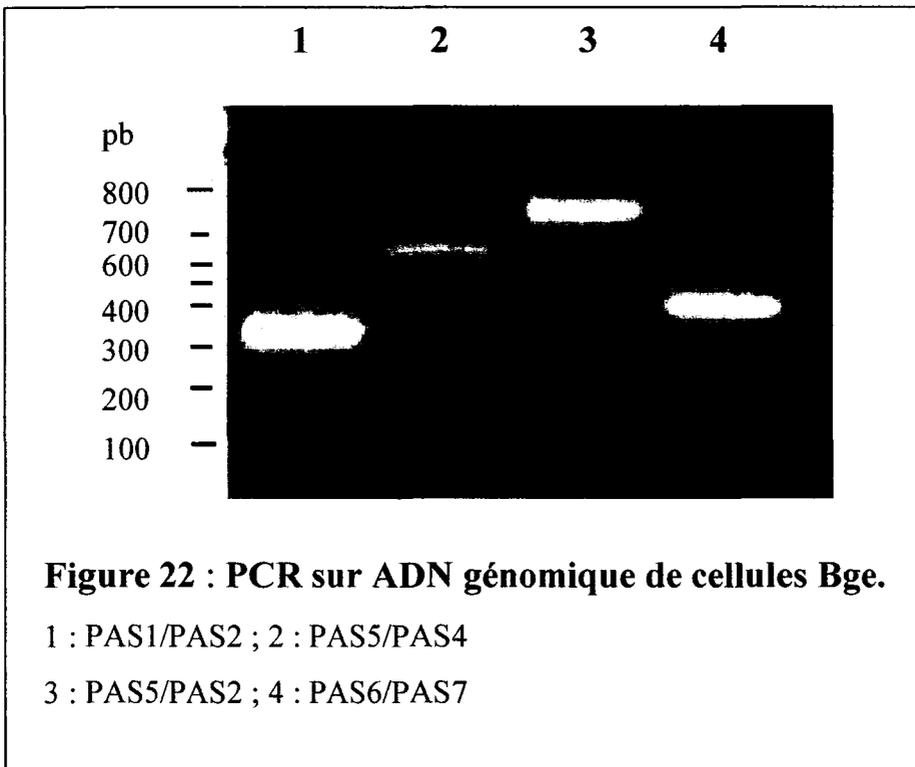
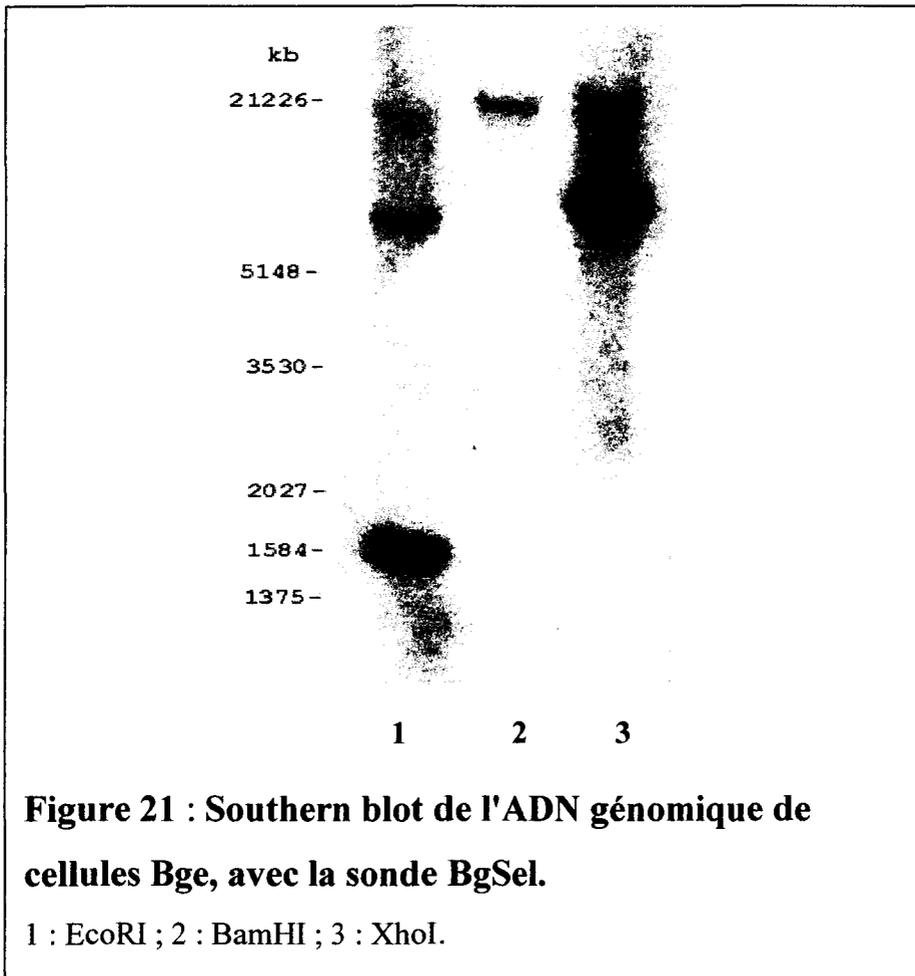
Pour confirmer ce résultat, une série d'amplification par PCR a été réalisée sur ADN génomique de cellules Bge, à l'aide de quatre couples d'amorces qui se chevauchent et couvrent la séquence BgSel jusqu'à l'extrémité de son domaine lectine supposé (PAS1/PAS2 ; PAS5/PAS4 ; PAS5/PAS2 ; PAS6/PAS7).

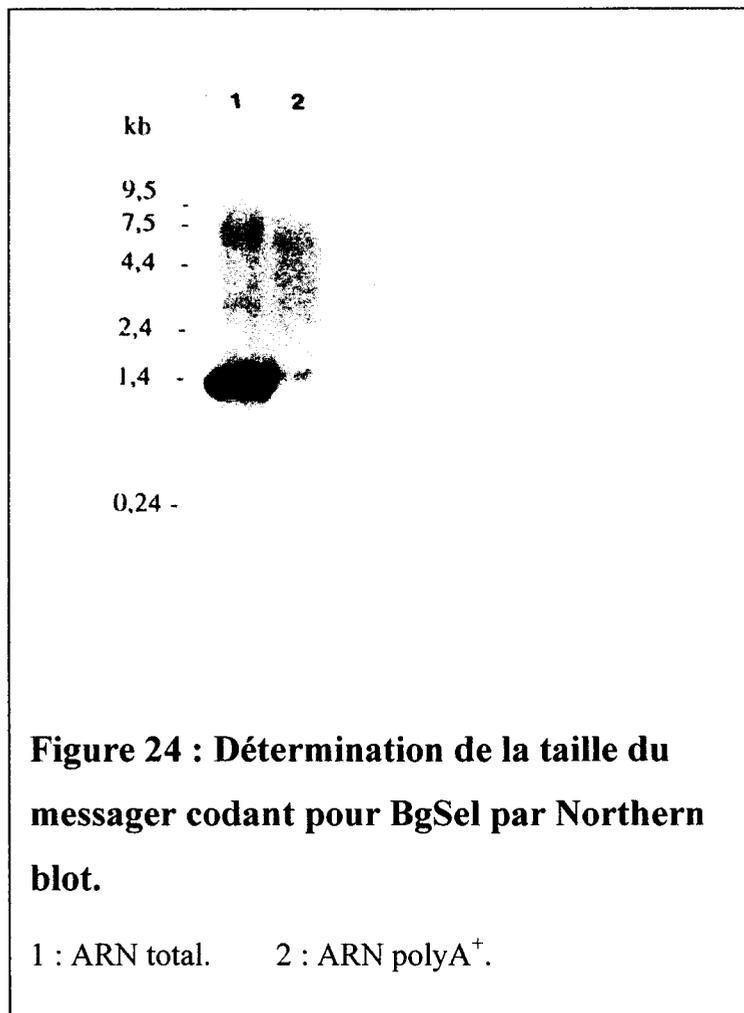
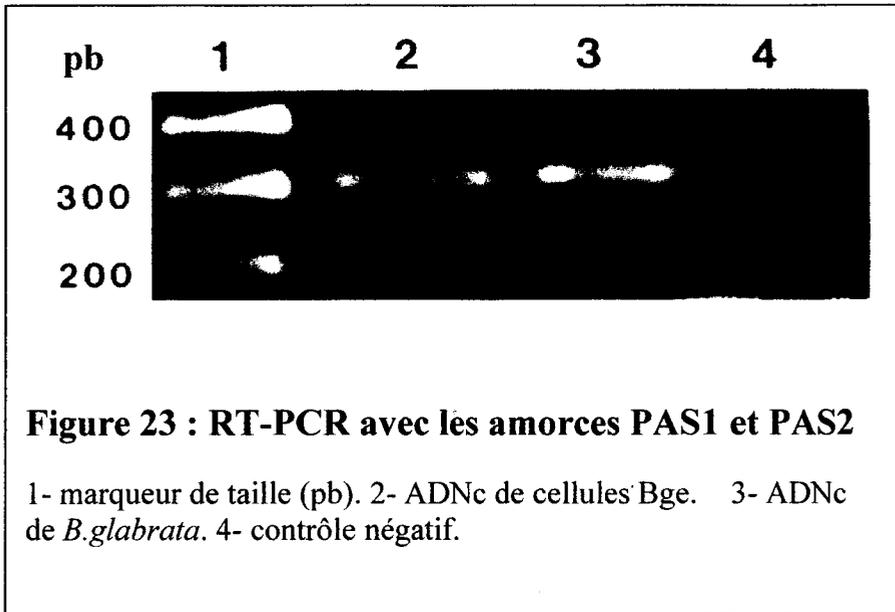
Pour chaque couple d'oligonucléotides, un produit unique a pu être obtenu (**Figure 22**). Chaque produit d'amplification est de la taille attendue dans cette partie connue du gène BgSel, indiquant l'absence d'intron, ou toutefois d'intron de taille visible.

#### 2- Analyse de l'ARN des cellules Bge

Afin de vérifier si le gène BgSel est effectivement exprimé chez les cellules Bge, il a été procédé à une réaction de transcription inverse à partir d'ARN total de cellules, suivie d'une amplification par les amorces "PAS1" et "PAS2". Nous avons obtenu un produit unique, à la taille attendue (322pb), présumant l'existence d'un transcrit BgSel dans la lignée cellulaire de *B.glabrata*. (**Figure 23**)

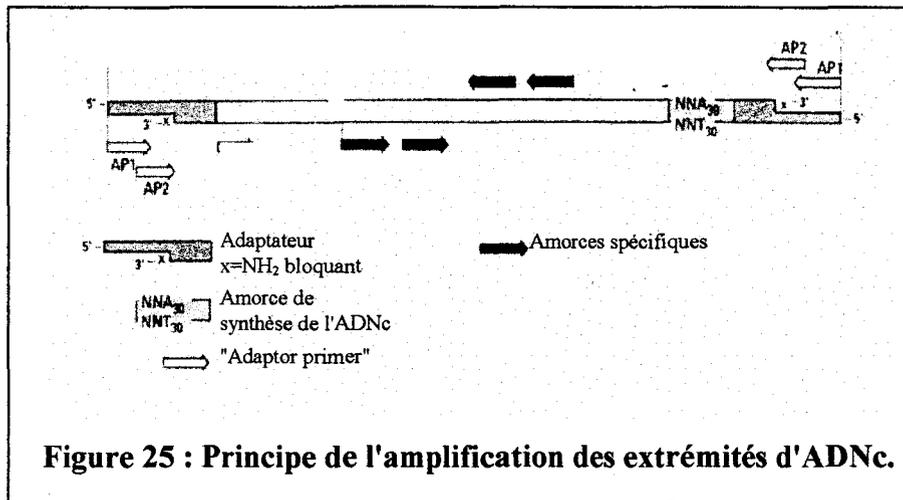
Une analyse par Northern blot de l'ARN total et polyA<sup>+</sup> de cellules Bge, utilisant la séquence BgSel comme sonde a été ensuite réalisée (**Figure 24**). Le Northern blot a permis de confirmer la présence d'un messenger codant pour BgSel dans la lignée cellulaire de *B.glabrata*.





En l'absence de région non codante en 5' de la séquence BgSel, il était important de vérifier si BgSel correspond à une séquence d'ADNc complète ou partielle. La taille calculée du messager visible sur le Northern blot était d'environ 1 kb, ce qui correspondait à la longueur de l'ADNc obtenu à partir de la banque  $\lambda$ ZAPII. Toutefois, on ne pouvait exclure que BgSel soit partiellement tronquée en son extrémité N terminale.

Pour définir l'extrémité 5' de BgSel, nous avons choisi d'utiliser la technique de 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End) ou amplification rapide de l'extrémité 5' de l'ADNc, en utilisant le kit "Marathon cDNA Amplification" (Clontech). Le système "Marathon" (**figure 25**) consiste à synthétiser de l'ADNc double brin à partir de l'ensemble de l'ARN total ou polyA<sup>+</sup>, puis à greffer un adaptateur aux deux extrémités des ADNc. On obtient ainsi une banque d'ADNc double brin à partir de laquelle peut être amplifié un ADNc spécifique. L'amplification est réalisée par PCR avec un oligonucléotide spécifique de la séquence d'intérêt et une amorce AP1 située dans l'adaptateur. La spécificité de cette technique réside en l'absence de site AP1 sur l'ADNc-adaptateur ; le site AP1 est créé sur l'ADNc cible par extension de la séquence à partir de l'amorce interne spécifique au cours du premier cycle d'amplification. Au cours des cycles suivants, AP1 et l'amorce interne vont pouvoir se fixer ensemble, permettant l'amplification exponentielle de la séquence d'intérêt. Le groupement amine à l'extrémité courte de l'adaptateur empêche l'extension en 3' de l'ADNc et donc la formation d'un site AP1 sur l'ensemble des ADNc. L'obtention de produit non spécifique est limitée puisque le site AP1 ne peut être créé sur l'ensemble des ADNc, qui par ailleurs ne présentent pas de site pour l'amorce spécifique. De plus, la spécificité peut être augmentée par la possibilité de réaliser une "nested PCR" avec une autre amorce interne et l'amorce AP2 dont le site est situé dans l'adaptateur et chevauche AP1.



Cette technique a été appliquée sur de l'ADNc préparé à partir d'ARN polyA<sup>+</sup> de cellules Bge. Dans un premier temps, une première série de PCR a été effectuée avec les couples d'amorces : AP1/PAS2, AP1/PAS3, PAS1/PAS2.

Au vu des résultats obtenus, des "nested"PCR et des "semi-nested"PCR ont été réalisées à partir des produits d'amplification obtenus dans les réactions précédentes, ceci afin de vérifier la spécificité des produits d'amplification, avec les combinaisons d'amorces : AP1/PAS4, AP2/PAS2, AP2/PAS3, PAS4/PAS5.

Suite à ces résultats, les différents produits PCR obtenus ont été sous-clonés et séquencés. Seul le produit d'amplification AP2/PAS3 présente une séquence N-terminale en amont de la séquence déjà connue, prolongeant de 19 pb la séquence de BgSel. Ce résultat permet également d'allonger la séquence protéique de BgSel de sept amino-acides comportant une méthionine en troisième position (**Figure 26**).

<b>GAGAAAATGTCTAGTTTAGGA</b>	AGTTTTATAGCTGTCTGCTTTCTCGTCCAATGTTCTGATTGTTTATTAA	70
<b>E K M S S L G</b>	S F I A V C F L V Q C S D C L L	23
GTGTCTCGTCTTCTCCATCAACTATAGACGTTGGTCTCACTAACTCACTGGATGTTCTATGTTCCCTATAC		140
S V S S S P S T I D V G L T N S L D V L C S Y T		47
ACGCACTAAAGGACAGTCCCTTGAAGCCCTTGTCGCCCTGAGTATCTCTCGTTCAATGAACGCAACGGAC		210
R T K G Q S L E A L V A L S I S R S M N A T D		70
TTTCAAGAGTTGGCTCTGATCAATGTTTTACAGGAAACATTGTGACTTTGTTTACCCTGAAGCTGTCA		280
F Q E L A L I N V F T G N I V T L F T T E A V		93
CAGGAACCGGTTCGTGTAGACACCTATGGAGACTCATTTATAAATCTCCACTGGGACTACCCAACAATGTC		350
T G T G R V D T Y G D S F I N L H W D Y P T M S		117
TGCGGTTGGGACTTACCAGTGCCTGCTCACGGGTCAGATACCATTGGACACGACATTCTCATCAACAAC		420
A V G T Y Q C T A H G S D T I G H D I L I N N		130
CTTACCAGTGTGGACTACACTAAACCAGACCAGGATGTCCTACTGAATAAGATTTCATGAAATGGACAACG		490
L T S V D Y T K P D Q D V L L N K I H E M D N		153
CATTGAAAGCTCTCCAGAACAAGATGGATGAGCTGAGAAACTACAGTGCGGTGGTAACCACACTGCTCAG		560
A L K A L Q N K M D E L R N Y S A V V T T L L R		177
AGAAAACGCACATTTGAAAGAGTGCTGCAATGCCAACTCCAGAAAAGTTGACGTCTTGTTACACAGTGTG		630
E N A H L K E C C N A N S R K V D V L L H S V		200
TTTGACACGCTAGTCAACAACAGCTATTTTCTATCCAAGGAGAACTCAAGTAACATCACTGAAGCAGCGG		700
F A H V V N N S Y F L S K E N S S N I T E A A		223
CTGTGTGTAACAGATATGACGGATATCTTGTGGAGATCACTTCACTGAACAATATCACGTGATCAGAGA		770
A V C N R Y D G Y L V E I T S A E Q Y H V I R D		247
TTTTTTACTCTTGAATTCCACGAACGCTTTGGGCATTTTCTTGGAGCTAGAAAATACGGTAACACCTGG		840
F L L L N S T N A L G I F L G A R K Y G N T W		270
CGTTATAGCCACAGTTTTCAGGAATGTCAGCTACTTCAACTGGGATTATGGTGAGCCCAATCCACTGACAA		910
R Y S H S F R N V S Y F N W D Y G E P N P L T		293
ATTATGACTGTATGTATTTACAATATAGGTCCAACCTAAAGATGTTTCAGTTTCCCTTGCACATCTAGTTT		980
N Y D C M Y L Q Y R S N L K M F S F P C T S S F		317
CTATCAGTTTTATGCTTTGTGTGAATTTCCAATGTTTTCTTCAGATTCACTTAACGTTTA <u>ATTAAAAAA</u>		1050
Y Q F Y A L C E F P M F S S D S L N V .		336
AAAAAACCTTAAAAAAAAAAAAA		1072

**Figure 26 : Séquence nucléotidique et protéique de BgSel.**

L'extrémité N terminale déterminée après amplification par la technique "Marathon" est encadrée.

Le domaine lectine est indiqué en caractère gras. Le signal de polyadénylation est souligné.

### 3- BgSel native

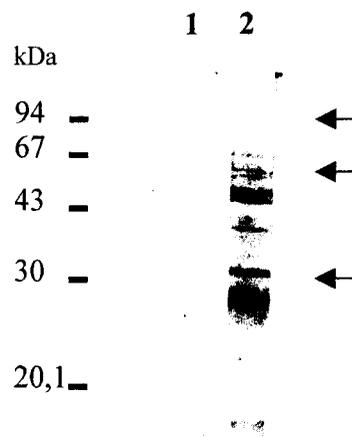
L'expression de la protéine BgSel native chez les cellules Bge a tout d'abord été examinée par analyse en Western Blot des protéines totales des cellules, à l'aide du sérum anti-BgSel. L'immunomarquage révèle un profil complexe, avec de nombreuses bandes non spécifiques, qui rendent l'interprétation des résultats difficile.

Les protéines membranaires ont été examinées de la même façon, après purification des membranes et traitement au déoxycholate de sodium (DOC). Trois bandes se distinguent à 95, 60 et 38 kDa, dans la fraction membranaire non extractible par le DOC. Là encore, le profil obtenu reste toutefois complexe (**Figure 27**).

Afin d'améliorer ces résultats, nous avons procédé à l'immunoprécipitation des protéines par le sérum anti-BgSel, après marquage métabolique à la méthionine <sup>35</sup>S de cellules Bge. L'analyse par SDS-PAGE en conditions réductrices révèle la présence de deux bandes spécifiques de 95 et 81 kDa ; dans des conditions non réductrices, on retrouve les deux bandes, observables à 95 et 77 kDa (**Figure 28**).

L'étude de l'expression de la protéine native a également été réalisée par immunocytochimie. Aucun marquage n'a pu être obtenu en surface des cellules Bge. Toutefois, après perméabilisation par le TritonX100, on observe une localisation intracytoplasmique du marquage de BgSel (**Figure 29**). Le même résultat est obtenu avec les hémocytes de *B. glabrata*. Bien que d'après le Western blot, BgSel native puisse être associée aux membranes des cellules Bge, ce nouveau résultat indique que le CRD de BgSel n'est pas exprimé en surface de la cellule. La protéine BgSel pourrait également être associée à des membranes intracellulaires. Enfin il est possible que la protéine reste inaccessible aux anticorps à la surface de la cellule. La présence, au niveau de la séquence de BgSel, d'un peptide signal et d'un site de clivage (cf. IV-1), indique toutefois un passage par la membrane cytoplasmique, et serait en faveur d'une sécrétion de la protéine. Afin de vérifier cette possibilité, les produits d'excrétion/sécrétion (E/S) des cellules Bge ont été analysés en Western Blot. Les anticorps anti-BgSel révèlent la présence dans les produits issus de la culture des cellules d'une bande majeure unique à 75 kDa (**Figure 30**), pouvant correspondre à l'une des bandes observées après immunoprécipitation.

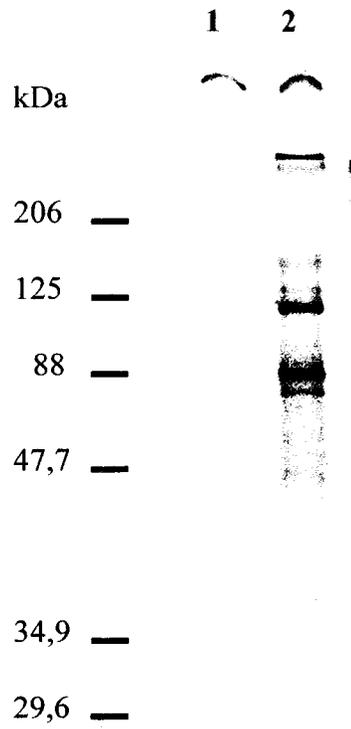
Les différences notables de taille entre les protéines détectées par Western Blot et la séquence protéique de BgSel suggèrent l'intervention de modifications post-traductionnelles. Les produits E/S des cellules Bge ont été soumis à une déglycosylation par une N-glycosidase, afin de pouvoir estimer l'importance de la glycosylation dans la masse moléculaire de BgSel native. Le résultat de la **figure 30** indique qu'après déglycosylation, la masse moléculaire de la protéine reconnue par l'immunsérum est de 36 kDa, proche de celle calculée pour la séquence clonée BgSel (Figure 24) qui est de 38,8 kDa. Cette glycosylation importante pourrait s'expliquer par la présence de huit sites potentiels de N-glycosylation.



**Figure 27 : Western blot de membranes de cellules Bge traitées au DOC (fraction non extractible).**

1 : Sérum préimmun. 2 : Sérum anti-BgSel.

Les bandes principales sont indiquées par les flèches.

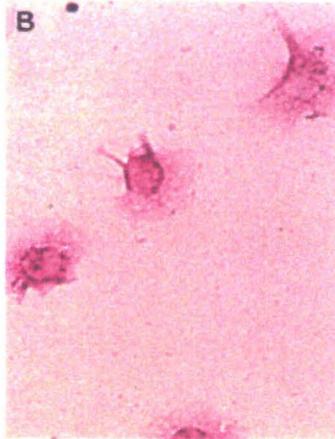


**Figure 28 : Immunoprécipitation des protéines totales de cellules Bge.**

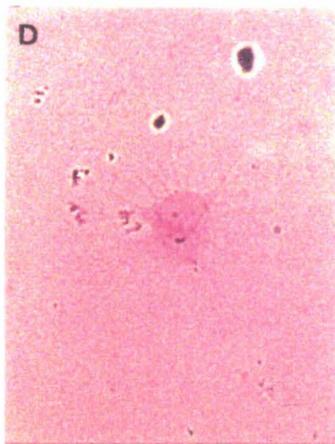
1 : Sérum préimmun.    2 : Sérum anti-BgSel.

**Cellules Bge**

**Hémocytes**

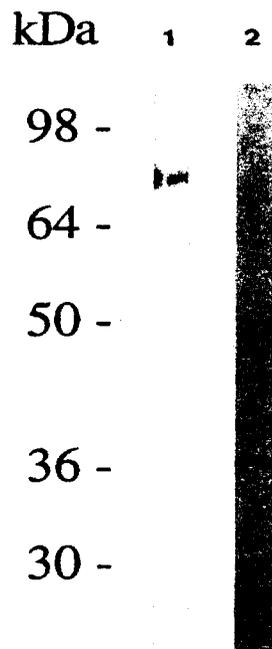


**Sérum  
anti-BgSel**



**Contrôle**

**Figure 29 : Immunomarquage de cellules Bge et d'hémocytes de *Biomphalaria glabrata* (x1000). (cellules perméabilisées par le TritonX-100).**



**Figure 30 : Western Blot des produits  
E/S de cellules Bge.**

Révélation par le sérum anti-BgSel.

1 : produits E/S .

2 : produits E/S déglycosylés par la PNGase F.

## IV ANALYSE STRUCTURALE DE BGSEL

### 1- Caractéristiques de la séquence primaire de BgSel

Les résultats de Northern Blot indiquent la présence d'un messager de 1 kb codant pour BgSel et confirment ainsi l'extrémité 5' de la séquence BgSel (Figures 24 et 26). Cette séquence présente un cadre de lecture ouvert de 336 amino-acides codant pour une protéine de 38.8 kDa. Elle possède un codon d'initiation *ATG* en position 7, et un codon stop en position 1038. Un signal de polyadénylation, *AATTAA*, est situé des positions 1039 à 1044.

Une analyse de la séquence selon Nielsen *et al* (1997) a permis de déterminer la présence d'un peptide signal du résidu 1 au résidu 21, et d'un site de clivage, *SDC-LL*, placé entre le résidu 21 et le résidu 22.

La séquence BgSel révèle la présence de huit sites de N-glycosylation potentiels, aux positions 67, 140, 177, 216, 225, 228, 262, 288. Quant à la O-glycosylation, bien que l'on ne puisse déterminer *a priori* les sites concernés, la séquence possède 63 résidus Sérine et Thréonine. Néanmoins, nous avons interrogé une banque de données concernant les protéines O-glycosylées et permettant certaines prédictions sur la O-glycosylation sur la base des informations connues sur la glycosylation de glycoprotéines de type mucine (Ramneek *et al*, 1999). De la soumission de BgSel sur cette banque, il ressort que seuls quatre résidus (Ser30, Thr31, Thr90 et Ser117) seraient potentiellement O-glycosylés. Quoiqu'il en soit, les résultats de déglycosylation par la N-glycosidase F sont en faveur d'une N-glycosylation préférentielle.

### 2- Comparaison avec les sélectines

La séquence BgSel a été comparée avec la séquence des sélectines humaines. Seule la partie C-terminale de la protéine peut être alignée avec les sélectines. Elle présente un domaine de 119 amino-acides, similaire au domaine lectine des sélectines (**Figure 31**). L'identité de ce domaine avec les sélectines humaines est de 29,1% pour la E-sélectine, 28,3% pour la L-sélectine et 26,8% pour la P-sélectine. Ces homologies de séquence peuvent expliquer l'immunoréactivité des anticorps anti-E/P sélectine sur les hémocytes (cf.I-2).

Toutefois la comparaison de BgSel avec les sélectines montre des différences majeures en terme de structure et d'organisation de la molécule. En effet, on ne retrouve pas chez BgSel, en dehors du domaine lectine, les autres domaines caractéristiques des sélectines, à savoir le domaine EGF-like et les domaines rencontrés chez les protéines fixatrices du complément. L'examen des gènes de lectines de mammifères indique que dans la plupart des cas, des introns délimitent chaque région de reconnaissance du ligand glucidique (Carbohydrate Recognition Domain, CRD) ; ainsi le CRD des sélectines est codé par un seul exon (Drickamer, 1993). La même observation a pu être faite en ce qui concerne les autres domaines de la molécule. La corrélation entre la présence des introns et les limites d'un domaine suggère que les gènes de sélectines soient apparus au cours de l'évolution par combinaison d'exons ("exon shuffling"). Par conséquent l'absence des différents domaines caractéristiques des sélectines chez BgSel pourrait expliquer qu'une parenté entre BgSel de *B. glabrata* et les sélectines de mammifères, puisse être limitée au domaine CRD. Le domaine lectine de BgSel pourrait être considéré comme un motif ancestral, partie intégrante de l'évolution des sélectines.

Autre différence majeure, le domaine lectine est situé en position N-terminale des sélectines et en position C-terminale chez BgSel. Ces observations sont en accord avec les informations connues sur l'ensemble des lectines animales qui indiquent que le CRD est présent en différentes localisations et associé à d'autres domaines de nature variée, selon la molécule considérée. Cette autre différence entre BgSel et sélectine n'exclut pas cependant un lien éventuel entre ces molécules. En effet, l'organisation des sélectines place le CRD entièrement dans la partie extracellulaire de la molécule ; en outre l'examen tri-dimensionnel des lectines animales indique que les extrémités NH<sub>2</sub> et COOH du CRD sont très proches dans l'espace. Ainsi le CRD N-terminal d'une molécule transmembranaire de type I (comme c'est le cas chez les sélectines), ou le CRD C-terminal d'une protéine de type II, peuvent se présenter sous la même orientation à la surface de la cellule. Dans l'hypothèse où le domaine lectine de BgSel serait extracellulaire, sa position C-terminale n'est donc pas incompatible avec une éventuelle similarité fonctionnelle avec le domaine lectine des sélectines.

N	S	Y	F	L	S	K	E	N	S	S	N	I	T	E	A	A	V	C	-	-	N	R	Y	-	D	G	Y	L	V	E	I	T	S	A	E	Q	Y	H	V	I	R	D	F	L	L	N	S	BgSel.	
W	S	Y	N	T	S	T	E	-	A	M	T	Y	D	E	A	S	A	Y	C	Q	Q	-	R	Y	T	H	-	L	V	A	I	Q	N	K	E	E	I	E	Y	L	N	S	I	L	S	-	Y	S	E-Sel.
W	T	Y	H	Y	S	-	E	K	P	M	N	W	Q	R	A	R	R	F	C	R	D	N	-	Y	T	D	-	L	V	A	I	Q	N	K	A	E	I	E	Y	L	E	K	T	L	P	F	-	S	L-Sel.
W	T	Y	H	Y	S	-	T	K	A	Y	S	W	N	I	S	R	K	Y	C	Q	-	N	R	Y	T	D	-	L	V	A	I	Q	N	K	N	E	I	D	Y	L	N	K	V	L	P	Y	Y	S	P-Sel.

T	N	A	L	G	I	F	L	G	A	R	K	Y	G	N	T	W	R	Y	S	H	S	F	R	N	V	S	Y	F	-	-	N	W	-	D	Y	G	E	P	N	P	L	T	N	-	Y	D	C	M	-	BgSel.
P	S	Y	-	-	Y	W	I	G	I	R	K	V	N	N	V	W	V	W	V	G	T	Q	K	P	L	T	E	E	A	K	N	W	A	P	-	G	E	P	N	N	R	Q	K	D	E	D	C	V	E	E-Sel.
R	S	Y	-	-	Y	W	I	G	I	R	K	I	G	I	W	T	W	V	G	T	N	K	S	L	T	E	E	A	E	N	W	G	D	-	G	E	P	N	N	K	K	N	K	E	D	C	V	E	L-Sel.	
-	S	Y	-	-	Y	W	I	G	I	R	K	N	N	K	T	W	T	W	V	G	T	K	K	A	L	T	N	E	A	E	N	W	A	D	N	-	E	P	N	N	K	R	N	N	E	D	C	V	E	P-Sel.

-	Y	L	Q	Y	R	S	N	L	K	M	F	S	-	F	P	C	T	S	S	F	Y	Q	F	Y	A	L	C	-	E	BgSel.
I	Y	I	K	R	E	K	D	V	G	M	W	N	D	E	R	C	S	K	-	-	K	K	L	A	L	C	Y	T	E-Sel.	
I	Y	I	K	R	N	K	D	A	G	K	W	N	D	D	A	C	H	K	-	-	L	K	A	A	L	C	Y	T	L-Sel.	
I	Y	I	K	S	P	S	A	P	G	K	W	N	D	E	H	C	L	K	-	-	K	K	H	A	L	C	Y	T	P-Sel.	

Figure 31 : Alignement de BgSel avec le domaine lectine des sélectines humaines.

Motif type-C  $\omega$   $\phi$   $\theta$  C  $\theta$   $\theta$  O E  $\omega$   
BgSEL 1 FLSKENS SNITEAAAVCNRYDGYLVEITSAEQYHVIRDFL

Motif type-C  $\phi$   $\theta$  G  $\theta$  O O  $\phi$   $\omega$  G  $\omega$   $\omega$  W ZP  
BgSEL 41 LLNSTNALGIFLGARKYGNTWRYSHSFRNVSYFNWDYGE  
 Site Calcium 1 1 2

Motif type-C BB EOC  $\theta$   $\omega$  G WND C  $\omega$  C  
BgSEL 81 NPLTNYDCMYLQYRSNLKMFSPCTSSFYQFYALCE  
 Site Calcium 21 21 22

Figure 32 : CRD de BgSel et Consensus des lectines de type C.

Le motif "lectine de type C" est indiqué au-dessus de l'alignement. Les résidus strictement conservés sont indiqués en rouge (X).

$\omega$  : résidus aromatiques ou aliphatiques. -  $\phi$  : résidus aromatiques. -  $\theta$  : résidus aliphatiques. - O : groupe carbonyle sur chaîne latérale. - Z = E ou Q. - B = D ou N.

### 3- Comparaison avec les lectines de type C

La comparaison de trente CRD de type C (mammifères et oiseaux) établit la parfaite conservation de 14 résidus ainsi que la conservation du caractère de 18 autres résidus (cf. Généralités III-A-1) (Drickamer, 1988). La structure tridimensionnelle du CRD de la "mannose-binding protein" de rat (MBP) démontre l'intervention des résidus conservés dans la conformation du domaine lectine (Weis *et al*, 1991). Ils agissent dans la formation des ponts disulfures, dans la liaison aux ions calcium via les résidus Asp, Asn, Glu et Gln, la formation de coudes par les résidus Pro et Gly, et l'établissement d'une poche hydrophobe grâce aux chaînes latérales aliphatiques et aromatiques. Le CRD des sélectines présente l'ensemble de ces résidus conservés.

L'analyse de la séquence de BgSel démontre la conservation de 8 des 14 aminoacides identiques (plus 1 non identique mais de caractère conservé) et de 17 des 18 résidus de caractère conservé. Ces résultats indiquent que du point de vue de la structure primaire, BgSel semblerait appartenir aux lectines de type C, tout comme les sélectines (**Figure 32**).

Les lectines de type C ont pu être classées en différents groupes selon le degré d'homologie entre leur(s) CRD respectif(s), ou selon la position relative du CRD dans l'architecture de la protéine (Drickamer, 1993). Rappelons que ces deux modes de distinction conduisent à la même classification de ces protéines, qui distingue actuellement sept catégories (cf Généralités III-A-1). BgSel présentant le motif caractéristique des lectines de type C, il paraissait intéressant de comparer le CRD de BgSel avec les CRD des sept catégories. Nous avons choisi un représentant de chaque catégorie et réalisé un alignement de l'ensemble des CRD selon la méthode CLUSTAL. L'alignement ainsi obtenu a ensuite été modifié selon le motif défini par Weis *et al* (1991) et Drickamer (1993) (**Figure 33**).

Aggrec. (I)	Asialo. (II)	PanSt. (VII)	MBL (III)	ManRc. (VI)	E-Sel. (IV)	<b>BgSel</b>	Protéine (groupe)
29.0	20.6	25.2	25.2	36.6	27.5	<b>13.7</b>	NKG2 (V)
	39.7	35.1	28.2	33.6	28.2	<b>16.0</b>	Aggrec. (I)
		29.8	26.7	26.0	29.0	<b>16.0</b>	Asialo. (II)
			20.6	36.6	26.7	<b>22.9</b>	PanSt. (VII)
				22.9	33.6	<b>23.7</b>	MBL (III)
					29.0	<b>23.7</b>	ManRc. (VI)
						<b>27.5</b>	E-Sel. (IV)

**Figure 34 : Taux de similarité entre les différents CRD des sept groupes de lectines de type C et BgSel (%).**

NKG2 : protéine membranaire de cellules « Natural Killer » humaine (Houchins *et al*, 1991) (groupe V); Aggrec. : aggrecane humaine (Doerge *et al*, 1991) (groupe I); Asialo. : récepteur pour les asialoglycoprotéines, humain (Spiess *et al*, 1985) (groupe II); PanSt : Pancreatic Stone Protein ou lithostatine, humaine (DeCaro *et al*, 1987) (groupe VII); MBL : mannose binding lectin, murine (Sastry *et al*, 1991) (groupe III); ManRc : CRD-8 du récepteur au mannose de macrophage, humain (Taylor *et al*, 1990) (groupe VI); E-sel. : E-sélectine (Bevilacqua *et al*, 1989) (groupe IV).

Pour le Mannose Receptor qui comporte huit CRD distincts, nous avons choisi un seul CRD, le plus homologue au CRD de BgSel.

```

1  YYIGKERRTWEESLLAC TSK-NSSL LSI DNEE EMKFL-SI NKG2-CRD
1  YWFSRSGKAWADADNYCR-LEDAHLVVVTSWEEEQKFV---Asialo.-CRD
1  YRHFPDRETWVDAERRCR-EQQSHLSSIVTPEEQEFV---Aggrec.-CRD
1  YYFNE DRETWVDA DLYC QNMNSGNLVS VLTQAEGAFVASL PanSt.-CRD
1  YIESSYTRN WGQA SLECLRM-GSSLVLSIESAAESSFL-SY ManRc-CRD8
1  FVTNHEKMPFSKVKSLCTELQ-GTVAIPRNAEENKAIQEV MBL-CRD
1  YNTSTEAMTYDEASAYCQQRY-THLVAIQNKEEIEEYLNLSI E-Sel.-CRD
1  FLSKENSSNITEAAAVC-NRYDGYLVEITSAEQYHVIRDF BgSel-CRD.PRO

39  -ISP-----SSWIGVFR-NSSSHHPVVTMNGL-A---FKH NKG2-CRD
37  --QH HIGPVNTWMGLHDQ--NGPWKQVDGT-DYETG-FKN Asialo.-CRD
37  --N NNAQDYQ-WIGLNDRTIEGDFR WSDGH--PMQ--FEN Aggrec.-CRD
41  IKESGTDDDFNVWIGLHDPKKNRRWHWSGS--LVS--YKS PanSt.-CRD
39  RVEPLKSKTNFWIGLFRNVEGTWLVINNS--PVS--FVN ManRc-CRD8
40  AT-GIA-----FLGITDEATEGQFM YVTGGR--LT--YSN MBL-CRD
40  LSYSPS---YYWIGIRKVV--NVVWVWV-GTQKPLTEEAKN E-Sel.-CRD
40  LLLNSTNALGIFLGARKYG--NTWRY-SHSFRNVS--YFN BgSel-CRD.PRO

67  EIKDS-DN-----AELNC AVLQVNR-----LKSAQC G NKG2-CRD
71  WRPEQPDDDWYGHGLGGGEDCAHF--T--DD-GRWDDV C Q Asialo.-CRD
70  WRPNQPDNFFA---AGEDCVVM--IWHEK-GEWNDV P C N Aggrec.-CRD
77  WGI GAPSS---VNPGY--CVSL-TSSTGFQ-KWKDV P C E PanSt.-CRD
74  WNTGDPSPG-----ERNDCVALHASS--GFWSNIHC S ManRc-CRD8
70  WKKDEPNNH-----GSGEDCVIIL-----DNLWNDI S C Q MBL-CRD
74  WAPGEPNNR-----QKDEDCVEIYIKREKDVGMWNDER C S E-Sel.-CRD
75  WDYGEPNPL-----TNY-DCM--YLYRSNLKMF S -F P C T BgSel-CRD.PRO

93  SSI I---YHCK NKG2-CRD
106 -R P Y R--WVCE Asialo.-CRD
103 YHLP---FTCK Aggrec.-CRD
109 DKFS---FVCK PanSt.-CRD
103 SYKG---YICK ManRc-CRD8
100 ASFK---AVCE MBL-CRD
109 KKKL---ALCY E-Sel.-CRD
106 SSFYQFYALCE BgSel-CRD.PRO

```

Figure 33 : Aligement de BgSel avec les sept groupes de lectines de type C.

On observe aisément la conservation des éléments caractéristiques du type C, au travers des différentes séquences de mammifères et de BgSel. Le tableau de la **figure 34** présente le pourcentage de similarité obtenue entre chaque CRD selon l'alignement de la figure 20. On remarquera que sur l'ensemble des groupes de type C, BgSel présente la plus haute similarité avec le CRD du groupe IV (sélectine), 27.5%, suivie de près par les groupes VI (Mannose Récepteur), 23.7%, et III (Mannose Binding Lectin), 23.7%. De tels taux de similarité restent faibles ; toutefois il convient de noter qu'indépendamment de BgSel, la comparaison des CRD des différentes catégories indique des taux de similarité compris entre 20.6% et 39.7%. Or il faut préciser que les CRD choisis ici sont tous d'origine humaine exceptée la MBL d'origine murine. De ce fait, la similarité de BgSel, provenant d'un gastéropode, avec les CRD de type C, devient nettement plus remarquable et peut être considérée comme significative. A l'opposé, la différence observée entre les taux de similarité n'est pas suffisamment importante pour conclure à une homologie de BgSel plus particulièrement avec les sélectines, plutôt qu'avec la MBL ou le récepteur au mannose pour ne citer que ces deux exemples.

D'après les travaux de Graves *et al.* (1994) sur la structure tri-dimensionnelle de la E-sélectine et la comparaison avec la structure de la MBP (Weis *et al.*, 1991), il semblerait que les sélectines soient les seules lectines de type-C à ne lier qu'un seul ion calcium, au lieu de deux. Cet ion calcium serait en coordination avec les chaînes latérales des résidus Glu80, Asn82, Glu88, Asn105 et Asp106 ainsi qu'avec la chaîne principale carbonyle de l'Asp106 et deux molécules d'eau (site Calcium 2 sur la **figure 35**). Ce site Calcium 2 est intact chez les sélectines ; par contre chez BgSel, on ne trouve que deux des résidus concernés (Glu82 et Asn84 de la figure 22). Cependant on peut envisager l'intervention du résidu Asp90 (Asp89 des sélectines) dans la liaison au Calcium 2 ; de même qu'il est possible que des atomes d'oxygène de chaînes carbonées principales ou de molécules d'eau servent de ligands pour le calcium, en remplacement des amino-acides manquants.

Comparativement aux autres lectines de type C, il manque chez les sélectines un ou deux résidus (selon le type de sélectine et son espèce d'origine) présentant une chaîne carbonyle latérale nécessaire pour former le site de liaison pour un second ion calcium (des positions 55 et 59, site Calcium 1 sur la figure 33) ; les autres résidus impliqués dans la liaison au calcium sont toutefois présents (Asn83 et Asp89). Chez BgSel, on peut constater également l'absence des résidus impliqués dans le site de liaison Calcium 1, à l'exception du résidu Asp90.

Il convient de rester prudent quant aux conclusions sur la nécessité ou non des ions calciums, toutefois certains résultats sembleraient indiquer que la fonction lectine de BgSel serait indépendante des ions calcium (cf. VI-1).

Les travaux de mutagenèse dirigée menés par Erbe *et al* (1992 ; 1993) sur les sélectines E et P ont conduit à la mise en évidence d'acides aminés impliqués dans la liaison au ligand saccharidique (sur la base des structures sLe<sup>x</sup> et sLe<sup>x</sup> sulfaté). Les auteurs soulignent en particulier l'importance des résidus Tyr48, Tyr94, Lys111 et Lys113, résidus conservés chez les sélectines (**Figure 36**). Il faut noter que les résidus Tyr48, Tyr94 et Lys113 semblent intervenir dans la liaison à l'acide sialique lié en  $\alpha$ 2-3 sur le sLe<sup>x</sup>. La Lys113 est également impliquée dans la liaison de la P-sélectine aux sulfatides (Bajorath *et al*, 1994). De plus la Lys111 est nécessaire à la liaison de la P-sélectine à la forme liée en  $\alpha$ 2-6 de l'acide sialique sur le sLe<sup>x</sup> (Erbe *et al*, 1993). La Lys111 pourrait aussi intervenir dans la reconnaissance de la forme sulfatée du sLe<sup>x</sup> par la L-sélectine (Rosen et Bertozzi, 1994).

On remarquera que des quatre résidus décrits ci-dessus, seule la Tyr94 est retrouvée chez BgSel.

En plus des travaux de mutagenèse sur les sélectines, la structure de la région lectine/EGF de la E-sélectine humaine a été déterminée avec une résolution de 2,0 Å (Graves *et al*, 1994). De ces études, il ressort que quatre résidus sont indispensables à la liaison au ligand spécifique, leur altération empêchant l'adhérence de la E-sélectine aux cellules neutrophiles : il s'agit des résidus Asn82, Tyr94, Arg97 et Lys113. Des travaux plus récents de mutagenèse dirigée de la P-sélectine ont toutefois exclu l'intervention de la Lys113 dans la liaison au sLe<sup>x</sup> ou aux sulfatides (Revelle *et al*, 1996).

Chez BgSel, les résidus Asn82, Tyr94 et Arg97 sont conservés. La conservation de résidus dont l'importance est capitale pour la fonction des sélectines, est un argument en faveur d'une homologie fonctionnelle entre BgSel et sélectines. Toutefois au vu de ces observations, il est raisonnable de penser que si une telle homologie existe, elle ne porte cependant pas sur une affinité pour des structures sialylés et /ou sulfatés.

D'après les travaux menés chez les mollusques, la présence de sucres sulfatés est attestée (Ferreira *et al*, 1993). Par contre, il y a peu d'information concernant l'existence d'acide sialique chez ces animaux. Une étude récente sur la nature des glycoconjugués de la

glande albumen du bivalve *Mytilus galloprovincialis* indique une absence totale d'acide sialique parmi les nombreux sucres identifiés (Robledo *et al*, 1997).

De plus, dans le contexte de l'interaction hôte-parasite, il est intéressant de rappeler que l'acide sialique et les sucres sulfatés semblent absents chez les schistosomes (Nyame *et al*, 1987 ; 1988).

BgSEL 1 SYFLSKENSSNITEAAAVC--NRY-DGYLVEITSAEQYHVIRDFLLLS  
E-SEL 1 SYNTSTE-AMTYDEASAYCQQ-RYTH--LVAIQNKEEIEYLNLSILS-YS  
L-SEL 1 TYHYS-EKPMNWQRARRFCRDN-YTD--LVAIQNKAEIEYLEKTLPF-S  
P-SEL 1 TYHYS-TKAYSWNISRKYCQ-NRYTD--LVAIQNKNEIDYLNKVLPPYS

BgSEL 48 TNALGIFLGARKYGNTWRYSHSFRNVSFYF--NW-DYGE**PN**PLTN-YDCM-  
E-SEL 46 PSY--YWIGIRKVN**N**VWVWVGTQKPLTEEAKNWAP-GE**PNNRQKDEDCVE**  
L-SEL 46 RSY--YWIGIRKIGGIWTTWVGTNKS**L**TEEAENWGD-GE**PNNKKNKEDCVE**  
P-SEL 47 -SY--YWIGIRK**N**KTWTWVGT**K**KALTNEAENWADN-**EPNNKRNNEDCVE**  
Site Calcium 1 1 2 21 21

BgSEL 93 -YLQYRSNLKMFS-FPCTSSFYQFYALCE  
E-SEL 93 IYIKREKDVGMW**N**DERCSK---K**L**LALCY  
L-SEL 93 IYIKRNKDAGKW**N**DACHK---L**K**AALCY  
P-SEL 93 IYIKSPSAPGKW**N**DEHCLK---K**K**HALCY  
Site Calcium 22

Figure 35 : Site Ca<sup>2+</sup> potentiels dans les CRD de BgSel et des sélectines humaines.

Les résidus impliqués dans la liaison aux ions calcium chez les lectines de type C sont indiqués en couleur ; les chiffres correspondent aux ions Ca<sup>2+</sup> 1 et 2.

BgSEL 1 SYFLSKENSSNITEAAAVC--NRY-DGYLVEITSAEQYHVIRDFLLLS  
E-SEL 1 SYNTSTE-AMTYDEASAYCQQ-RYTH--LVAIQNKEEIEYLNLSILS-YS  
L-SEL 1 TYHYS-EKPMNWQRARRFCRDN-YTD--LVAIQNKAEIEYLEKTLPF-S  
P-SEL 1 TYHYS-TKAYSWNISRKYCQ-NRYTD--LVAIQNKNEIDYLNKVLPPYS

BgSEL 48 TNALGIFLGARKYGNTWRYSHSFRNVSFYF--NW-DYGE**P**N**N**PLTN-YDCM-  
E-SEL 46 PS**Y**--YWIGIRKVN**N**VWVWVGTQKPLTEEAKNWAP-GE**P****N****N**RQK**D**EDC**V**E  
L-SEL 46 RS**Y**--YWIGIRKIGGIWTTWVGTNKS**L**TEEAENWGD-GE**P****N****N**KKN**K**EDC**V**E  
P-SEL 47 -S**Y**--YWIGIRK**N**KTWTWVGT**K**KALTNEAENWADN-**E****P****N****N**K**R****N****N**EDC**V**E

BgSEL 93 -**Y**L**Q****Y****R**S**N**L**K**M**F**S-FPCTSSFYQFYALCE  
E-SEL 93 I**Y****I****K****R**E**K**D**V**G**M**W**N**D**E**R**C**S**K**---K**L**LALCY  
L-SEL 93 I**Y****I****K****R****N**K**D**A**G**K**W****N**D**D**A**C**H**K**---L**K**AALCY  
P-SEL 93 I**Y****I****K****S****P****S**A**P**G**K**W**N**D**E**H**C**L**K**---K**K**HALCY

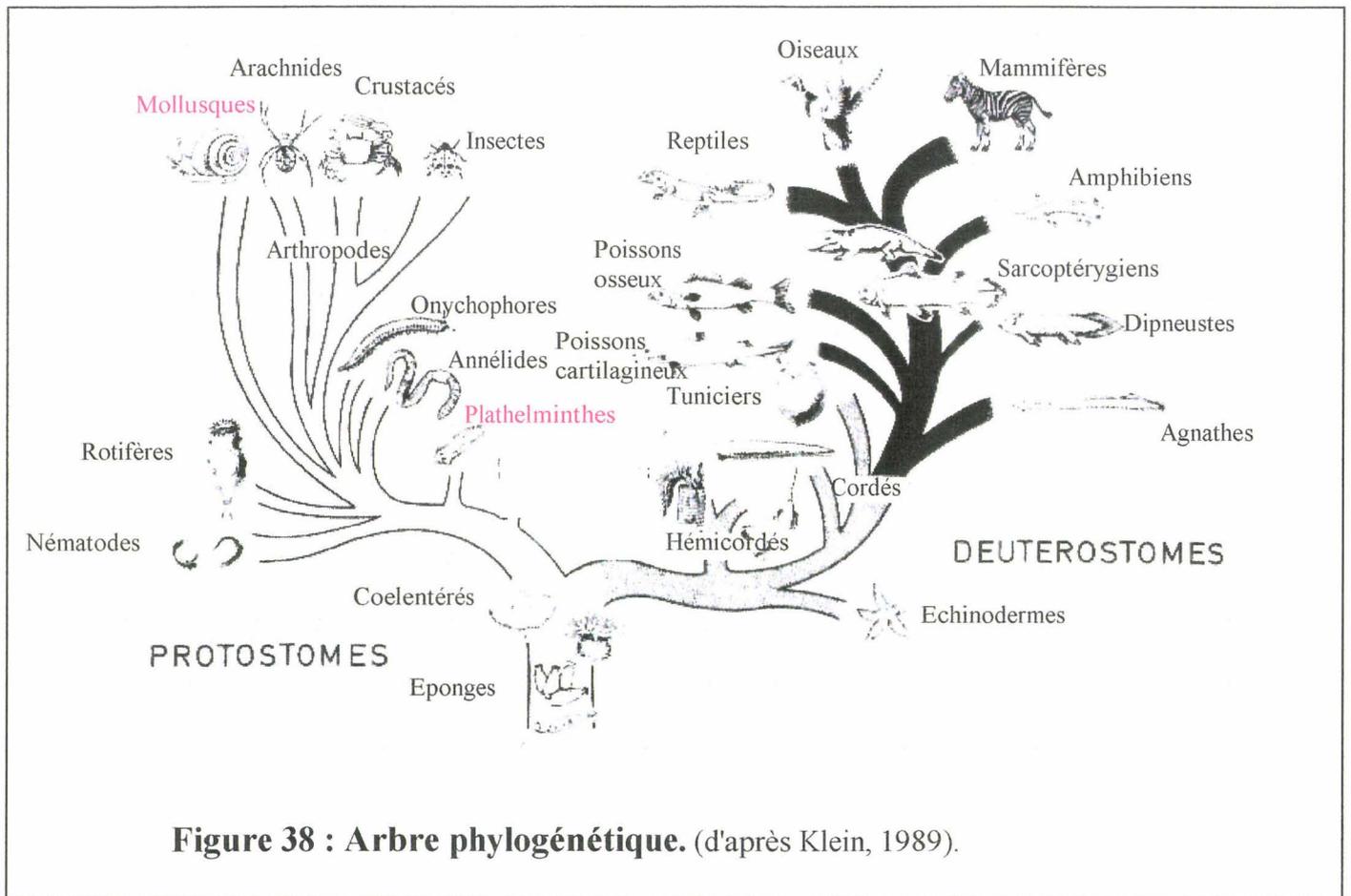
Figure 36 : Résidus nécessaires à la liaison des ligands aux sélectines humaines.

Ces résidus majeurs sont indiqués en rouge.

#### 4- Comparaison avec des lectines d'invertébrés.

Nous avons démontré précédemment que BgSel est homologue au domaine lectine des sélectines, et de façon plus générale, que BgSel présente une séquence du type CRD de type C. Ces résultats soulèvent la question de la parenté de BgSel avec d'autres lectines d'invertébrés. Nous avons comparé la séquence de BgSel avec des lectines d'invertébrés connues, puis nous avons réalisé l'alignement de dix séquences (**Figure 37**). Les dix séquences, choisies parmi le faible nombre à notre disposition, couvrent l'arbre phylogénétique depuis les cnidaires, vers les protostomes (avec un plathelminthe turbellarié, un mollusque gastéropode, les arthropodes chélicérates, crustacés et insectes) et vers les deutérostomes (un échinoderme et un tunicier) (**Figure 38**).

On retrouve les résidus cystéine impliqués dans les ponts disulfures observés chez les lectines animales de type C. Toutefois, on peut préciser qu'il existe deux lectines, non représentées dans la figure 24, qui se démarquent par l'absence d'un résidu cystéine ; il s'agit de l'incilarine C d'*Incilaria fruhstorferi* (Yuasa *et al*, 1998) et d'une lectine de l'holothurie *Cucumaria echinata* (Hatakeyama *et al*, 1994). Sont également présents les résidus aromatiques et aliphatiques responsables de la structure secondaire agencée en coeur hydrophobe. La proline responsable d'un coude caractéristique dans la structure décrite par Weis *et al* (1991) est parfaitement conservée. Toutefois, les résidus glycine du motif caractéristique, favorisant la formation de coude, ne sont pas tous unanimement conservés à l'exception du résidu de la séquence  $\phi\theta G\theta$  (aromatique-aliphatique-glycocolle-aliphatique). Ce résidu glycine au sein de cette poche hydrophobe semble conservé du fait de son faible encombrement stérique, qui exclut la présence de tout autre amino-acide à cette position (Weis *et al*, 1991). Quant aux résidus désignés comme ligands des ion calcium, on observe quelques disparités par rapport aux séquences de lectines de type C de mammifères. *B.glabrata* et *T.tridentatus* sont dépourvus des résidus impliqués dans le site de liaison au calcium 2 ; *B.glabrata*, *M.rosa*, *D.melanogaster* et *S.peregrina* ne possèdent pas tous les résidus concernés par la liaison au calcium 1.



Hv	Gt	<b>Bg</b>	Tt	Mr	Dm	Sp	Pa	Ac	Pm	
	38.6	<b>29.4</b>	28.3	35.9	26.8	36.6	34.0	32.0	29.4	Hv
		<b>34.6</b>	25.7	35.9	31.4	32.7	34.0	28.8	37.9	Gt
			<b>23.7</b>	<b>28.1</b>	<b>28.1</b>	<b>27.5</b>	<b>22.9</b>	<b>25.5</b>	<b>26.8</b>	<b>Bg</b>
				27.6	23.0	19.7	19.7	19.1	21.7	Tt
					31.4	34.6	22.9	20.9	28.8	Mr
						33.3	30.7	26.8	26.1	Dm
							28.8	24.8	29.4	Sp
								40.5	29.4	Pa
									24.2	Ac
										Pm

**Figure 39 : Taux de similarité des CRD des différentes lectines d'invertébrés (%).**

$\omega$   $\phi$   $\theta$  C  $\theta$   $\theta$  O E  $\omega\theta$   
 Hv. 54 QNKTLKAKSWRDA**SLSCQAFD**-----G**HLLSIEDQAE**NF**FI**---L-NILKDSRIEKDNY-  
 Gt. 22 YHLNKNKMNYND**AVKYCNSKEIR**-----**LVKITDSQTNA**AV---FELASKN---GMGTY-  
 Bg. 209 FLSKENSSN**ITEAAAVCNRYDGY**-----**LVEITSA-EQYHVI**---RDFLLLNSTNALGI-  
 Tt. 448 VYVTSKQRAWERAQGV**CTNMAARL**-AVLDKD--**LIPSSLT-E**-----TLRGKGLT**TT**-  
 Mr. 62 FHVPLEKASW**MVAHGVCARLDSR**-----AR-**LASIDAADQ-**AVV****-----EPLSEKM-----  
 Dm. 51 YFFG**TESLNWYEAYEKCRELN**-----SE-**LVTFETDQ**EFDAV****-----TVSNGSRLT-Y-  
 Sp. 37 LIETELKYN**WHQAWHECARHD**-----**QQLVTIESADKNNAI**--IDLVKRVVGKSH-NL--  
 Pa. 132 YKFHKTPKT**WDEARIICQ**-----**QEGGHLVIINSEDESKVLQNL**F**SKVTKTEGAT**NNDYI  
 Ac. 15 YRFFAVSLT**WAEGEQFCQSFVSPSRGDTDSIGHLVSIHSETEQNFVYHYFET**STK--DDTTP**EM**-  
 Pm. 5 ILFSD**ETMNYADAGTYCQSRGMA**-----**LVSSARMDSTMVKAILAFTE**--VKG---HDY-

$\phi\theta G\theta$  O O  $\phi$   $\omega$  G  $\omega$   $\omega$  W ZPBB EOC  $\theta$   $\omega$  G  
 Hv. 87 WIGL--NDASNNRE---FRWSDDKTPQ---FFNWLPK**KPNNVESEENCVEA**-----NSMG--  
 Gt. 70 W**MnG**---NDIAIE---GT-W-VDTENKPLV---YKNWYK**GE**PNNWGG**NQ**NC**LVA**-AYHPNEM---  
 Bg. 259 FLGA-----RKY**GN**TRYS**HSF-RNV**---S-YFNW**DYGE**P-NPLTNY**DCMYL-QYRS**NLKM---  
 Tt. 496 WIGLHRLD--AEKP---FVWELMDRSNVVLNDNL**TFWASGEPGN**---E**TNCVYL-DIRD**QLQPV-  
 Mr. 107 WIGL-SYDSAN**DAAV**---W-ADDSH-----SS-HN**WYATQPDD**--E**SELCVLI**---KED-QYRQ  
 Dm. 97 Wts**G**---NDLAK-T--G**shRW**-FTN-GQR-I---SS-LR**W**ARN**QPDNAGQKEHC**IH**LG**YIY**KD**SRKFE  
 Sp. 87 WLGG--NDEYSSRDYGR**PF**FW**SPTGQ**--A--FS-FAY**WSEN**NP**DNYKHQEHCV**HIWD**TKPLYQ**---  
 Pa. 187 FIGI--HDRFVE---GE-F-ITIFG**KPLATTG**--FTR**W**dsI**QPDNAGGNENC**---GSMHP**NGG**---  
 Ac. 77 WLGF--NDRTTE---GN-FQ**WTD-GSPND**-----FT**AWVGS**NP**DNYGSGEDC**---TQ**MVMGAGLN**-  
 Pm. 54 W**VGA**--DNLQ-D---GA-YN**FLW**ND**GVSLPTDS**--DL**W**SP**NEPS**NP**QSWQLCVQI**-WSKY**NL**----

WND C  $\omega$  C  
 Hv. 134 WNDNKCGATNG----FICK 148  
 Gt. 121 WFD-GC**N**TLNS----VICE 134  
 Bg. 311 FS-FP**C**TSSFYQ-FYAL**C**E 325  
 Tt. 551 WKT**K**SC**F**Q**P**SS----FAC**M** 565  
 Mr. 155 WHD**Y**NCNDRYN----FV**C**E 170  
 Dm. 152 LND**R**PC**S**Q**D**PNSLFKY**I**C**E** 171  
 Sp. 144 WND**N**DC**N**V**K**MG----Y**I**C**E** 158  
 Pa. 238 LND**I**PC**P**W**K**LP----FV**C**E 253  
 Ac. 127 WID**L**PC**S**STRHY---L**I**C**K** 142  
 Pm. 105 LDD**V**GC**G**GARR----V**I**C**E** 120

**Figure 37. Alignement des CRDs de différentes lectines d'invertébrés, selon le motif caractéristique des lectines de type C.**

Hv : *Hydra vulgaris* (Coelentéré Cnidaire).- Gt : *Girardia tigrina* (Plathelminthe Turbellarié).  
 Bg : *Biomphalaria glabrata* (Mollusque Gastéropode).- Tt : *Tachypleus tridentatus* (Arthropode Chélicérate).  
 Mr : *Megabalanus rosa* (Arth. Crustacé).- Dm : *Drosophila melanogaster* (Arth. Insecte).  
 Sp : *Sarcophaga peregrina* (Insecte).- Pa : *Periplaneta americana* (Insecte).  
 Ac : *Anthocidaris crassispina* (Echinoderme).- Pm : *Polyandrocarpa misakiensis* (Tunicier).

Le motif "lectine de type C" est indiqué au-dessus de l'alignement. Les résidus strictement conservés sont indiqués en rouge (X).

$\omega$  : résidus aromatiques ou aliphatiques. -  $\phi$  : résidus aromatiques. -  $\theta$  : résidus aliphatiques. - O : groupe carbonyle sur chaîne latérale. - Z = E ou Q. - B = D ou N.

Remarques : Pour des raisons de commodités, la taille de certains caractères a été volontairement réduite, afin de permettre une meilleure lisibilité de l'alignement. Les résidus qui paraissent conservés, tout moins dans leur caractère, dans une majorité de séquences chez ces invertébrés, sont indiqués en bleu (X).

Il apparait que les CRD de ces différentes lectines sont construits selon le modèle établi par Weis *et al* (1991) et Drickamer (1993), qui répertorie un certain nombre de résidus conservés ou tout au moins de résidus à caractère conservé. Ce modèle est en grande partie conservé chez les différents organismes cités, avec quelques différences selon les molécules considérées. Rappelons que le motif caractéristique des lectines de type C a été élaboré à partir de séquences de mammifères ; on constate au travers de l'alignement des séquences d'invertébrés qu'il est profondément conservé au cours de l'évolution. Il est antérieur à la séparation entre les protostomes et les deutérostomes. Les taux de similarités entre les CRD de ces différents organismes, présentés sur la **figure 39** , vont de 20 à 40%.

## **V EXPRESSION DE BGSEL DANS DES SYSTEMES HETEROLOGUES**

Nous avons envisagé la production d'une protéine BgSel recombinante, afin de pouvoir aborder l'étude de sa fonction, ainsi que permettre l'obtention d'antisérum. Suite à l'examen de la séquence protéique de BgSel par rapport aux domaines lectines des sélectines et de protéines d'invertébrés, nous avons choisi d'exprimer uniquement le domaine lectine putatif de BgSel en système d'expression procaryote.

### **1- Expression de la protéine recombinante chez *E.coli* via le système d'expression "QIAexpress" (R1BgSel)**

Nous avons choisi le vecteur d'expression pQE30 qui permet un taux élevé d'expression chez *E.coli* de protéines recombinantes portant une séquence de six histidine, qui possède une affinité pour les ions Ni<sup>2+</sup>. Celle-ci permet la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité sur une résine portant des ions Ni<sup>2+</sup>.

Nous avons désigné deux oligonucléotides (PAS6 et PAS7) dans la séquence BgSel encadrant le domaine lectine afin d'amplifier le domaine d'intérêt à partir de la séquence BgSel. Deux sites de restriction, respectivement BamHI et Sall, ont été ajoutés au niveau des amorces pour permettre le sous-clonage du produit d'amplification dans le plasmide pQE30.

Avant de procéder à la purification, il apparait nécessaire de déterminer si la protéine est soluble ou insoluble au niveau du cytoplasme, ou sécrétée dans l'espace périplasmique. Sur la

**figure 40**, on observe la protéine recombinante à la taille attendue 17 kDa, localisée dans la fraction insoluble ; R1BgSel exprimée à un taux élevé forme des corps d'inclusion dans le cytoplasme de la bactérie. La protéine recombinante a donc été solubilisée par dénaturation à l'urée 8M, avant d'être purifiée.

Après purification, nous avons tenté de renaturer R1BgSel par dialyse en diluant graduellement l'urée. Toutefois la protéine en solution forme un précipité avec la disparition de l'agent dénaturant. De la même façon, il s'est avéré impossible de renaturer la protéine immobilisée sur la colonne de nickel. L'adjonction de  $\beta$ -mercaptoéthanol (10mM) ou de glycérol (20%) à la solution de dialyse (Tris 10mM pH7,4 ; NaCl 150 mM) n'ont pas permis d'améliorer la solubilité de R1BgSel en milieu aqueux.

Pour pallier à cet inconvénient, nous nous sommes tournés vers un autre système d'expression.

## 2- Expression de BgSel chez *E.coli* via le système d'expression pET32

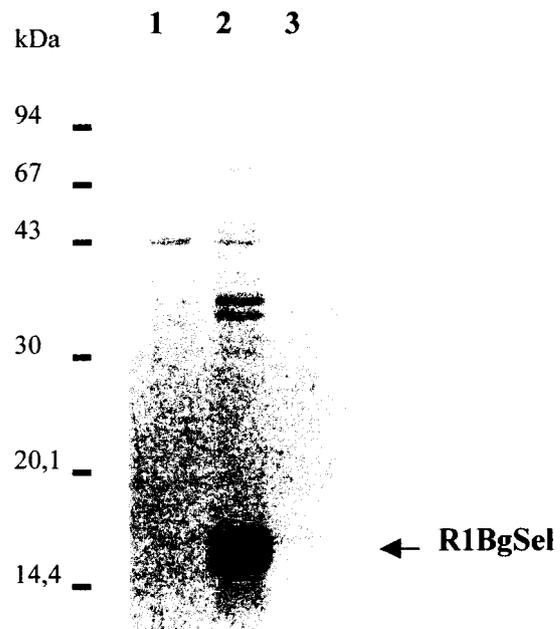
### (R2BgSel-R3BgSel)

Les vecteurs pET permettent l'expression de protéines recombinantes chez *E.coli*. Le vecteur pET32 possède un domaine de fusion à la thioredoxine destiné à accroître la solubilité de la protéine d'intérêt dont le gène est cloné dans ce plasmide.

Nous avons donc déterminé deux oligonucléotides encadrant le domaine lectine putatif de BgSel, auxquels ont été ajoutés les sites de restriction de BamHI (PAS6) et SalI (PAS8). Après amplification à partir de BgSel, le fragment d'ADN a été sous-cloné dans le plasmide pET32a, qui présente un cadre de lecture ouvert en phase avec le domaine issu de BgSel.

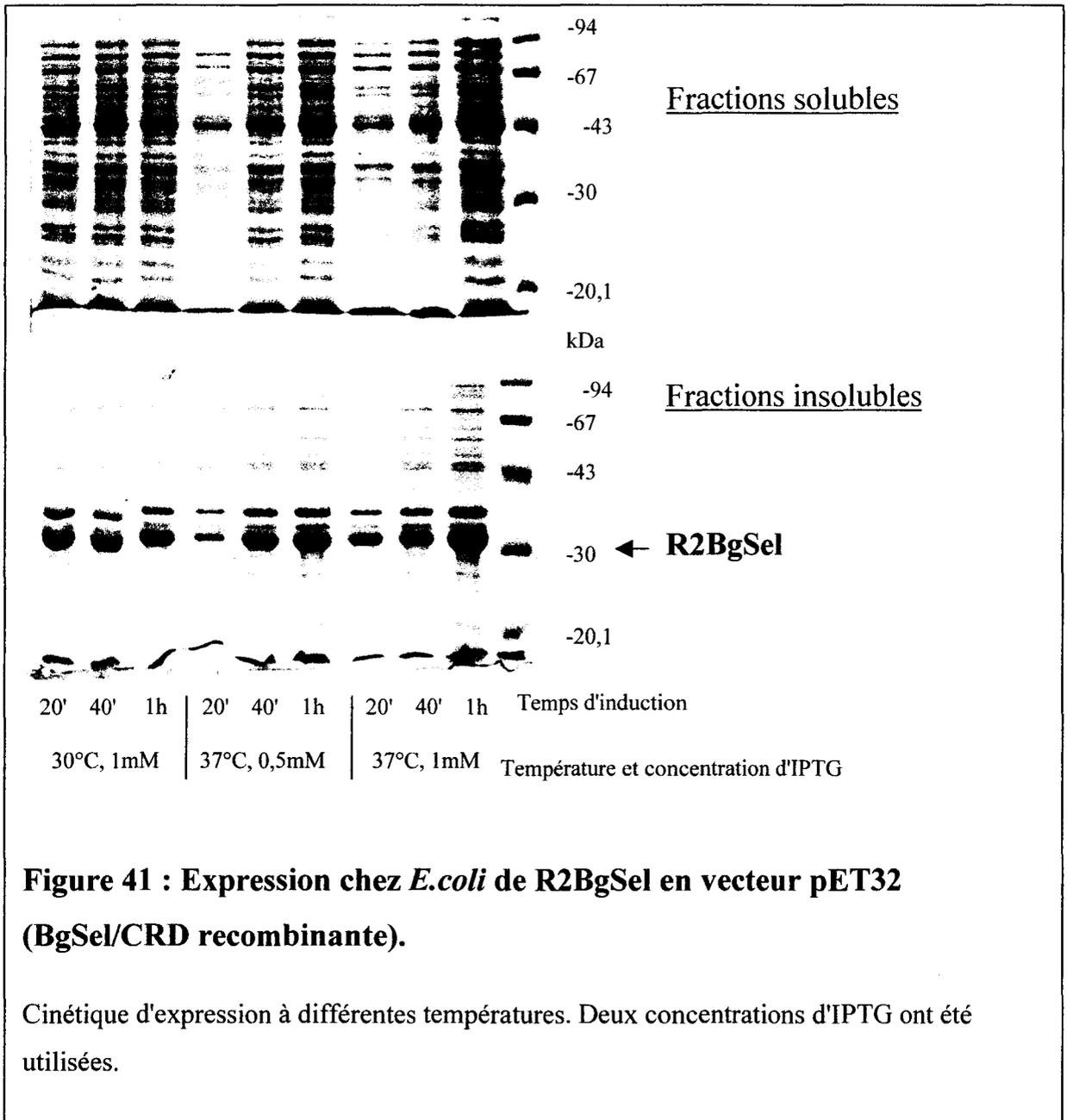
L'examen en SDS-PAGE des composants bactériens solubles et insolubles, a permis de constater la présence de R2BgSel de 32 kda dans la fraction insoluble. Les corps d'inclusion ont été solubilisés en urée. Là encore, les essais de renaturation de la protéine recombinante par dilution graduelle de l'agent dénaturant se sont tous avérés infructueux.

Pour tenter d'obtenir une expression de R2BgSel de façon soluble dans le cytoplasme d'*E.coli*, nous avons procédé à une cinétique d'induction à différentes températures. R2BgSel est exprimé dès les vingt premières minutes dans les corps d'inclusion, que ce soit à température ambiante ou à 37°C (**Figure 41**).



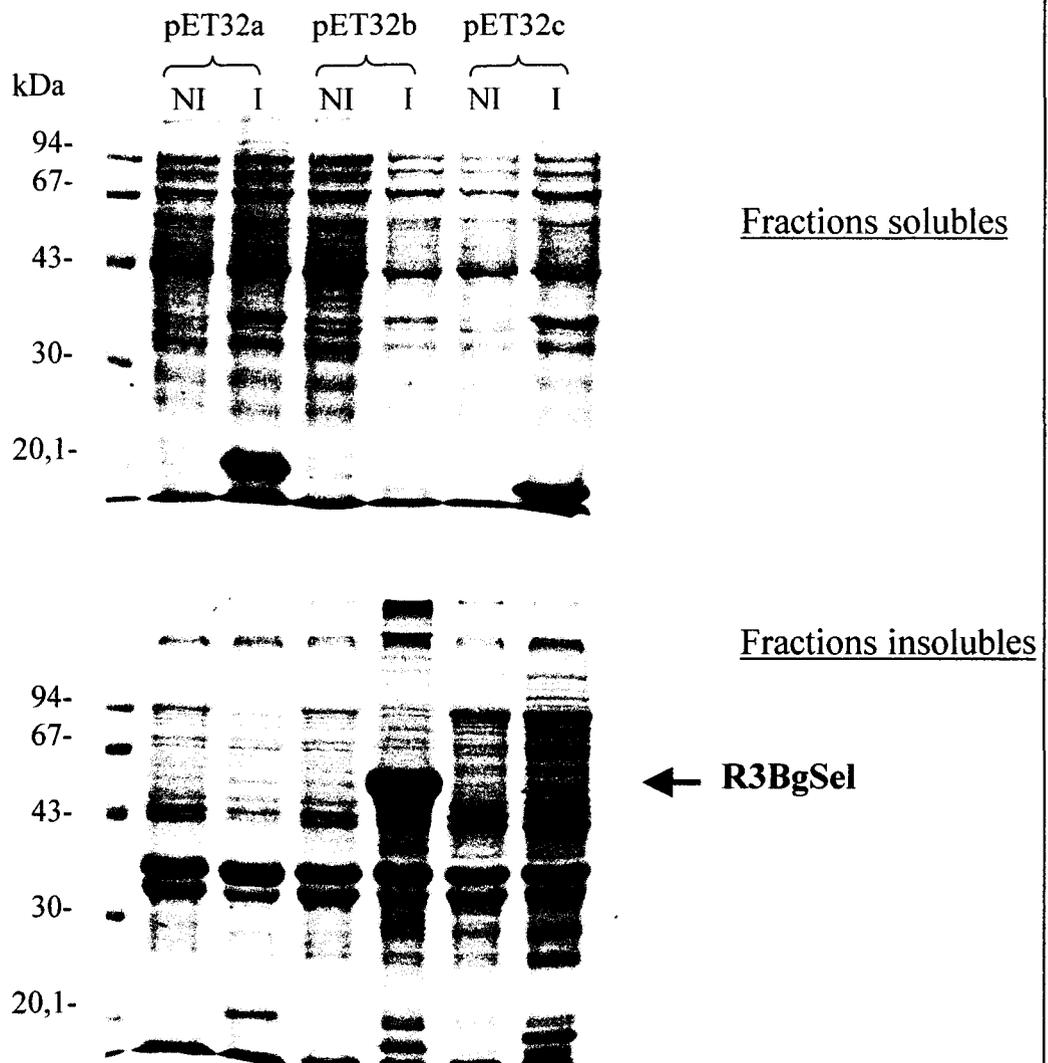
**Figure 40 : Expression de R1BgSel chez *E.coli* en vecteur pQE30 (BgSel/CRD recombinante).**

1 : fraction soluble. 2 : corps d'inclusion. 3 : fraction périsplasmique.



**Figure 41 : Expression chez *E.coli* de R2BgSel en vecteur pET32 (BgSel/CRD recombinante).**

Cinétique d'expression à différentes températures. Deux concentrations d'IPTG ont été utilisées.



**Figure 42 : Expression chez *E.coli* de R3BgSel en vecteur pET32**

**(BgSel recombinante).**

L'expression est analysée dans les trois vecteurs pET32.

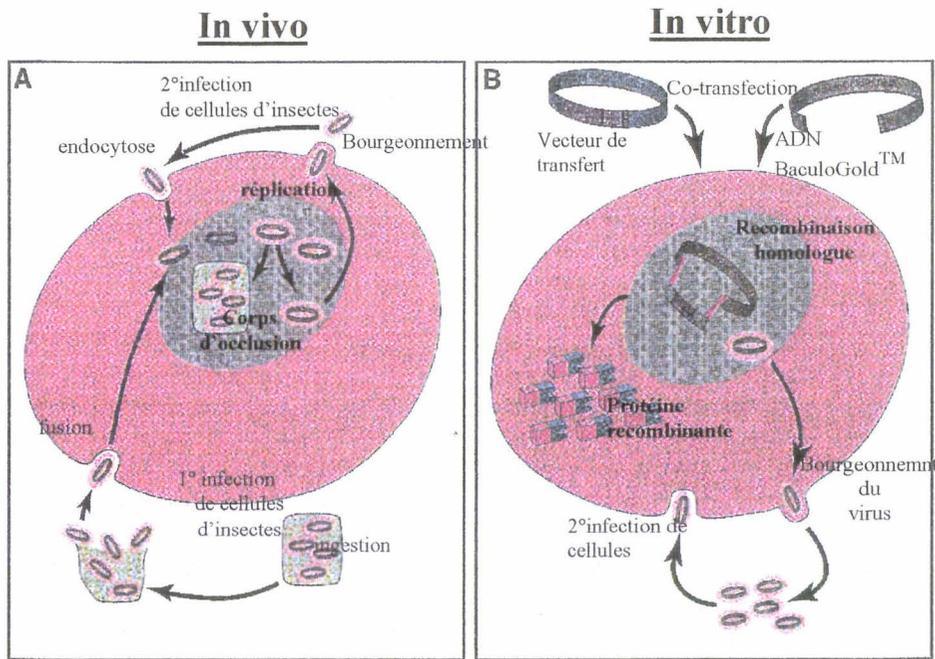
NI : non induit. I : induit par 1mM IPTG.

Il est possible que le domaine lectine de BgSel ne puisse être exprimé seul sous forme soluble, soit en raison de son hydrophobicité, soit par sa toxicité vis-à-vis de la bactérie. Par conséquent, la séquence entière issue du clone BgSel de la banque d'ADNc a été sous-cloné en plasmide pET32. L'insert BgSel a été extrait du plasmide pBluescript par coupure par BamHI et XhoI. Afin de conserver le cadre de lecture ouvert de BgSel, l'insert a été sous-cloné dans les trois plasmides pET32a, b et c, présentant les trois cadres de lecture possible. Après induction de l'expression des vecteurs chez *E.coli*, l'analyse des fractions bactériennes solubles et insolubles a été réalisée par SDS-PAGE (**Figure 42**). On notera sur la piste 4, correspondant au plasmide pET32b, la présence de R3BgSel recombinante à 52 kDa, exprimée dans les corps d'inclusions insolubles de la bactérie.

Devant l'impossibilité d'obtenir chez un procaryote, une expression soluble de BgSel ou de son domaine lectine, c'est ensuite un système d'expression eucaryotique qui a été choisi.

### **3- Expression de BgSel par vecteur d'expression baculovirus en cellules d'insectes (R4BgSel)**

Le système d'expression en vecteur baculovirus est utilisé pour exprimer des gènes hétérologues dans des cellules d'insectes (**Figure 43**). Il s'agit de l'"*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus" (AcNPV), chez qui plusieurs gènes non essentiels au cycle de vie en culture ont été supprimés. Le génome du baculovirus étant en général trop grand pour permettre l'insertion d'un gène hétérologue, celui-ci est donc cloné dans un vecteur navette. La co-transfection du vecteur de transfert et du baculovirus chez les cellules de *Spodoptera frugiperda* permet la recombinaison entre les sites homologues entraînant le transfert du gène étranger du vecteur navette au génome de l'AcNPV. L'infection des cellules d'insectes par l'AcNPV bloque l'expression des gènes de l'hôte, permettant la production d'un taux important d'ARNm et de protéine recombinante.



**Figure 43 : Cycle de vie du baculovirus et expression de protéine recombinante.**

L'expression en cellules d'insectes permet de produire des protéines qui conservent leur activité originelle ; l'équipement enzymatique de la cellule permet la formation des ponts disulfure, un repliement correct, des modifications post-traductionnelles, l'assemblage des protéines recombinantes. Ces facteurs favorisent l'expression d'une protéine structuralement et fonctionnellement semblable à la protéine native.

Les baculovirus sont des virus à ADN double brin circulaire, spécifiques de nombreuses cellules d'insectes. On distingue l'infection virale en trois phases. Les particules d'AcNPV pénètrent dans la cellule par endocytose et migrent vers le noyau où l'ADN est libéré de la nucléocapside, pour ensuite suivre les processus de transcription et traduction de la cellule. La réplication débute dans les 6 premières heures d'infection. Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, le cycle infectieux procède en deux phases. Durant la phase précoce, 6 à 24 h post-infection, les cellules infectées libèrent des virus par "bourgeoisement" depuis la membrane cellulaire ; au cours de la phase tardive, des particules virales sont assemblées au sein du noyau sous forme de corps d'occlusion, où les virus sont emballés dans une matrice homogène constituée essentiellement d'une seule protéine, la polyhedrine. Les corps d'occlusion sont libérés avec

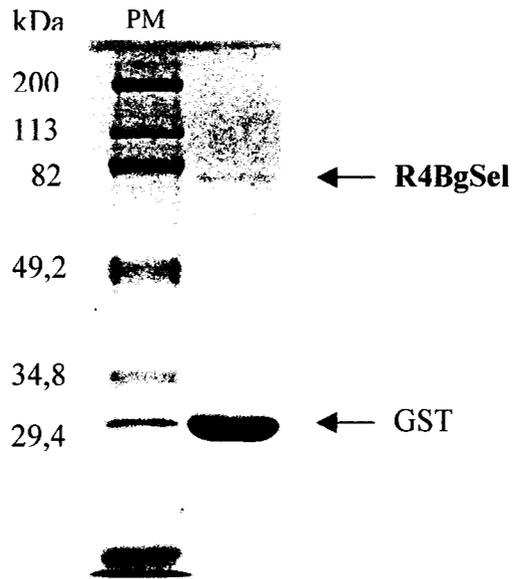
la lyse de la cellule. Dans les souches sauvages d'AcNPV, les corps d'occlusion apparaissent 3j p.i. et s'accumulent dans la cellule jusqu'au 5 ou 6 j p.i. Ils sont visibles en microscopie optique sous forme de polygones dans le noyau de la cellule.

Bien qu'étant une des protéines les plus abondantes de la cellule infectée, la polyhedrine n'est cependant pas essentielle pour le cycle de vie en culture du baculovirus. Dans la technique initiale, le gène étranger est inséré dans un plasmide en aval du promoteur de la polyhedrine, flanqué de séquences de l'ADN du baculovirus. Après co-transfection du vecteur de transfert et de l'ADN du virus sauvage, il peut se produire une recombinaison homologue entre le plasmide et le génome viral. Le remplacement du gène de la polyhedrine par un gène d'intérêt empêche la formation des corps d'occlusion, ce qui permet de distinguer optiquement les virus recombinants des non-recombinants. Cette technique, longtemps utilisée pour le clonage en cellules d'insecte, avait pour inconvénient de produire essentiellement des virus non-recombinants. Elle est remplacée par l'utilisation d'ADN de l'AcNPV linéarisé et contenant une délétion létale (Baculogold™). La co-transfection du virus avec un vecteur complémentaire, qui contient le gène d'intérêt entraîne la restauration de la délétion létale par recombinaison homologue. Ce système ne nécessite plus la sélection des clones positifs basée sur les corps d'occlusion. Seuls les recombinants produiront des virus viables, avec pour conséquence un taux de recombinaison de plus de 99%.

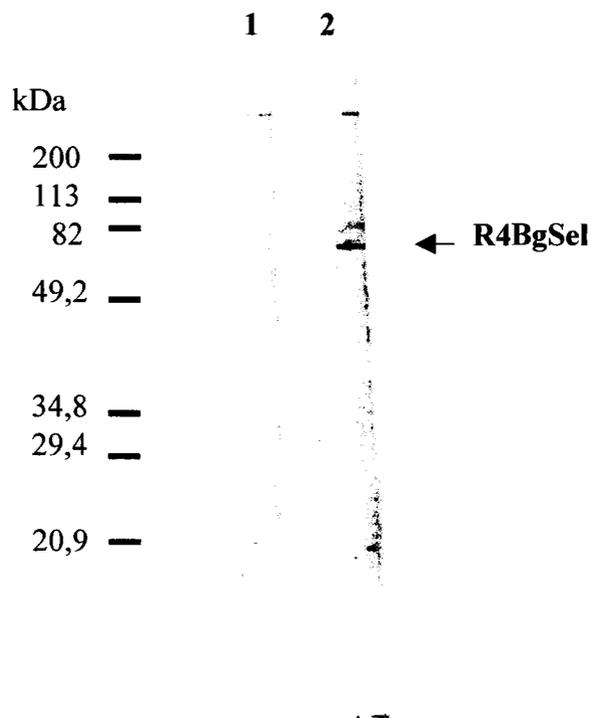
Le vecteur de transfert choisi pour produire BgSel recombinante en cellules d'insecte est un vecteur d'expression en fusion avec la GST (Glutathion S-Transférase de *S.japonicum*), le plasmide pAcSecG2T. Le gène de la GST est précédé par la séquence signal gp67 qui entraîne la sécrétion de la protéine de fusion dans le milieu extracellulaire. Le peptide signal est clivé durant le transport à travers la membrane cellulaire. La protéine-GST est purifiée à partir du surnageant de culture sur billes de glutathion-agarose.

La protéine recombinante R4BgSel a été exprimée en cellules SF9, puis purifiée à partir du surnageant de culture et du lysat cellulaire sur colonne de glutathion-agarose. L'examen du produit purifié sur SDS-PAGE montre la présence de deux molécules (**Figure 44**). Le produit majoritaire de 26.3 kDa correspond à la GST seule, non fusionnée, tandis que la protéine recombinante beaucoup moins abondante apparaît à 79.4 kDa.

Les anticorps anti-BgSel reconnaissent la protéine purifiée de 79 kDa, confirmant qu'il s'agit effectivement de la protéine recombinante R4BgSel (**Figure 45**).



**Figure 44 : Analyse par SDS-PAGE de la protéine recombinante R4BgSel produite par baculovirus.**



**Figure 45 : Détection de R4BgSel par Western blot.**

1 : sérum préimmun. 2 : sérum anti-BgSel

Le poids moléculaire théorique de la protéine de fusion GST et BgSel est de 65.2 kDa (24.8 kDa pour la GST et 40.4 kDa pour BgSel). Les processus de modification post-transcriptionnel peuvent expliquer l'accroissement de poids observé. Cependant la différence entre le poids théorique et le poids effectif reste inférieure à ce que l'on pouvait attendre au vu des résultats obtenus sur la déglycosylation de BgSel native, qui semblait indiquer que 50% du poids de la protéine proviendrait de ces composants oligosaccharidiques (cf III-3).

La glycosylation est un phénomène post-traductionnel particulièrement important car il intervient dans la conformation, la solubilité et la stabilité de la protéine. De plus, cette modification peut également affecter l'activité biologique d'un composé. Des différences en ce qui concerne la taille et la nature des oligosaccharides de glycoprotéines exprimées en cellules d'insecte ont été relevées par rapport à la glycosylation chez des cellules de mammifères ou de plantes (O'Reilly *et al*, 1994). En général les chaînes oligosaccharidiques chez ces cellules d'insecte sont plus courtes. Dans le cas qui nous concerne, nous manquons d'éléments comparatifs au niveau de la glycosylation entre cellules d'insecte et cellules de mollusque. D'autre part, certaines modifications sont spécifiques d'un tissu ou d'une espèce. La fusion à la GST et les modifications post-transcriptionnelles ont permis, contrairement aux expressions en système procaryotique, d'obtenir une protéine soluble en milieu aqueux. Toutefois ces différents facteurs ne garantissent pas l'obtention d'une protéine BgSel recombinante fonctionnellement analogue à la protéine native.

L'obtention d'une protéine de fusion soluble en milieu aqueux, nous a permis d'aborder l'étude de la fonctionnalité de R4BgSel ; en premier lieu, c'est la fonction lectine qui a été recherchée.

## **VI FONCTION DE BGSEL**

### **1- Recherche de la fonction lectine**

La mise en évidence d'une fonction lectine de BgSel passe par la démonstration de son affinité pour une structure saccharidique. La fonctionnalité de BgSel a été testée à l'aide de la protéine recombinante soluble produite en système d'expression baculovirus chez des cellules d'insecte.

Dans ces expériences des polysaccharides ou des monosaccharides ont été fixés de manière covalente dans les puits d'une plaque de microtitration. Après contact entre R4BgSel et les sucres, le surnageant des puits est récupéré et soumis à une électrophorèse suivie d'un Western blot. La présence ou non de la protéine recombinante est vérifiée à l'aide du sérum anti-BgSel. Au préalable, nous avons établi les conditions du Western blot afin de déterminer le seuil de détection de la protéine recombinante : ainsi, les incubations de R4BgSel dans les puits traités par les différents sucres se font avec la quantité minimale de protéine détectable. Dans ces conditions, si R4BgSel se fixe, même en faible proportion, sur l'une des molécules testées, son signal en Western blot ne doit plus être détectable.

Deux polysaccharides ont été utilisés dans les expériences de coculture avec démonstration de l'effet du fucoïdan sur l'interaction cellules-parasites (cf I-3). Le caractère inhibiteur du fucoïdan sur les sélectines en fait une molécule de choix dans l'étude de la fonction de R4BgSel. Dans une première série d'expériences, nous avons testé l'affinité de R4BgSel vis à vis du fucoïdan et du mannane. En l'absence de renseignement sur l'existence de sites de liaison au calcium chez BgSel (cf. IV-3), ces expériences ont été réalisées avec ou sans ions calcium. Sur la **figure 46**, la bande R4BgSel semble absente de la 6<sup>e</sup> piste correspondant au puits "fucoïdan sans calcium", ce qui est en faveur d'une liaison de la protéine recombinante sur ce polysaccharide. Cependant ce résultat reste difficilement "lisible", certainement en raison de la trop faible affinité du sérum anti-BgSel et du bruit de fond apporté par la révélation par chemiluminescence. La fixation de BgSel au fucoïdan est donc à confirmer.

Nous avons renouvelé ces expériences avec une série de monosaccharides (glucose, N-acétylglucosamine, galactose, N-acétylgalactosamine et fucose). Cependant aucune fixation de R4BgSel n'a pu être démontrée dans nos conditions de contact *in vitro* (résultats non présentés).

## **2.-Recherche de la fonction de BgSel dans l'interaction hôte-parasite.**

Une étude de l'expression du messager codant pour BgSel a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative, à partir d'ARN de cellules Bge incubées en présence de surnageants de culture de sporocystes de *S.mansoni*.

Les sporocystes ont été cultivés durant 24h en milieu SSS, puis le surnageant de culture a été récupéré et déposé sur un tapis de cellules Bge mises en culture 24h auparavant (en milieu Bge ou en milieu SSS). Produits E/S de parasites et cellules sont laissés en contact durant 2h au terme desquelles l'ARN total des cellules est extrait.

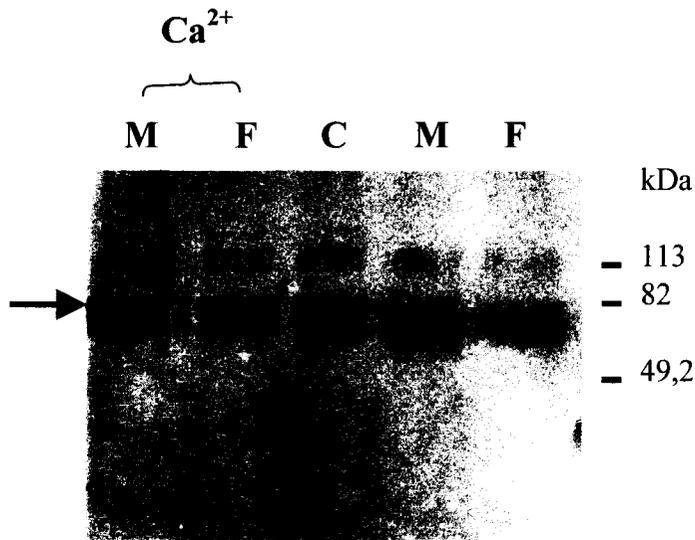
Les RT-PCR ont été réalisées avec les amorces PAS1 et PAS2 à partir de la même quantité d'ARN total pour chaque essai. Les produits d'amplification obtenus furent ensuite soumis à un Dot-Blot sur membrane de nitrocellulose. Les produits de RT-PCR ont été hybridés avec une sonde oligonucléotidique (PAS4).

Dans les expériences de PCR semi-quantitatives, il est courant d'utiliser une autre sonde correspondant à un gène de ménage ("house keeping gene"), gène de référence dont l'expression est constante au niveau de la cellule. Il s'agit généralement d'un gène d'actine non-musculaire (mammifère). Toutefois on ne connaît pas chez *B.glabrata*, de gène dont l'expression soit constante, du fait du peu de gènes clonés et étudiés. Quant au gène de l'actine cytosqueletique de *B.glabrata*, les travaux de Lardans (1997) ont montré que l'expression de l'actine varie selon les tissus et selon le traitement subi par l'individu (stress).

La quantité d'ADNc produite par transcription inverse dans chaque échantillon a été évalué par l'incorporation de  $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ . Ainsi les PCR ont été réalisées sur des quantités équivalentes de matrice.

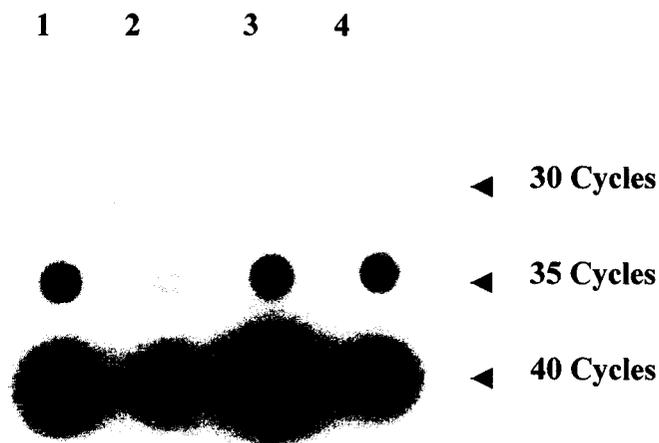
Sur la **figure 47** sont présentés les spots obtenus après l'hybridation de la sonde PAS4 sur les produits de PCR. On peut observer que l'expression du messager codant pour BgSel diminue au niveau de l'ADNc provenant de cellules Bge qui ont été placées dans un milieu conditionné par les sporocystes de *S.mansoni*.

Ce résultat démontre que des produits d'E/S de sporocystes modulent l'expression de BgSel, sans toutefois indiquer si cette diminution participe à une réponse globale de la cellule Bge suite à la présence parasitaire, ou s'il s'agit plutôt d'une réponse spécifique. Dans ce dernier cas, il serait intéressant de déterminer si l'influence parasitaire sur l'expression de BgSel fait suite au rôle éventuel de BgSel envers le parasite. Certaines expériences préliminaires semblent démontrer que la protéine R4BgSel est capable de fixer un facteur membranaire de sporocystes (résultat non présenté).



**Figure 46 : Analyse par SDS-PAGE des essais de liaisons de R4BgSel sur des polysaccharides.**

M : mannane. F : fucoïdan. La présence du calcium dans les essais est indiquée. La flèche indique la position de r4BgSel.



**Figure 47 : Produits des PCR semi-quantitatives analysés en Dot-blot.**

ARN total des cellules Bge amplifié par PAS1/PAS2 ; hybridation par la sonde PAS4. Cellules Bge cultivées en :

1 : milieu Bge, contrôle. 2 : milieu Bge, + E/S de sporocystes.

3 : milieu SSS, contrôle. 4 : milieu SSS, + E/S de sporocystes.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

La compréhension de la compatibilité entre *S.mansoni* et son hôte intermédiaire *B.glabrata* nécessite l'étude des mécanismes moléculaires de la relation hôte-parasite, et la détermination des signaux impliqués dans l'établissement et le maintien de la spécificité d'hôte. De nombreux efforts se sont concentrés sur l'identification de récepteurs de surface hémostocytaires et de composants de l'hémolymphe impliqués dans l'interaction mollusque-sporocystes. En effet, la clef des mécanismes de compatibilité semble résider dans le comportement des effecteurs cellulaires et humoraux du système de défense interne du mollusque vis à vis de la larve de trématode.

Les hémostocytes sont capables de reconnaître et d'adhérer aux sporocystes, quelque soit l'origine des cellules immunes : souche susceptible ou résistante de *B.glabrata*. Cependant après la reconnaissance, la suite des phénomènes diverge : dans le cas de la résistance, les hémostocytes détruisent les larves intra-mollusque, dans le cas de la susceptibilité, les hémostocytes n'encapsulent pas les larves et le parasite peut accomplir son développement. Les signaux échangés entre cellules et parasite ont une importance capitale dans l'établissement de la relation hôte-parasite. Les phénomènes de reconnaissance et d'adhérence jouent un rôle de premier plan dans l'interaction hôte-parasite. Il y a très peu d'information concernant les molécules impliquées dans les phénomènes d'échanges de signaux, de reconnaissance et/ou d'adhérence, que ce soit entre cellules ou entre cellules et parasites. C'est pourquoi nous avons cherché à identifier un facteur de mollusque qui pourrait être directement impliqué dans le contact entre cellules et sporocystes de *S.mansoni*.

Etant donné le rôle primordial des lectines dans les mécanismes de reconnaissance mais également comme effecteur de l'immunité chez les mollusques (Horak et Van der Knaap, 1997), c'est tout naturellement vers ces molécules que se sont orientées nos recherches. De plus, il a été largement démontré que les schistosomes sont riches en oligosaccharides de surface et présentent des capacités de liaison aux lectines (Uchikawa et Loker, 1991 ; Jonhston et Yoshino, 1996). Parmi toutes les possibilités, le couple sélectine-Le<sup>x</sup> semblait particulièrement intéressant en raison de son implication connue dans la relation schistosome-hôte définitif.

En effet, le trisaccharide Le<sup>x</sup> a été retrouvé aux stades adultes, cercaires et œufs de *S.mansoni* (Köster et Strand, 1994). Les glycoconjugués contenant le motif Le<sup>x</sup> semblent directement impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte définitif

(Velupillai et Harn, 1994). On peut envisager l'interaction entre les motifs Le<sup>x</sup> du schistosome et les sélectines des leucocytes ou des cellules endothéliales, dans des phénomènes d'adhérence/reconnaissance entre cellules de l'hôte et parasite. La démonstration a été faite de l'intervention de système Le<sup>x</sup>-sélectine dans l'ADCC de macrophages et d'éosinophiles envers les schistosomules de *S.mansoni* (Trottein *et al*, 1997 ; Nutten *et al*, sous presse). De plus, dans la schistosomiase murine, El Ridi *et al* (1996) ont montré que la L-sélectine soluble est capable de traverser la paroi de l'oeuf et de se fixer à la surface du miracidium. Enfin, la présence de l'épitope Le<sup>x</sup> dans des glycoconjugués semble un trait spécifique des schistosomes et n'a pas été retrouvée chez d'autres helminthes (Nyame *et al*, 1998).

Des expériences préliminaires nous ont permis de mettre en évidence la présence d'épitope Le<sup>x</sup> en surface des miracidiums et sporocystes de *S.mansoni*. Etant donné les différentes caractéristiques du Le<sup>x</sup> énoncées précédemment, sa découverte aux stades intra-mollusque était particulièrement intéressante et soulevait la question de la présence de son éventuel récepteur chez *B.glabrata*.

La nature lectinique des sélectines, et leur fonction réceptrice de ligands contenant des structures Le<sup>x</sup>, nous a conduit à envisager l'existence de molécules apparentées chez *B.glabrata*, et plus précisément chez les cellules effectrices de l'interaction avec le schistosome. Nous avons démontré l'expression d'une molécule sélectin-like immunoréactive chez les hémocytes, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les sélectines humaines. Les expériences suivantes ont permis d'amplifier, à partir d'ADN génomique de *B.glabrata*, un fragment de la molécule BgSel présentant un cadre ouvert de lecture codant pour une séquence homologue au domaine lectine des sélectines humaines. Ces résultats étaient en faveur de l'existence possible d'un couple sélectine-Le<sup>x</sup> dans la relation *B.glabrata-S.mansoni*. Si la présence d'un tel système récepteur-ligand s'avérait fondée, son étude apporterait un éclairage nouveau sur les mécanismes de reconnaissance voire de compatibilité entre l'hôte et son parasite.

Afin de poursuivre la caractérisation de cette molécule sélectine-like, nous nous sommes tournés vers le modèle d'interaction *in vitro*, entre les cellules Bge de *B.glabrata* et les sporocystes de *S.mansoni*. En effet, un grand pas vers l'étude de l'élucidation des relations hôte-parasite a été franchi avec la mise au point de coculture de cellules Bge et de sporocystes de *S.mansoni* (Laursen et Yoshino, 1995). Le développement et la différenciation des larves

sont rendus possibles par la présence et le contact des cellules avec les sporocystes. Les facteurs sécrétés par les cellules sont nécessaires au développement du parasite mais ne suffisent pas. L'encapsulation des sporocystes de *S.mansoni* par les cellules Bge s'avère indispensable à la différenciation correcte des parasites. Ce modèle *in vitro* devrait permettre l'identification des molécules impliquées dans le dialogue moléculaire établi entre les cellules de l'hôte et le parasite.

On a tendance à comparer les cellules Bge et les hémocytes ; la lignée embryonnaire et les cellules de défense partagent de nombreuses caractéristiques : émission de pseudopodes, adhérence, phagocytose... Il semblerait que les cellules Bge et les hémocytes proviennent de la même lignée fibroblastique (Hansen, 1976 ; Stein et Basch, 1977), sous-entendant que les hémocytes puissent être des cellules différenciées issues de cellules proches des cellules Bge. De fait, le comportement des cellules Bge envers les sporocystes est à rapprocher du comportement des hémocytes.

L'action du fucoïdan sur les cellules Bge a conforté nos hypothèses sur l'existence d'un système sélectine- $Le^x$  dans l'interaction hôte-parasite. Cet inhibiteur spécifique de la liaison au ligand des sélectines provoque un accroissement important de la biosynthèse protéique des cellules Bge. De plus, il entraîne une aggrégation des cellules entre elles. C'est au niveau des cocultures que nous avons observé l'effet le plus intéressant du fucoïdan ; les cellules Bge se détachent des sporocystes pour former des amas indépendants des larves de parasites.

Ce polysaccharide riche en fucose et en sulfate, pourrait mimer une structure présente en surface du sporocyste, éventuellement porteuse de  $Le^x$ , et venir ainsi empêcher la liaison d'une éventuelle molécule réceptrice, sélectin-like, en surface des cellules Bge.

En complément de ces informations, des expériences de RT-PCR nous ont montré que la séquence homologue aux sélectines est effectivement présente au niveau de l'ARN de cellules Bge, ainsi qu'au niveau du mollusque. Le clonage de cette molécule a donc été entrepris.

La molécule BgSel a été isolée à partir d'une banque d'ADN complémentaire de *B.glabrata*. Ce messenger code pour une séquence protéique de 336 amino-acides dont la partie C terminale possède la séquence préalablement identifiée dans l'ADN génomique de *B.glabrata*. La séquence BgSel est plus courte que les sélectines ; cependant les expériences

de Northern blot et de recherche de l'extrémité 5' portent à croire que la séquence BgSel représente une copie complète du messager.

L'extrémité C terminale constitue un domaine de 116 amino-acides qui présente des identités avec le domaine lectine des sélectines. Comme nous l'avons décrit précédemment, en dehors du domaine lectine, BgSel diffère sur plusieurs points par rapport aux sélectines. On constate l'absence des autres domaines caractéristiques de ces molécules d'adhérence, domaine EGF-like et domaine caractéristique des protéines fixatrices du complément. Néanmoins, jusqu'à plus ample information, on peut supposer que les sélectines seraient des molécules récentes du point de vue évolutif, apparues chez les mammifères, voire les vertébrés, par le jeu de combinaisons d'exons (Drickamer, 1993b). Dans ce cas, rechercher ce type de molécule chez un mollusque, reviendrait à identifier des protéines distinctes chez cet organisme. D'ailleurs, en règle générale, ces lectines d'invertébrés ne constituent que des CRD isolés, sans association à d'autres domaines.

On constate également une organisation différente de la position du domaine lectine au sein de la protéine : localisation C terminale chez BgSel contrairement à la position N terminale chez les sélectines. Toutefois la spécificité d'un CRD vis à vis de sucres n'est pas liée à sa position relative dans une protéine.

Si l'identité entre les domaines lectine de BgSel et des sélectines ne dépasse pas 29%, il convient de relativiser ce résultat et de le considérer dans la perspective des comparaisons entre différents groupes de lectines de type C. L'alignement des sept groupes de lectines de type C indique des taux de similitudes faibles en regard de ce que l'on pourrait attendre d'une même famille de molécule de mammifères. De ce fait, les conservations entre BgSel et les lectines de type C deviennent plus pertinentes d'une parenté entre ces molécules. Il semble également sur la base de cet alignement que BgSel soit plus proche du groupe des sélectines que des autres groupes de lectine de type C. Cependant, ces comparaisons entre plusieurs séquences restent subjectives : en effet, il existe une certaine liberté dans le choix d'aligner ensemble certains résidus plutôt que d'autres, ainsi que dans l'introduction des lacunes dans les séquences. Ces facteurs peuvent donc modifier légèrement les taux de similitudes entre les séquences.

L'examen de la séquence BgSel et d'autres lectines de type C d'invertébrés permet de constater que le motif caractéristique de ces lectines est très ancien. La comparaison des CRD de ces divers invertébrés montre des similarités entre séquences comprises entre 20 et 40% ;

ces chiffres sont du même ordre de grandeur que les similarités entre les différents groupes de type C de mammifères. Autrement dit, la variation observable entre les lectines de type C semble la même entre espèces ou au sein d'une même espèce. Dans ce contexte, la comparaison de BgSel avec les lectines d'autres organismes peut difficilement nous renseigner sur la relation entre ces molécules.

En dehors du CRD, la structure et l'organisation de ces protéines n'apportent pas de renseignements sur le reste de la protéine BgSel. On ne rencontre pas d'homologie entre le reste de la protéine BgSel et d'autres lectines d'invertébrés. Comme énoncé précédemment, la plupart des lectines d'invertébrés n'ont pas d'autres domaines que le CRD. Dans l'ensemble des lectines utilisées dans la figure 35, seule deux séquences sont d'organisation plus complexe ; le CRD d'*Hydra vulgaris* est en position C terminale d'une protéine de 1348 aa, récepteur de type tyrosine kinase (Steele, 1993), le CRD du facteur C de *Tachypleus tridentatus* se trouve au sein d'une protéine de 1019 aa, de structure mosaïque complément-like, EGF-like, lectine-like (Muta *et al.*, 1991).

Une analyse plus fine de la structure du CRD des sélectines a démontré l'importance de six amino-acides particuliers dans la liaison au(x) ligand(s). Trois de ces aminoacides se retrouvent chez BgSel. Toutefois la plupart de ces résidus chez les sélectines sont impliqués dans la reconnaissance de structures sialylées et/ou sulfatées. L'absence chez BgSel des résidus concernés est en accord avec nos informations sur ces structures glucidiques chez *B.glabrata* et chez les schistosomes. D'une part il n'a pas été démontré la présence d'acide sialique chez ce gastéropode. De plus, l'existence d'acide sialique et de glucides sulfatés n'est pas attestée chez les schistosomes, constat qui revêt toute son importance dans l'hypothèse où BgSel interviendrait dans la reconnaissance parasitaire (Nyame *et al.*, 1987 ; 1988)

Devant les différentes conclusions tirées de l'analyse structurale de BgSel, il apparaît clairement que BgSel semble appartenir aux lectines de type C, mais seule la détermination du ligand spécifique de BgSel permettra d'établir sa relation avec les sélectines.

En vue de pouvoir étudier l'expression de BgSel par les cellules Bge, il était indispensable de pouvoir disposer d'une protéine recombinante. Tout d'abord, nous avons choisi de n'exprimer que le CRD de la molécule afin de limiter l'étude au seul domaine qui présente des homologies avec les sélectines.

Le domaine lectine de BgSel a donc été sous-cloné et exprimé chez *E.coli*. La protéine recombinante s'avère être reconnue par des anticorps anti-sélectine. Ce résultat, ainsi que les similarités entre les CRD de BgSel et des sélectines, peuvent expliquer l'immunoréactivité des hémocytes envers des anticorps anti-sélectines, et supposent l'expression de BgSel par ces immunocytes. Pour poursuivre l'étude de BgSel, des anticorps de lapin ont été produits contre la protéine recombinante. Des études immunocytochimiques sur hémocytes et cellules Bge ont confirmé la présence de la protéine native chez les deux types de cellules. Dans les deux cas, une perméabilisation cellulaire est nécessaire pour obtenir un marquage avec les anticorps anti-rBgSel, suggérant que le CRD de BgSel n'est pas exprimé en surface. La présence du peptide signal incline à penser que BgSel est un facteur soluble exprimé et sécrété par les cellules. Cette hypothèse est renforcée par les expériences de Western Blot sur les produits d'excrétion/sécrétion obtenus à partir de culture de cellules Bge. Un produit de 79 kDa est spécifiquement reconnu par les anticorps anti-rBgSel. La différence notable de masse moléculaire entre ce produit E/S et la masse estimée de BgSel (38,8 kDa) peut être expliquée par la glycosylation de la protéine native ; la séquence BgSel possède huit sites potentiels de N-glycosylation et de nombreux sites possibles de O-glycosylation. Nous avons renouvelé les expériences de Western Blot après déglycosylation des E/S de cellules Bge par une endoglycanase, la PNGase F. Ce traitement entraîne un net déplacement de la bande observée reconnue par le sérum anti-rBgSel, jusqu'à une taille voisine de celle attendue d'après la séquence. Ce résultat suggère que l'importante glycosylation de BgSel n'est due qu'à des oligosaccharides liés aux résidus asparagine ; la PNGase F coupe les liaisons entre le GlcNac et l'asparagine d'oligosaccharides complexes, hybrides ou riche en mannose.

La dernière partie du travail concerne la recherche de la fonction de BgSel : la caractérisation de sa fonction lectine, et son éventuelle implication dans l'interaction hôte-parasite.

L'impossibilité d'obtenir une protéine soluble en système d'expression procaryotique et l'importance des modifications post-traductionnelles subies par la protéine native, sont autant d'arguments qui justifient l'expression de BgSel recombinante en système d'expression baculovirus en cellules d'insecte.

BgSel recombinante a été produite sous la forme d'une protéine fusionnée à la glutathion S-transférase, sécrétée dans le milieu extérieur par les cellules d'insecte. La protéine soluble, purifiable par chromatographie d'affinité sur colonne de glutathion, est reconnue par les anticorps anti-BgSel.

Cette protéine recombinante a permis d'envisager des essais *in vitro* de liaisons sur des monosaccharides et des polysaccharides, en particulier le fucoïdan, pour lequel nous avons préalablement démontré l'effet sur les cellules Bge au niveau de leur adhérence, entre elles, au support et surtout au parasite. D'après ces expériences, il semblerait que R4BgSel soit capable de fixer le fucoïdan, de façon indépendante des ions calcium. Toutefois le résultat obtenu est sujet à interprétation et reste à confirmer. En effet, ce travail a été difficilement reproductible et réalisable, pour différentes raisons : une trop faible affinité du sérum anti-BgSel, un bruit de fond élevé engendré par la révélation par chemiluminescence, et une probable mauvaise conformation de la protéine produite par les cellules d'insectes. La non-nécessité des ions calcium pour obtenir la liaison de la protéine recombinante sur le polysaccharide est en accord avec les constatations faites sur l'absence d'un certain nombre d'acides aminés impliqués dans les sites de fixation au calcium dans la séquence BgSel.

Le choix du fucoïdan est dicté par son rôle compétiteur des ligands des sélectines (Nasu *et al.*, 1997), donc à priori contenant les structures Le<sup>x</sup> et sLe<sup>x</sup>. Ce premier résultat est encourageant et mérite d'être affiné, d'une part par l'amélioration de la technique (nouveau sérum dirigée contre la protéine entière, essais avec la protéine native), et d'autre part en utilisant des structures Le<sup>x</sup> ou apparentées (sLe<sup>x</sup>, Le<sup>a</sup>...).

Les essais de liaisons réalisés avec des monosaccharides n'ont pas permis d'améliorer le résultat précédent. On ne peut exclure que le choix des sucres ne corresponde pas à l'affinité du CRD.

Si l'expression de protéines eucaryotiques en baculovirus et cellules d'insectes a largement démontré son efficacité, nous n'avons toutefois que peu d'éléments à notre disposition se rapportant à l'expression et la fonctionnalité de lectines de mollusques dans ce type de vecteur d'expression. Cependant on peut citer à titre d'exemple, le cas d'une protéine de la lymnée exprimée de façon fonctionnelle par des cellules d'insectes. Il s'agit de la mise au point à partir de cellules SF9, d'une lignée transformée ayant intégré dans son génome le gène codant pour la sous-unité  $\beta$  du récepteur GABA de *L.stagnalis* (Smith *et al.*, 1995).

Dans le cas de BgSel, en l'absence d'une démonstration de la fonction de la protéine recombinante, on peut supposer que l'expression en cellules SF9 ne permet pas la production d'une protéine biologiquement active. Des différences entre cellules d'insectes et de mollusques, au niveau de la glycosylation, ou d'autres modifications post-traductionnelles, pourraient empêcher l'élaboration d'une conformation correcte.

L'expression de BgSel en baculovirus présente une difficulté due au choix du vecteur d'expression d'une protéine recombinante fusionnée à la GST. Il s'avère que ce système d'expression produit principalement une protéine GST seule, au détriment de la protéine GST-BgSel. La raison serait l'intervention d'une lyse de la protéine de fusion au sein des cellules SF9. La disproportion dans le rapport GST/GST-BgSel a pour répercussion de diminuer grandement le rendement de purification de la protéine recombinante sur colonne de glutathion.

Devant les difficultés rencontrées dans la production en baculovirus de BgSel (purification, fonctionnalité), il convient d'envisager la purification de la protéine native à partir des cellules Bge ou à partir de mollusques entiers. Les lectines d'invertébrés sont en général obtenues à partir d'extraits d'organismes entiers, d'organes (hépatopancréas...) ou de liquides physiologiques (hémolymphe, liquide coelomique). Leur purification se fait par une série de chromatographies variées. Ces lectines ainsi isolées conservent en général leur activité. C'est le cas des lectines de *Cucumaria echinata*, préparées à partir d'extraits totaux de cet échinoderme, et purifiées selon une série de chromatographies (Hatakeyama *et al.*, 1994). Chez *B. alexandrina*, hôte de *S. mansoni*, les lectines BaSI, II et III ont également été purifiées par chromatographie, à partir de l'hémolymphe de ce gastéropode. Leur fonction lectine a pu être mise en évidence : affinité pour le fucosyllactose ; leur liaison à certaines glycoprotéines de *S. mansoni* a également été démontrée (Mansour, 1995).

L'obtention de la protéine native devrait permettre d'étudier la fonction de BgSel en tant que lectine, de même que de déterminer son implication possible dans l'interaction avec le schistosome.

Sur ce dernier point, des expériences récentes menées dans le laboratoire indique que BgSel recombinante serait capable de reconnaître une protéine membranaire de sporocystes (résultat non présenté). Cependant dans l'attente de la confirmation de ce résultat, il convient de considérer BgSel/facteur de reconnaissance comme une hypothèse de travail.

En tant que molécule soluble, excrétée par les cellules Bge, BgSel pourrait être un facteur capable de lier des facteurs parasitaires solubles. Par sa fonction lectine putative, BgSel pourrait également représenter une molécule réceptrice entre les cellules et les sporocystes, facteur soluble capable de réaliser un "pontage" entre membrane cellulaire et tégument du parasite.

Jusqu'à présent, la nature exacte des molécules responsables de la reconnaissance du parasite reste inconnue. Récemment les travaux de Davids et Yoshino (1998) ont montré que

les hémocytes de *B.glabrata* sont sensibles au térapeptide RGDS, inhibiteur de la liaison aux intégrines. Les intégrines constituent une famille de molécules d'adhérence impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires chez les vertébrés (liaison à la membrane extracellulaire, domiciliation des leucocytes...). La séquence RGD est un motif de liaison caractéristique des ligands des intégrines telle que la matrice extracellulaire ou le fibrinogène. Les fonctions d'étalement et d'aggrégation des hémocytes sont inhibées par la présence d'une séquence RGDS soluble, suggérant l'implication d'une structure de type intégrine chez les hémocytes dans les phénomènes de contact au support ou entre cellules. Cette idée est renforcée par le clonage et le séquençage d'une  $\beta$ -intégrine des cellules Bge (Yoshino, communication personnelle). L'existence d'une telle molécule soulève la question d'une éventuelle structure ligand chez le schistosome. Cette récente constatation est à rapprocher du fait que l'intégrine Mac-1, présente en surface des éosinophiles, intervient dans les mécanismes d'ADCC mis en oeuvre contre le schistosomule de *S.mansoni*, laissant supposer l'existence d'une molécule réceptrice pour Mac-1 chez le parasite (Capron *et al*, 1987), molécule non identifiée à ce jour.

Si BgSel native est effectivement produite et sécrétée par les cellules Bge, son expression est-elle influencée par des facteurs parasitaires? Une approche à cette question a été tentée par les expériences de PCR semi-quantitative, destinée à estimer le taux d'expression du messager codant pour BgSel chez des cellules soumises à l'influence parasitaire. On constate une diminution de l'expression de l'ARNm de BgSel dans les deux heures suivant le contact entre E/S parasitaire et cellules Bge. En l'absence de gène de référence (house keeping gene), dont l'expression serait constante chez les cellules Bge, il subsiste un doute sur la spécificité de l'impact de facteurs parasitaires sur l'expression de BgSel. Il est possible que la diminution de l'expression du messager de BgSel participe à une réponse globale de la part des cellules. A ce propos, des travaux menés dans le laboratoire, ont montré que les E/S de sporocystes entraîne une diminution générale de la synthèse protéique des cellules Bge, dans les premières 24 heures d'exposition des cellules aux facteurs parasitaires. Cet effet sur la synthèse protéique peut être rapproché de l'immunosuppression observée dans la relation *B.glabrata/S.mansoni*, au niveau des hémocytes. Dans le même temps, on constate un accroissement de la synthèse d'ADN, que l'on peut corréler avec la prolifération cellulaire constatée dans les expériences de coculture (Aroca, 1997). Dans la poursuite du travail, il serait intéressant d'examiner l'expression de la protéine BgSel, ainsi que sa présence dans le milieu extérieur, au cours des différentes étapes de la coculture.

L'importance des facteurs solubles émis par les cellules Bge pour le développement parasitaire a été clairement démontré par la culture *in vitro* des larves de *S.japonicum* (Coustau *et al*, 1997) ainsi que de larves d'*E.caproni* (Ataev *et al*, 1998) et de *Fascioloides magna* (Laursen et Yoshino, 1999). Contrairement à la coculture cellules Bge-sporocystes de *S.mansoni*, aucune aggrégation entre cellules et larves de *S.japonicum* n'est constatée ; cette absence de contact n'empêche pas la culture *in vitro* depuis le stade miracidium jusqu'au stade sporocyste secondaire. A l'appui de ce constat, le développement de *S.japonicum* semble donc entièrement dépendant de facteurs cellulaires solubles. Les auteurs remarquent que la viabilité et la croissance des sporocystes sont accrues avec l'augmentation de la densité cellulaire, résultat de l'augmentation de la quantité de facteurs potentiellement favorables au développement parasitaire. Il est possible également que la densité cellulaire induise un changement qualitatif des facteurs libérés par les cellules, nécessaires au parasite, suite à une régulation du métabolisme cellulaire en réponse à la densité de cellules. Dans le cas d'*E.caproni*, la coculture permet la survie et une certaine croissance des sporocystes primaires accompagnée d'une embryogénèse en leur sein, mais ce développement est suivie d'une dégénérescence des parasites avant la production de sporocystes secondaires.

En raison de la grande mobilité des sporocystes de *S.japonicum* en culture, l'absence d'encapsulation des parasites par les cellules Bge peut être imputable à un empêchement mécanique, bien qu'il soit possible qu'il s'agisse d'une absence de reconnaissance de la part des cellules. *E.caproni* ayant quant à lui une mobilité réduite, comparable à celle de *S.mansoni*, l'absence d'encapsulation est due soit à une non-reconnaissance, soit à une interférence des fonctions cellulaires par des produits E/S de l'échinostome. Les cocultures entre cellules Bge et différents trématodes indiquent l'existence chez la lignée cellulaire de facteurs communs à ces différents parasites ; toutefois, le contact des cellules uniquement avec *S.mansoni* est en faveur de la présence de facteurs/récepteurs cellulaires spécifiques de cette espèce parasitaire.

Dans ce contexte, si BgSel s'avère capable de reconnaître les sporocystes de *S.mansoni*, il sera particulièrement intéressant d'examiner le comportement de la molécule vis à vis d'autres espèces telles que *S.japonicum* et *E.caproni*. BgSel serait-elle capable de reconnaître d'autres trématodes, et dans quelle mesure cette caractéristique pourrait-elle être associée au trisaccharide Le<sup>x</sup> ? Rappelons à cet égard qu'il semblerait que la présence de Le<sup>x</sup> soit un trait commun des schistosomes et que ce déterminant n'a pas été trouvé chez d'autres trématodes (Nyame *et al.*, 1998). Dans le même ordre d'idée, nous envisageons de rechercher la protéine

équivalente à BgSel chez des mollusques hôtes de schistosomes tel *Oncomelania*, hôte de *S.japonicum*. La comparaison entre de telles molécules et BgSel de *B.glabrata* pourrait fournir des indications sur la spécificité entre mollusques et trématodes.

L'étude de BgSel entre dans le cadre de l'étude des signaux moléculaire mis en jeu entre cellules Bge et parasite, signaux aboutissant à la compatibilité entre cellules de l'hôte et schistosome, et *a fortiori* au développement et à la différenciation du schistosome. Il est particulièrement important de déterminer la fonction éventuelle de BgSel dans l'interaction avec le schistosome. Si BgSel s'avère capable de déclencher un signal chez le parasite nécessaire à son développement, ce facteur de l'hôte pourrait participer à l'élucidation des mécanismes parasitaires qui entrent en jeu dans l'interaction cellules-sporocystes. Dans ce cadre, BgSel serait un candidat pour les expériences de transfections réalisées chez les cellules Bge. En effet, grâce aux avantages du modèle de coculture, les cellules Bge sont envisagées pour étudier l'influence de gènes de mollusque sur le développement parasitaire. A cette fin, depuis quelques années, des travaux visent à développer les outils de transformation génétique de la cellule Bge (promoteur homologue, éléments transposables). Au laboratoire les travaux de V. Lardans ont aboutit à la mise au point d'une méthode de transfection transitoire de la lignée Bge par technique de lipofection (Lardans *et al*, 1996). D'autre part, un promoteur homologue inductible est désormais disponible, le promoteur de l'HSP70 de cellules Bge (Yoshino *et al*, 1998). Ces différents travaux visent à mettre au point une transformation stable de la cellule Bge, afin de moduler l'expression de gènes homologues, ou hétérologues, en vue d'étudier voire d'influencer la relation hôte-parasite. L'obtention de lignée modifiée permettrait d'envisager de contrôler (réprimer) l'expression de BgSel, afin de déterminer son impact éventuel sur le développement parasitaire.

Jusqu'à présent, peu de renseignements sont connus quant à la nature des signaux échangés entre cellules Bge et parasite. Les seules indications sur la nature de molécules pouvant intervenir dans cette interaction, sont l'activation du métabolisme et de la division cellulaire des parasites sous l'effet de facteurs de croissance connus, l'EGF murin et l'insuline bovine (Aroca, 1997). Ces résultats sont à rapprocher, d'une part de l'existence chez le schistosome adulte d'une molécule homologue au récepteur pour l'EGF (Shoemaker *et al*, 1992), et d'autre part, de l'existence de molécules apparentées à l'insuline de mammifère décrites chez plusieurs invertébrés (Thorpe et Duve, 1984 ; Steiner *et al*, 1985). Notamment, chez le gastéropode *L.stagnalis*, les MIP (Molluscan Insulin Peptides) sont similaires au

niveau de la séquence primaire à l'insuline de mammifère et interviennent dans la régulation de la reproduction et de la croissance chez le mollusque (Smit *et al*, 1988 ; Meester *et al*, 1992). Cependant, les MIP de *L.stagnalis* divergent par rapport aux insulines de vertébrés au niveau de certains acides aminés importants pour la fonction de l'insuline. Il faut noter que l'EGF et l'insuline ont également des effets stimulants sur le métabolisme et la prolifération des cellules Bge.

Ces informations ont conduit à la recherche de récepteurs à l'insuline et à l'EGF chez le schistosome. Dans notre laboratoire, il a été montré par RT-PCR, l'existence d'ARNm pour le récepteur à l'EGF chez les sporocystes primaires de *S.mansoni*. Ce résultat est à rapprocher de la détection de molécules semblables à l'EGF chez *L.stagnalis* (De Jong-Brink, communication personnelle). De plus, un ARN (SmIR) codant pour une protéine qui présente des homologies avec les récepteurs à l'insuline et à l'Insulin Growth Factor de différentes espèces a pu être mis en évidence à différents stades parasitaires, sporocyste, cercaire et adulte (Lardans *et al*, soumis). Ces résultats pourraient expliquer l'effet activateur de l'EGF et de l'insuline sur le métabolisme du sporocyste.

De nombreuses questions restent en suspens quant au rôle de BgSel. En premier lieu, il convient de démontrer sans ambiguïté la nature lectinique de BgSel, et surtout d'établir sa spécificité envers des structures oligosaccharidiques (Le<sup>x</sup>?). Si l'affinité de BgSel pour le fucoïdan se confirme, on pourrait envisager un rôle de cette protéine dans l'interaction entre les cellules Bge et les sporocystes de *S.mansoni*.

Parallèlement, il est capital de confirmer la capacité de BgSel à reconnaître une molécule membranaire de *S.mansoni*. Si tel est le cas, cette reconnaissance serait-elle dépendante du CRD ou plutôt due à une interaction de type protéine-protéine? En effet, jusqu'à présent la nature et le rôle du domaine non-CRD de la protéine BgSel sont restés inconnus. La poursuite de l'étude de BgSel devrait déboucher sur l'identification de la nature du ligand chez le parasite. Dans un tel contexte, il conviendra d'examiner l'importance de la molécule BgSel dans l'interaction hôte-parasite.

D'autre part, nous ne savons pas si BgSel est active sous forme de facteur soluble sécrétée par les cellules Bge, ou si elle pourrait intervenir dans les phénomènes de reconnaissance et médier l'adhérence au parasite. On pourrait envisager en effet que les deux

parties de la protéine (domaine CRD et non-CRD) soient impliquées dans la reconnaissance, constituant une molécule capable de réaliser un pont entre cellule et parasite.

Les sélectines établissent le premier contact entre leucocytes et cellules endothéliales, avec pour conséquence l'expression en surface de nouvelles molécules d'adhérence. Si BgSel est un facteur de reconnaissance, pourrait-il être à l'origine du déclenchement de signaux intracellulaires, à l'instar des sélectines?

La recherche de molécules homologues chez d'autres mollusques vecteurs de trématodes nous indiquera si BgSel est propre à *B.glabrata*. La présence ou l'absence, voire l'existence de molécules partiellement homologues à BgSel, dans d'autres modèles d'interaction hôte-parasite, seraient à envisager dans le cadre de l'étude de la spécificité et de la compatibilité entre mollusques et trématodes.

# **MATERIEL ET METHODES**

# **IMATERIEL BIOLOGIQUE**

## **1-Cycle parasitaire**

Une souche portoricaine de *Schistosoma mansoni* est maintenue au laboratoire, avec pour hôte intermédiaire la souche albino de *Biomphalaria glabrata*, et pour hôte définitif le hamster doré *Mesocricetus auratus*.

## **2- Obtention de sporocystes**

Les foies de hamster sont prélevés 40 jours après infestation massive par des cercaires et lavés en milieu de Hanks-Wallace (+Gentamycine) à 4°C. Après ablation de la vésicule biliaire, les foies sont broyés afin de permettre la libération des oeufs. Afin d'éliminer les débris tissulaires, le broyat est centrifugé à 1500 tr/min pendant une fois 5' puis deux fois 1' 30", et rincé (Hanks-Wallace) entre chaque centrifugation. L'éclosion des oeufs s'effectue dans de l'eau minérale, à 28°C, exposée à une grande luminosité, durant 20'. Le milieu d'éclosion est introduit dans un Erlenmeyer équipé d'un tube en T, que l'on plonge dans l'obscurité. Les miracidiums sont récupérés par attraction à la lumière dans le tube en T.

La transformation des miracidiums en sporocystes primaires a lieu en milieu salin défini, le MSM (Minimal Salt Medium, Schallig et al, 1990).

MSM : NaCl 3,5 g - KCl 0,16 g - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,09 g - MgSO<sub>4</sub> 0,45 g - CaCl<sub>2</sub> 0,53 g - NaHCO<sub>3</sub> 0,05 g - Glucose 1,5 g - Tréhalose 1,5 g. qsp 1 l H<sub>2</sub>O. pH : 7,8. Osm.: 155 mosmol/kgH<sub>2</sub>O. Stérilisation par filtration sur 0,45 µm.

## **3- Préparation des hémocytes**

L'hémolymphe est prélevée par rétractation du pied des planorbes et placée sur un couvercle de boîte de Pétri pour éliminer les débris divers et le mucus. Pour l'immunocytochimie, l'hémolymphe est ensuite placée sur lame de verre où les hémocytes sont laissés à sédimenter et adhérer durant 20'.

## **4- Les cellules Bge**

### **a- culture**

La lignée Bge provient du laboratoire de TP Yoshino, Université du Wisconsin (ATCC CRL 1494). Les cellules sont maintenue en culture dans le milieu défini par Hansen (1976),

milieu Bge, enrichi de 10% de sérum de veau foetal (Myoclon, GibcoBRL). La culture s'effectue à 28°C sous conditions atmosphériques.

#### Milieu Bge :

milieu de Schneider (GibcoBRL) 220 ml

Hydrolysate de lactalbumine (Merck) 4,5 g

D(+)-Galactose (Sigma) 1,3 g

QSP 11 H<sub>2</sub>O. pH 7,2. Filtration.

Antibiotiques : Pénicilline G et Streptomycine sulfate (SIGMA), solution stock à 10 mg/ml. Utilisation à 50 µg/ml.

Pour les expériences d'immunocytochimie, les cellules Bge sont mises en culture 24 h au préalable dans une chambre de culture stérile de 8 puits, avec 10<sup>5</sup> cellules/puits (Lab-Tek Nalge-Nunc).

#### b- Préparation des cellules pour les RT-PCR semi-quantitatives

Les cellules Bge sont mises en culture en plaque de 12 puits, à raison de 2.10<sup>6</sup> cellules/puit. Après adhérence des cellules au support, le milieu Bge est remplacé par 500 µl de milieu Bge ou par 500 µl de milieu SSS. Parallèlement, des sporocystes ont été préparé en milieu SSS (cf. § I 4c). Sur les cellules Bge sont ajouté 1ml de surnageant frais de culture des sporocystes de 24 h, ou 1 ml de SSS. L'incubation s'effectue pendant 2 h, après lesquelles le surnageant est éliminé afin de récupérer les cellules Bge.

#### c- Préparation des membranes

Les cellules Bge sont centrifugés, lysées par congélation, puis homogénéisées en Tris 20 mM pH 7,6 ; EDTA 1 mM, en présence d'aprotinine et de PMSF. L'homogénat est centrifugé à 10000 g une fois 30', suivi de deux fois 10', avec lavages en Tris, EDTA. Le culot de composants membranaires est resuspendu dans le même tampon additionné de déoxycholate de sodium 1% (DOC). Après sonication, le détergent est laissé en contact 30' à 4°C sous agitation douce. Le détergentat est ultracentrifugé à 80000 tr/min, 20'. Le surnageant obtenu est centrifugé de la même façon 10'. On obtient un culot de membranes non extractibles par le DOC, et le surnageant de composants extraits par le DOC. Les différentes fractions sont soumises à SDS-PAGE suivi d'un Western Blot.

#### d- Préparation des produits d'excrétion/sécrétion (E/S)

Les cellules Bge sont mises en culture en milieu Bge, dans une boîte de 75 cm<sup>2</sup>. Lorsque la culture atteint 70% de cellules confluentes, le milieu Bge est remplacé par 10 ml de milieu SSS, après rinçage. Le surnageant de culture est récupéré après 8 et 24 h de culture. Les cellules sont éliminées par centrifugation. Le surnageant est dialysé sur la nuit contre une solution de Tris 2 mM, pH 7,5, puis lyophilisé.

SSS (Sterile Snail Saline), milieu physiologique mis au point pour les hémocytes de *L.stagnalis* (Adema *et al*, 1992) : Hépès 5 mM, NaOH 3,7 mM, NaCl 36 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, pH 7,8 ; 120 mOsm, stérilisation par filtration sur 0,45 µm.

#### Déglycosylation des produits E/S des cellules Bge

100 µg d'E/S lyophilisé sont solubilisé dans un volume de tampon de dénaturation (SDS 0,5% ; β-mercaptoéthanol 1%). Après adjonction de phosphate de sodium 0,05 M final, et de NP-40 1% final, la N-glycosidase F (PNGase F, New England BioLabs) est ajoutée dans le milieu à raison de 2 µl soit 1000U. La réaction se déroule à 37°C, sur la nuit.

## **II COCULTURE : CELLULES BGE-SPOROCYSTES DE *S.mansoni***

Les cellules Bge sont mises en culture sur plaque de 96 puits (50000 cellules/puits) en milieu Bge complété au SVF.

Les miracidiums sont mis à transformer en milieu MSM (cf.I-2), et les sporocystes de 24 h sont placés dans les puits contenant les cellules Bge, à raison de 50 sporocystes/puits. La coculture est maintenue à 28°C, en condition atmosphérique. Le milieu Bge est renouvelé au ½ une fois par semaine, sans renouvellement des cellules.

#### Co-culture en présence de polysaccharides

Le fucoidan (Sigma) et le mannane (Sigma) sont préparés sous forme de solutions stock à 10 mg/ml en MSM. Pour les expériences d'observations microscopiques, les polysaccharides sont ajoutés à de nouvelles cocultures, à 1 et 2 mg/ml. Au puits contrôle est ajouté un volume équivalent de MSM.

Pour les expériences de marquage métabolique, les cellules Bge sont mises en présence d'une gamme de polysaccharides de 0,1 mg/ml à 10 mg/ml.

### **III IMMUNOCYTOCHIMIE**

#### **1- Marquage des cellules**

Les cellules sont rincées en PBS dilué au tiers puis fixées au paraformaldéhyde 1% durant 5'. La perméabilisation s'effectue par traitement au TritonX100 0,1% pendant 4'. Les lames sont saturées en PBS/BSA 1%, avec du sérum sain de chèvre (1/50), 2 h à température ambiante. Les cellules sont incubées 2 h avec les anticorps primaire ou le sérum de lapin (1/100) puis 1 h 30' avec les anticorps secondaires.

Pour l'immunofluorescence, les lames sont contre-colorées au bleu Evans.

Pour la phosphatase alcaline, les lames sont révélées par coloration à la fuschine (New Fuschin, Dako) et contre-colorée à l'hématoxyline (Fluka).

#### **2- Marquage par immunofluorescence des sporocystes**

Les sporocystes de 24 h sont fixés au paraformaldéhyde 1% durant 10', puis lavés en milieu de Hanks-Wallace. L'incubation avec les anticorps se fait en tube en verre de 500  $\mu$ l, 1 h pour les anticorps primaires puis 30' pour les anticorps secondaires, à température ambiante. Chaque incubation est suivie de deux lavages par du Hanks-Wallace, les sporocystes sont récupérés par centrifugation de 2' à 1500 tr/min Les sporocystes sont placés entre lame et lamelle à l'aide de Mowiol.

### **IV ANALYSE DES PROTEINES**

#### **1- Marquage métabolique des cellules Bge**

Le marquage métabolique des cellules Bge en présence de polysaccharides est réalisé en milieu MSM, en plaque de culture de 96 puits, avec 2 $\mu$  Ci/puits de <sup>35</sup>S.méthionine, durant 24 h.

Pour les expériences d'immunoprécipitation, les cellules sont mises en culture en plaque de 24 puits ; après 24 h, le milieu Bge est remplacée par du milieu SSS. Le marquage métabolique s'effectue en présence de 15  $\mu$ Ci/puits de <sup>35</sup>S.méthionine, durant 24 h.

Après incubation, le surnageant de culture est éliminé ; les cellules sont récupérées par lavage du puits au SDS 2%, chauffées à 100°C, 2', puis centrifugées.

Une fraction du lysat cellulaire est précipité à l'acide trichloroacétique (TCA) afin d'estimer la radioactivité incorporée. 5 µl de lysat et 1 ml de BSA 0,01% sont précipités par 10% de TCA à 4°C, 20'. Le précipité est filtré sur papier Whatman GF/C, la radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation liquide.

## **2- Electrophorèse**

Electrophorèse des protéines en condition dénaturantes, SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) selon Laemli (1970).

Tampon d'échantillon : Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2% ; saccharose 10% et β-mercaptoéthanol 5% en conditions réductrices.

Gel de concentration : polyacrylamide 5% ; Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 0,1%.

Gel de séparation : polyacrylamide ; Tris-HCl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0,1%.

Tampon d'électrophorèse : Tris 25 mM ; Glycine 250 mM ; SDS 0,1%.

## **3- Western Blot**

Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Towbin *et al*, 1979). La membrane est saturée en PBS/BSA 3% 2 h à température ambiante. Les sérums ou les anticorps primaires sont incubés en PBS/BSA 0,25% 2 h à température ambiante. Les anticorps secondaires couplés à la streptavidine biotinylée sont incubés en PBS/BSA 0,25% 1 h 30' à température ambiante, et sont suivis d'une incubation de 30' de la peroxydase couplée à la streptavidine (Amersham). Les lavages sont effectués en PBS/Tween 0,1%.

La révélation se fait avec le 4 Chloro-1-Naphtol (BioRad), ou par chemiluminescence (kit Renaissance, Amersham).

## **Anti-sérum**

Un lapin a été immunisé selon la méthode de Vaitukaitis *et al* (1971) avec la protéine recombinante BgSel/CRD produite en système pQE30.

## **4- Immunoprécipitation**

Aux protéines radiomarquées, en SDS 2% (100 µl), sont ajoutés 5,8 volumes de TNTE et 10 µl de sérum de lapin, en présence d'aprotinine. Le contact a lieu avec agitation douce durant 1h à température ambiante, après lequel sont ajoutés 25 µl de billes de protéines G (Gamma Bind Sepharose, Amersham), équilibrée en TNSTE. Le contact entre immun-

complexes se prolonge durant 2 h, à température ambiante, en agitation douce. Les billes sont ensuite lavées trois fois en TNSTE, trois fois en TN, puis trois fois en Tris. Les immun-complexes sont élués par 25 µl de tampon d'échantillon pour SDS-PAGE, 3' à 100°C. Les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE et le gel soumis à autoradiographie.

TNSTE : Tris 5 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM ; SDS 0,3% ; Tritonx100 1,7% ; EDTA 2 mM.

TNTE : Tris 5 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM ; Tritonx100 2% ; EDTA 2 mM.

TN : Tris 5 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM.

### **5- Liaison aux mono- et polysaccharides**

Fixation des sucres sur plaque de polystyrène d'après la technique de Hatakeyama *et al* (1996). Les puits d'une plaque de 96 puits (Nunc) sont traités par 300 µl de divinylsulfone, 5% en CaCO<sub>3</sub> 0,5 M pH 11, 1 h à température ambiante, suivi d'un lavage au tampon carbonate. Les sucres sont fixés covalamment par incubation d'une nuit, de solutions à 10% (w/v) en tampon carbonate, à température ambiante. Les sites vinyl libres sont bloqués par une solution de Tris 1 M pH 11, 1 h. Après rinçage en TBS, les puits sont saturés par une incubation de TBS/BSA 3%, 2 h à température ambiante.

La protéine recombinante issu de l'expression en baculovirus est incubée dans les puits traités, 2 h à température ambiante. La quantité de protéine utilisée par essai est légèrement supérieure au seuil de détection par Western Blot.

## **V PURIFICATION ET PREPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES**

### **1- ADN génomique**

Mollusque : L'ADN génomique de *Biomphalaria glabrata* est préparé à partir de mollusques entiers. Les corps sont extraits de la coquille et broyés dans l'azote liquide.

Cellule Bge : Les cellules Bge sont lavées et centrifugées deux fois en TBS froid ; les cellules sont lysées par une succession de congélation-décongélation.

Culot cellulaire ou broyat de mollusques sont suspendus dans 10 volumes de tampon d'extraction : EDTA 0,5 M pH 8 ; sarcosyl 0,5% ; protéinase K 100 µg/ml. Le mélange est laissé en contact 3 h à 50°C, puis subit trois extractions au phénol, suivie d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique. Après traitement à la RNase 3 h à 37°C, l'ADN génomique est enroulé sur une bague de verre, par précipitation par 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M

pH 4,8, éthanol 100%. L'ADN est ensuite lavée deux fois à l'éthanol 70% et resuspendu en TE.

## **2- ARN**

L'ARN total est préparé soit à partir de mollusques entiers broyés, soit directement à partir de culots de cellules Bge. Il est extrait selon la méthode à l'isothiocyanate de guanidium 4M et purifié par gradient de chlorure de césium (Chirgwin *et al*, 1978). L'ARN est ensuite précipité par 2,5 volume d'éthanol 100% et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2, puis resuspendu dans l'eau.

L'ARN polyA<sup>+</sup> est isolé par passage de l'ARN total sur colonne d'oligodT (cDNA synthesis kit, Pharmacia) selon le protocole préconisé par le kit.

Pour les expériences de PCR semi-quantitatives, l'ARN total des cellules Bge est préparé à l'aide du kit RNAeasy (Quiagen).

## **3- ADN complémentaire**

L'ADNc premier brin est réalisé à partir d'1 µg d'ARN total de mollusque ou de cellules Bge. L'ARN est dénaturé en présence de 500 ng d'oligodT, 10' à 70°C. Sont ajoutés le tampon de Reverse Transcriptase (50 mM Tris pH 8,3 ; 75 mM KCL ; 3m M MgCl<sub>2</sub>), 10 mM DTT et 1 mM dNTP. Après 2' à 42°C, la Superscript<sup>TM</sup>II Reverse Transcriptase (GibcoBRL) est ajoutée pour une incubation de 50' à 42°C. La réaction est arrêtée par chauffage 15' à 70°C.

Dans le cas des PCR semi-quantitatives, le taux d'ADNc synthétisé est estimé : pour cela, 2,5µl de la réaction est effectuée en présence de 2µCi de <sup>32</sup>P-dCTP. A la fin de la réaction, les produits sont précipités à l'acide trichloroacétique 5%, la radioactivité incorporée est mesurée par compteur à scintillation liquide.

# **VI CONDITIONS DE PCR**

## **1- Amorces**

Amorces dégénérées construites selon le domaine lectine des sélectines humaines :

"sel1" 5'-YTAGTIGCIATICARAA YAAR-3' (sens)

"sel2" 5'-TATTAYTGGATIGGTATHMG-3' (sens)

"sel3" 5'-TTYTGICKRTRTTIGGYTC-3' (antisens)

"sel4" 5'-GCIGTRTAACAHARWGC-3' (antisens)

avec I=Inositol. Y=C,T. R=A,G. H=A,T,C. M=A,C. K=G,T. W=A,T.

Amorces choisies dans BgSel :

"PAS1" 5'-CTACAGTCGGTGTAACCACACTGCTCAG-3' (sens)

"PAS2" 5'-CTGTGGCTATAACGCCAGGTGTTACCG-3' (antisens)

"PAS3" 5'-CATCCAGTGAGTTAGTGAGACCAACG-3' (antisens)

"PAS4" 5'-GTTGACTACGTGTGCAAAGACACTGTG-3' (antisens)

"PAS5" 5'-CGTTGGTCTCACTAACTCACTGGATG-3' (sens)

"PAS6" 5'-TCAACAGGATCCAACAGCTATTTTCTATCCAAGGAG-3' (sens)

"PAS7" 5'-CATTGGGTCGACAAATTCACACAAAGCATAAACTG-3' (antisens)

"PAS8" 5'-CTAGCTAGGTCGACTTAAACGTAAAGTGAATCTGAA-3' (antisens)

## **2- Réactions**

Les PCR sont réalisées avec la Taq DNA polymérase (PROMEGA) en présence de :  
amorces 20 pmoles, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP 200 µM, volume réactionnel 50 µl.

### **PCR sur ADN génomique avec les amorces "Sel" :**

Matrice 1 µg

94°C 5'

dénaturation 1' 94°C - hybridation 1' 48°C - élongation 1' 72°C - 35 cycles.

72°C 5'.

### **PCR sur ADN génomique et ADNc avec les amorces "Pas" :**

94°C 5'

dénaturation 1' 94°C - hybridation 1' 60°C - élongation 1' 72°C - 35 cycles.

72°C 5'.

### **PCR pour Marathon**

1<sup>o</sup> série:

94°C 5'

dénaturation 94°C 1' - hybridation 60°C 30" - élongation 68°C 2' - 30 cycles.

68°C 5'.

2<sup>e</sup> série:

94°C 5'

dénaturation 94°C 1' - hybridation 55°C 1' - élongation 72°C 1' - 35 cycles.

72°C 5'.

### **3- PCR semi-quantitatives**

La quantité d'ADN est ajustée, selon les résultats obtenus par l'incorporation de <sup>32</sup>PdCTP lors de la synthèse des ADNc, pour que chaque essai présente la même quantité de matrice. Les amorces utilisées sont PAS1 et PAS2. Les PCR sont réalisées avec la Taq Gold (Promega).

Conditions :

94°C 10'

dénaturation 94°C 1' – hybridation 55°C 1' – élongation 72°C 1' - 45 cycles

72°C 5'

A partir du 20<sup>ème</sup> cycle, tous les 5 cycles 15 µl de réaction sont prélevés. 5µl du produit PCR final sont analysés sur gel d'agarose afin de vérifier la présence d'un produit unique à la taille attendue. Les produits PCR sont analysés par Dot-Blot et hybridation par un oligonucléotide radiomarqué.

### **4- Purification et sous-clonage des produits**

Les produits d'amplification par PCR sont examinés sur gel d'agarose et découpés du gel pour être purifiés sur billes échangeuses d'ions (Jetsorb, Genomed).

Le sous-clonage des produits PCR s'effectue en vecteur pCR<sup>TM</sup>II (TA Cloning, Invitrogen). La ligation entre plasmide et inserts s'effectue sur la nuit à 16°C, en présence de T4 DNA Ligase (Promega). L'amplification des plasmides se déroule chez *E.coli* JM109.

## **VII CRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADNc**

La souche bactérienne *E.coli* XL1 Blue (MRF') est mise en culture en milieu LB supplémenté par du MgSO<sub>4</sub> 10 mM et du maltose 0,2%, à 37°C, jusqu'à une DO<sub>600</sub> de 0,6.

Après centrifugation le culot bactérien est suspendue dans un demi-volume initial de  $MgSO_4$  10 mM.

$2,5 \cdot 10^5$  bactériophages sont mis en contact avec 600  $\mu$ l de bactéries compétentes, à 37°C 15', sous agitation douce. Les phages et bactéries sont ensuite coulés dans du "top NZY" sur boîte NZY de 150 mm, de façon à avoir 50000 pfu/boîte (20 boîtes). Après 6-8h à 37°C, les plages de lyse sont récupérés par empreintes sur filtre de nitrocellulose. Les filtres sont dénaturés 2' en NaCl 1,5 mM; NaOH 0,5 M, neutralisés 5' en NaCl 1,5 M ; Tris-HCl pH 8, et rinçés en Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 ; SSCx2. Les acides nucléiques sont ensuite fixés sous U.V. (1,5 J/cm<sup>2</sup>). Les membranes de nitrocellulose sont préhybridées en SSC6x, Denhardt's 5x, SDS 0,1%, ADN de sperme de hareng 500 $\mu$ g/ml, 2h à 65°C. La sonde radiomarquée est ensuite ajoutée. Après une nuit d'hybridation à 65°C, les membranes sont lavées en SSCx0,1 ; SDS 0,1% à 65°C. Les clones positifs sont révélés par autoradiographie.

Chaque plage de lyse positive est récupérée et placée dans 1 ml de SM contenant 10  $\mu$ l de chloroforme. Ces clones positifs subissent encore deux nouveaux criblages, comme décrit ci-dessus.

Les clones  $\lambda$ ZAP positifs isolés à l'issu des trois criblages subissent l'excision de leur phagemide pBluescript, à l'aide d'un phage "helper" ExAssit<sup>TM</sup> dans la souche *E.coli* SOLR<sup>TM</sup> selon le protocole préconisé par le manuel "ZAP-cDNA synthesis kit" (Stratagene).

Les différents clones pBluescripts obtenus sont séquencés.

## **VIII MARQUAGE DES SONDAS RADIOACTIVES**

Les fragment d'ADN (50 ng) sont marquée à l' $\alpha^{32}P$ -dCTP par la technique de "random priming" (kit Megaprime, Pharmacia). Les nucléotides radiomarqués non incorporés sont récupérés sur colonne de Sepharose G50.

La sonde oligonucléotidique est marqué au  $\gamma^{32}P$ -dATP par la T4 nucléotide kinase.

## **IX ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES**

### **1- Southern Blot**

L'ADN génomique de cellules Bge est digéré par les enzymes de restrictions EcoRI, BamHI et XhoI. La séparation des ADN se fait par électrophorèse en gel d'agarose 0,8 % préparé en TBE. Après électrophorèse, les ADN sont dénaturés par immersion du gel en NaCl

1,5 M, NaOH 0,5 N, durant 45', puis neutralisés en Tris 1 M pH 7,4, NaCl 1,5 M, durant 30'. Les ADN sont ensuite transférés par capillarité sur membrane de nylon (hybond-N+, Amersham) en tampon SSC10x, sur la nuit. Après rinçage de la membrane en SSC6x, les ADN sont ensuite fixés sous U.V. (1,5 J/cm<sup>2</sup>, membrane humide). La préhybridation se fait à 65°C (SSC6x, Denhardt's 5x, SDS 0,1%, ADN de sperme de hareng 500 µg/ml) durant 3 h ; la sonde radiomarquée, dénaturée, est ensuite ajoutée, et l'incubation se poursuit sur la nuit.

Après l'hybridation, la membrane subit une série de lavages: 2x15 min. en SSC2x, SDS 0,1% à 65°C, puis 1x15' SSC1x, SDS 0,1% à 65°C, suivi de 1x15' SSCx0,2 à température ambiante. La révélation s'effectue par autoradiographie.

Les produits de PCR semi-quantitatives sont analysés en dot-blot. Le volume des réactions est ajusté à 100 µl en TE. Sont ajoutés 6 µl d'EDTA 0,5 M et 8 µl de NaOH 6 N pour la dénaturation 10' dans la glace. Après neutralisation par 115 µl de NH<sub>4</sub>OAc 2 M, les échantillons sont chargés dans l'appareil à dot-blot. Au préalable a été installée la membrane de nitrocellulose, humidifiée par NH<sub>4</sub>OAc 1 M. Après lavage par 200 µl NH<sub>4</sub>OAc 1 M, la membrane est lavée en SSC6x puis séchée. L'ADN est fixé sous U.V.(0,15 J/cm<sup>2</sup>). La préhybridation a lieu à 42°C 2h, en SSC6x, Denhardt's 5x, SDS 0,1%, ADN de sperme de hareng 500 µg/ml. La sonde est ajoutée, l'hybridation se poursuit sur la nuit à 42°C. La membrane est lavée 15' à température ambiante, en SSCx6 ; SDS 0,1%, puis 15' à 55°C en SSCx6 ; SDS 0,1%.

## **2- Northern Blot**

Les ARN sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose/formaldéhyde 1% (agarose 0,5 g, 5 ml de MOPS 10X, 2,7 ml de formaldéhyde, qsp 50 ml H<sub>2</sub>O). Les ARN sont ensuite transférés sur membrane de nylon chargé (hybond-N+, Amersham) par capillarité en tampon SSC10x, sur la nuit. Après transfert, la membrane est rincée en SSC6x, puis les ARN sont fixés au nylon par irradiation aux rayons U.V. (1,5 J/cm<sup>2</sup>, membrane humide).

La préhybridation se fait à 65°C (SSC6x, Denhardt's 5x, SDS 0,1%, ADN de sperme de hareng 500 µg/ml) durant 3 h ; la sonde radiomarquée, dénaturée, est ensuite ajoutée, et l'incubation se poursuit sur la nuit. Après l'hybridation, la membrane subit une série de lavages: 2x15' en SSC2x, SDS 0,1% à 65°C, puis 1x15' SSC1x, SDS 0,1% à 65°C. La révélation s'effectue par autoradiographie (exposition 1 mois).

MOPS 10X: MOPS 0,2 M pH 7, Acétate de Sodium 80 mM, EDTA 10 mM pH 8, qsp 1L.

### **3- Séquencage**

Le séquencage a lieu à partir d'amorces spécifiques du vecteur de sous-clonage ("Universal et Reverse primers").

Les réactions de séquence se réalisent suivant la méthode de Sanger, à l'aide du kit de séquencage "Terminator Reaction Cycle Sequencing Ready"(ABI Prism, Perkin Elmer, Applied Biosystems), et sont analysées par un séquenceur automatique ABI 377 (Perkin Elmer).

## **X TRANSFORMATION BACTERIENNE**

Les souches bactériennes JM109 (pour vecteur de clonage) et M15, BL21(pour vecteur d'expression), sont cultivées pendant une nuit en milieu LB. Les cultures sont diluées au 1/100e dans 15 ml de milieu SOB et mises sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO<sub>550</sub> de 0,45. Après centrifugation, le culot est repris dans 2 ml de TFB. Sont ajoutés successivement 84 µl de DMSO, 84 µl de DTT et enfin 84 µl de DMSO en prenant la précaution de placer la culture sur glace entre chaque étape.

210 µl de bactéries compétentes sont mis en contact avec le plasmide et laissés sur glace pendant 30'. Un choc thermique de 2' à 42°C puis de 2' sur glace assure la transformation des bactéries. Après adjonction de 800 µl de SOC et une heure de culture à 37°C, les bactéries sont étalées sur boîtes LB en présence d'antibiotiques. Dans le cas des JM109 la présence d'IPTG et d'Xgal dans le milieu permet la sélection des clones positifs, par expression de la  $\beta$ -galactosidase.

L'ADN plasmidique est préparé à partir de culture bactérienne et purifié sur colonne Nucleobond Ax (Macherey-Nagel).

## **XI EXPRESSION DE PROTEINES RECOMBINANTES**

### **1- Expression en pQE30**

Le plasmide pQE30 contient un codon d'initiation, suivi de la séquence 6xHis, en amont du site de clonage, ainsi qu'un codon de terminaison dans les trois cadres de lecture en aval de ce site. L'expression dans le vecteur pQE30 est sous la dépendance du plasmide pREP4 qui

porte le gène *lacI* codant pour le répresseur *lac*. L'expression est donc induite par l'addition d'IPTG qui inactive le répresseur, libérant ainsi le promoteur du plasmide pQE30.

Deux amorces ont été synthétisées pour le sous clonage en pQE30 :

"Pas6" 5'-TCAACAGGATCCAACAGCTATTTTCTATCCAAGGAG-3' (sens)

"Pas7" 5'-CATTGGGTCGACAAATTCACACAAAGCATAAAACTG-3' (antisens)

Les sites de restriction de BamHI (Pas6) et Sall (Pas7) sont soulignés.

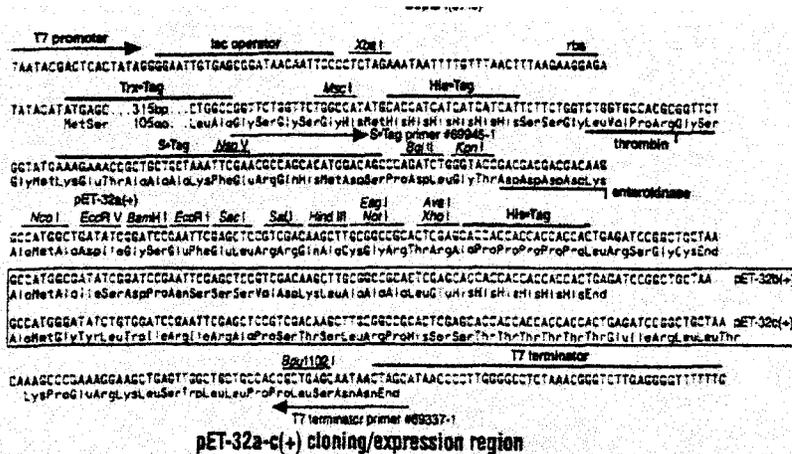
La production et la purification de la protéine recombinante sont réalisés selon le protocole décrit par le "QIAexpress system" (Quiagen). Le clonage du plasmide recombinant s'effectue chez la souche *E.coli* JM109 et l'expression de la protéine recombinante a lieu chez la souche *E.coli* M15.

La localisation cellulaire et la solubilité de la protéine sont examinées selon le protocole préconisé par le QIAexpress system. La protéine recombinante est purifiée sur une colonne de chélate chargée en ions Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA, Quiagen).

## **2- Expression en pET32**

La séquence d'intérêt clonée dans le plasmide pET32 est sous la dépendance du promoteur T7 ; l'expression s'effectue dans une souche bactérienne possédant une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7, sous contrôle du répresseur *lac*, expression induite par l'IPTG. La présence du promoteur T7 présente un double intérêt : d'une part il garantit que le gène d'intérêt n'est pas transcrit à l'état non induit, d'autre part l'ARN polymérase T7 est très sélective et très active ce qui permet une production importante de la protéine recombinante.

Le vecteur pET32 (**figure 48**) possède un domaine de fusion à la thioredoxine destiné à accroître la solubilité de la protéine d'intérêt dont le gène est cloné dans ce plasmide. Le plasmide pET32 présente un codon d'initiation (de la thioredoxine) suivie d'une séquence 6xHis en amont du site de clonage ; il possède également un codon stop dans les trois cadres de lecture.



**Figure 48 : Région de clonage du plasmide pET32a.**

La production et la purification de la protéine recombinante de fusion sont réalisés selon le protocole du "pET System Manual" (Novagen). Le clonage s'effectue chez la souche *E.coli* JM109, l'expression s'effectue dans la souche *E.coli* BL21.

**a- Expression du domaine lectine**

Deux amorces ont été synthétisée pour le sous-clonage en pET32:

"Pas6" 5'-TCAACAGGATCCAACAGCTATTTTCTATCCAAGGAG-3' (sens)

"Pas8" 5'-CTAGCTAGGTCGACTTAAACGTTAAGTGAATCTGAA-3' (antisens)

Les sites de restriction BamHI (PAS6) et SalI (PAS8) sont soulignés.

**b- Expression du clone BgSel en pET32**

A partir du clone isolé et excisé de la banque λZAPII de *B.glabrata*, l'insert BgSel est extrait du plasmide pBluescript, par coupures des enzymes BamHI et XhoI. Il est sous-cloné dans les trois vecteurs pET32, a, b et c, qui présentent trois cadres de lecture décalés.

**3- Expression en système eucaryote : baculovirus et cellules d'insectes**

**a- Cellules et milieu de culture**

L'expression de BgSel en système baculovirus est effectuée dans les cellules SF9. Ils s'agit de cellules adhérentes dérivées de la lignée IPLBSF-21 provenant du tissu ovarien de la pupe du lépidoptère *Spodoptera frugiperda*.

La culture cellulaire courante et la culture pour la préparation du stock de baculovirus s'effectuent en milieu de Grace (GibcoBRL) complétement par 10% de sérum de veau foetal (GibcoBRL). La culture en vue de l'expression et purification de la protéine de fusion se déroule en milieu X-Press (BioWhittaker). Le milieu X-Press (formulation confidentielle) est dépourvue de protéines, il contient du glucose comme source d'hydrate de carbone et ne nécessite pas d'apport de sérum.

Les SF9 sont cultivées à 27°C sans apport de CO<sub>2</sub>, leur densité double toutes les 24 h. Un repiquage par dilution au 1/5 dans du milieu frais a lieu lorsque le tapis cellulaire atteint la confluence.

### b- Construction du vecteur de co-transfection

Le vecteur choisi pour l'expression de BgSel chez les cellules d'insectes est le pAcSecG2T (figure 49). Il s'agit d'un vecteur d'expression de protéine en fusion avec la Glutathion S-tranférése. La séquence BgSel est insérée en aval de la région codant pour la GST au niveau du site SmaI. Le gène de la GST est précédé de la séquence signal gp67 pour permettre la sécrétion de la protéine de fusion.

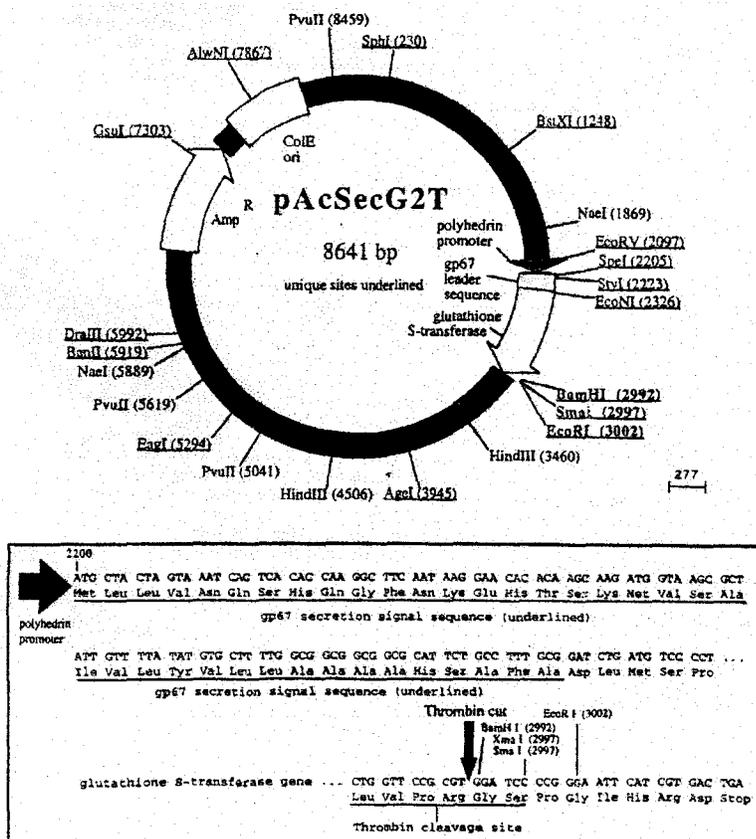


Figure 49 : Schéma du plasmide pAcSecG2T.

L'insert correspondant à BgSel est extrait du pBluescript provenant de la banque d'ADNc par digestion enzymatique avec SmaI et XhoI. L'extrémité cohésive due à la digestion par XhoI est complétée pour former un bout franc, par action de l'ADN polymérase "Klenow". Parallèlement le vecteur pAcSecG2T est linéarisé par coupure par SmaI. Après ligation, les plasmides recombinants sont propagés en *E.coli* JM109. Un clone positif est sélectionné pour produire le plasmide pAcSecG2T/BgSel. Le plasmide recombinant est séquencé afin de vérifier la conservation du cadre de lecture ouvert au niveau de la fusion entre la GST et BgSel.

#### c- Production du stock de baculovirus recombinant

La co-transfection de pAcSecG2T/BgSel et du baculovirus (Baculogold™) est opérée avec les cellules SF9 selon le protocole du manuel d'utilisation (Pharmingen). 0,5 µg d'ADN linéarisé de Baculogold est mis en présence de 3,5 µg de pAcSecG2T/BgSel, et sont co-transfectés sur un tapis de  $2 \cdot 10^6$  cellules SF9 par précipitation au phosphate de calcium. Après 4 h de contact, le surnageant est remplacé par du milieu frais. La production de particules virales recombinantes est vérifiée par l'observation de la morphologie des cellules. Après 5 j de cultures, le surnageant infectieux est utilisé (dilution 1/50<sup>e</sup>) pour infecter de nouvelles cellules. L'enrichissement en particules virales est réalisé par infections successives de cellules SF9 à partir de surnageant infectieux. Un stock de particules virales de titre élevé est nécessaire pour infecter les cellules dans des conditions optimales de MOI (multiplicity of infection = nb de virus.ml<sup>-1</sup>/nb de cellules), afin d'obtenir une production maximale de protéine de fusion. L'obtention d'une infection synchrone pour l'ensemble des cellules nécessite une MOI supérieure à 1. Afin de ne pas réduire trop rapidement le métabolisme des cellules d'insecte par l'activité lytique du virus, la MOI doit cependant rester inférieure à 10.

#### d- Titration du stock de baculovirus recombinant

La titration virale est réalisée par dilution "point-limite". Cette méthode statistique consiste en l'inoculation de plusieurs cultures cellulaires avec différentes dilutions virales. Le titre est estimé par détermination de la dilution qui permet d'infecter 50% des cultures (TCID50). Ce titre, en pfu (plaque forming unit)/ml, correspond au TCID50/ml affecté d'un facteur spécifique du couple virus/cellule hôte (0,69 pour le couple baculovirus/SF9). 10 µl de suspension cellulaire à  $2,5 \cdot 10^5$  cellules/ml sont déposés dans chaque puits d'une microplaque de Terazaki (Nunc). Le stock viral est dilué de  $10^{-3}$  à  $10^{-7}$  ; chaque dilution

permet d'infecter 6 puits. Après 6 j de culture, le nombre de puits infectés est comptabilisé pour procéder au calcul de la titration.

Titre (pfu/ml) =  $1/TCID_{50} \times 0,69 \times \text{volume (ml) de l'infection}$

Avec :  $\text{Log } TCID_{50} = \text{Log "dilution donnant plus de 50\% de puits infectés" - PD}$

PD : distance proportionnée par rapport à la concentration donnant 50% de puits infectés.  $PD = (A-50)/(A-B)$

A : pourcentage supérieur à 50% de puits infectés

B : pourcentage inférieur à 50% de puits infectés

Concentration virale	Pourcentage de puits infectés
$10^{-3}$	100
$10^{-4}$	100
$10^{-5}$	83
$10^{-6}$	50
$10^{-7}$	16

Titre du stock viral :  $6,9 \cdot 10^{6,5}$  pfu/ml.

#### e- Production et purification de GST/BgSel

Les cellules SF9, en milieu X-Press, sont infectées à partir du stock de baculovirus recombinant. La protéine de fusion est purifiée sur billes de Glutathion-Agarose (Sigma).

Après 3 j d'infection, cellules et surnageant sont récupérés. Les cellules sont lysées sur glace 2 h, en tampon de lyse. Surnageant de culture et lysat cellulaires sont centrifugés à 12000 g pendant 30'. Les surnageants de centrifugation sont chargés sur colonne de glutathion-agarose, préalablement équilibrée en tampon d'équilibration. La colonne est lavée par le même tampon jusqu'à obtention en sortie de colonne d'une  $DO_{280}=0,0$ . La protéine de fusion est éluée par le tampon d'éluion, en surveillant également la  $DO_{280}$ . L'éluat est récupéré avec 1/10 de volume de tampon d'équilibration pour assurer la neutralisation.

L'éluat est dialysé contre une solution Tris 2 mM pH 7,5, puis concentré par traitement à l'aquacide. Les produits récupérés sont analysés par SDS-PAGE et Western Blot.

Tampon de lyse : Tris 10 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; TritonX100 1%.

Tampon d'équilibration : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7 ; KCl 150 mM ; EDTA 1 mM.

Tampon d'éluion : glutathion 7 mM ; Tris 50 mM pH 9,1 ; DTT 0,1 mM.

## **XI ANTICORPS UTILISES**

### Anticorps I :

Anti E-sélectine : IgG1 de souris, clone BBIG-E4 (R&DSYSTEMS), utilisation 10 µg/ml.

Anti E/P-sélectine : IgG1 de souris, clone BBIG-E6 (R&DSYSTEMS), utilisation 10 µg/ml.

Anti L-sélectine : IgG1 de souris, clone 4G8 (R&DSYSTEMS), utilisation 10 µg/ml.

Anti P-sélectine : IgG1 de souris, clone LYP20, don du Dr McGregor, utilisation 10 µg/ml.

Anti CD15 : IgM de souris, clone 80H5 (Immunotech), utilisation 10 µg/ml.

Sérum de lapin anti-BgSel, 1/50°.

Sérum de rat anti domaine lectine de la P-sélectine humaine.

Sérum de rat anti P-sélectine humaine.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abdul-Salam JM**, Michelson EH (1980) *Biomphalaria glabrata* amoebocytes : effects of *Schistosoma mansoni* infection on *in vitro* phagocytosis. J Invertebr Pathol 35(3) :241-248.
- Adema CM**, van der Knaap WPW, Sminia T (1991) Molluscan haemocyte-mediated cytotoxicity : the role of reactive oxygen intermediates. Crit Rev Aquat Sci 4: 201-207.
- Adema CM**, Harris RA, van Deutekom-Mulder EC (1992) A comparative study of hemocytes from six different snails : morphology and functional aspects. J Invertebr Pathol 59(1) :24-32.
- Adema CM**, Arguello DF, Stricker SA, Loker ES (1994) A time-lapse study of interactions between *Echinostoma paraensei* intramolluscan larval stages and adherent hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Helix aspersa*. J Parasitol 80(5):719-727.
- Adema CM**, Loker. Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. In *Advances in Trematode Biology*. Fried B, Graczyk ed. CRC Press, New York, 1997
- Adema CM**, Hertel LA, Loker ES (1997a) Infection with *Echinostoma paraensei* (Digenea) induces parasite-reactive polypeptides in the hemolymph of the gastropod host *Biomphalaria glabrata*. In *Parasites pathogens : effects on host hormones and behavior*. ed Beckage N (Chapman & Hall, New-York) 76-98
- Adema CM**, Hertel LA, Miller RD, Loker ES (1997b) A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. Proc Natl Acad Sci USA 94 :8691-8698.
- Amen RI**, De Jong-Brink M (1992) *Trichobilharzia ocellata* infections in its snail host *Lymnaea stagnalis* :an *in vitro* study showing direct and indirect effects on the snail internal defence system, via the host central nervous system. Parasitology 105 :409-416.
- Arar C**, Carpentier V, Le Caer JP, Monsigny M, Legrand A, Roche AC (1995) ERGIC-53, a membrane protein of the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment, is identical to MR60, an intracellular mannose-specific lectin of myelomonocytic cells. J Biol Chem 270 : 3551-3553.
- Aroca E** (1997) Aspects moléculaire du développement du parasite *Schistosoma mansoni* chez son hôte intermédiaire *Biomphalaria glabrata* dans le modèle cellules Bge-sporocyste. Mémoire de DEA, Université de Lille II.

- Ataev GL, Fournier A, Coustau C (1998).** Comparison of *Echinostoma caproni* mother sporocyst development *in vivo* and *in vitro* using *Biomphalaria glabrata* snails and a *B. glabrata* embryonic cell line. J Parasitol 84(2) : 227-235.
- Bajorath J, Hollenbaugh D, King G, Harte W, Eustice DC, Darveau RP, Aruffo A (1994).** CD62/P-selectin binding sites for myeloid cells and sulfatides are overlapping. Biochemistry 33 : 1332-1339.
- Barbosa FS (1975)** Survival and cercaria production of Brazilian *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* infected with *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 61 : 151-152.
- Basch PF .** Schistosomes : development, reproduction and host relations. Oxford University Press. 1991.
- Baumheler S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA (1993).** Binding of L-selectin to the vascular sialomucin, CD34. Science 262 : 436-438.
- Bayne CJ (1990)** Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. BioSciences 40 :723-731.
- Bayne CJ, Buckley PM, De Wan PC(1980)** *Schistosoma mansoni* : cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in the plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol. 50 : 409-416
- Bayne CJ, Boswell CA, Loker ES, Yui MA (1985).** Plasma components which mediate cellular defences in the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. Dev Comp Immunol 9 :523-530.
- Bayne CJ, Yoshino TP (1989)** Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism. Amer Zool 29 :399-407.
- Belot J (1993)** Field trial to control schistosome intermediate host by molluscicide *Ambrosia maritima* L. in the Senegal river basin. Acta Tropica 52 :275-282.
- Bennet JL et al (1997)** The development of resistance to antihelminthics : a perspective with emphasis on the anti-schistosomal drug Praziquantel. Exp Parasitol 87 :260-267.
- Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC (1993).** L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MadCAM-1. Nature 366 : 695-698.
- Bergquist NR, Colley DG (1998)** Schistosomiasis vaccines : research to development. Parasitol Today 14(3) : 99-104.
- Bergwerff AA, Govert JVD, Rotmans JP, Deelder AM, Kamerling JP, Vliengenthart FG (1994)** The immunologically reactive part of immunopurified circulating anodic antigen from *Schistosoma mansoni* is a threonine-linked polysaccharide consisting of -

- 6 $\beta$ -D-GlcpA-(1-3))- $\beta$ -D-GalpNac-1- repeating units. J Biol Chem 269(50) : 31510-31517.
- Bevilacqua MP** (1993) Endothelial-leukocytes adhesion molecules. Annu Rev Immunol 11 :767-804.
- Bevilacqua MP**, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1 : an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. Science 243 : 1160-1168.
- Boswell CA**, Bayne CJ (1984) Isolation, characterization and functional assessment of a haemagglutinin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Dev Comp Immunol 8 :559-568.
- Boswell CA**, Bayne CJ (1985) *Schistosoma mansoni* :lectin-dependent cytotoxicity of hemocytes from susceptible host snails, *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol 60 :133-138.
- Bout D**, Joseph M, Pontent M, Vorng HD, Capron A (1986) Rat resistance to schistosomiasis : platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. Science 231 :153-156.
- Brown D**. Freshwater Snails of Africa : their Medical Importance. 2<sup>nd</sup> ed. Taylor & Francis, London, 1994.
- Capron A**, DeBlock A, Biguet J, Clay A, Adeniss L, Vernes A (1965) Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à *Schistosoma haematobium*. Bull. WHO, 32 : 755-778.
- Capron A**, Dessaint JP (1992) Survival strategies of parasites in their immunocompetent hosts. Adv Neuroimmun 2 :181-198.
- Capron M**, Kazatchkine MD, Fischer E, Joseph M, Butterworth AE, Kusnierz JP, Prin L, Papin JP, Capron A (1987). Functional role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. J Immunol 139 : 2059-2065.
- Carter OS**, Bogitsh BJ (1975) Histologic and cytochemical observations of the effects of *Schistosoma mansoni* on *Biomphalaria glabrata*. Ann N Y Acad Sci 266 : 380-393.
- Caulfield JP**, Yuan HC, Cianci CMI, Hein A (1988) *Schistosoma mansoni* : development of the cercarial glycocalyx. Exp Parasitol 65 : 10-19.
- Cheng TC** (1975) Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. Annals N. Y. Acad. Sci. 266 : 343-379.

- Cheng TC, Bier JW (1972)** Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. Parasitol. 64 : 129-141.
- Cheng TC, Yoshino TP (1976)** Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacterial lipids. J Invertebr Pathol 28: 143-146.
- Cheng TC, Chorney MJ, Yoshino TP (1977)** Lysozyme-like activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria. J Invertebr Pathol 29: 170-174.
- Cheng TC, Garrabrant TA (1977)** Acid phosphatase in granulocytic capsule formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. Int. J. Parasitol. 7(6) : 467-472.
- Cheng TC, Lie KJ, Heyneman D, Richards CS (1978)** Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda). J Invertebr Pathol 31: 57-62.
- Chernin E (1970)** Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. J. Parasitol. 56 : 287-296.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, McDonald J, Rutter WJ (1978)**. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochem 18 : 5294-5299.
- Combes C, Despres L, Estabiet D, Fournier A, Jourdane J, Mone H, Mor S, Théron A (1991)** *Schistosomatidae* (Trematoda); some views on their origin evolution. Res Rev Parasitol 51 :25-30.
- Connors VA, Yoshino TP (1990)** *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 76 :895-902.
- Connors VA, Lodes MJ, Yoshino TP (1991)** Identification of a *S.mansoni* sporocyst excretory-secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *B.glabrata* hemocytes. J Invertebr Pathol 58: 387-395.
- Couch L, Hertel L, Loker ES (1990)** Humoral response of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection : observations on a circulating hemagglutinin. J Exp Zool 255 :340-349.
- Coustau C, Ataev G, Jourdane J, Yoshino TP (1997)**. *Schistosoma japonicum* : *in vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. Exp Parasitol 87 : 77-87.
- Crews AE, Yoshino TP (1989)** *Schistosoma mansoni* : effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol 68(3) : 326-334.
- Cummings RD, Nyame AK (1996)** Glycobiology of schistosomiasis. FASEB J 10 : 838-848.

- Dam TK**, Bandyopadhyay P, Sarkar M, Ghoshal J, Bhattacharria A, Choudhury A (1994) Purification and partial characterization of a heparin-binding lectin from the marine clam *Anadara granosa*. Biochem Biophys Res Commun 203 :36-45.
- Damian RT** (1987) Molecular mimicry revisited. Parasitol Today 3 :263-269.
- Daniel BE**, Preston TM, Southgate VR (1992) The *in vitro* transformation of the miracidium to the mother sporocyst of *Schistosoma margrebowiei* ; changes in the parasite surface and implications for interactions with snail plasma factors. Parasitology 104 :41-49.
- Davids BJ**, Yoshino TP (1998) Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes. Dev Comp Immunol 22(1):39-53.
- DeBose-Boyd R**, Nyame AK, Cummings RD (1996) *Schistosoma mansoni* : charaterization of an  $\alpha$ 1-3 fucosyltransferase in adults parasites. Exp Parasitol 82 : 1-10.
- deCaro AM**, Bonicell JJ, Rouimi P, deCaro JD, Sarles H, Rovey M (1987) Complete amino acid sequence of an immunoreactive form of human pancreatic stone protein isolated from pancreatic juice. Eur J Biochem 168 :201-207.
- De Jong-Brink M** (1992) Interference of schistosomes parasites with neuroendocrine mechanisms in their snail host causes physiological changes. Adv Neuroimmun 2 :199-223.
- De Jong-Brink M** (1995) How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts. Adv Parasitol 35 :177-256.
- De Jong-Brink M**, Elsaadany M, Soto MS (1991) The occurrence of schistosomine, an antagonist of female gonadotropic hormones, is a general phenomenon in haemolymph of schistosome-infected freshwaters snail. Parasitology 103 :371-378.
- Dikkeboom R**, Bayne CJ, van der Knaap WPW, Tijnagel JMGH (1988) Possible role of reactive form of oxygen in *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnea stagnalis*. Parasitol Res 75 :148-154.
- Dissous C**, Grzych JM, Capron A (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. Nature 323 :443-445.
- Dissous C**, Torpier G, Duvaux-Miret O, Capron A (1990) Structural homology of tropomyosins from the human trematode *Schistosoma mansoni* and its intermediate host *Biomphalaria glabrata*. Mol Biochem Parasitol 43: 245-256.
- Doege KJ**, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y (1991) Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan,

- aggrecan :human-specific repeats, additional alternatively spliced forms. J Biol Chem 266 :894-902.
- Drickamer K** (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. J Biol Chem 263(20) :9557-9560.
- Drickamer K** (1991) Clearing up glycoproteins hormones. Cell 67 :1029-1032.
- Drickamer K** (1993a) Ca<sup>2+</sup>-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. Curr Opin Struct Biol 3 :393-400.
- Drickamer K** (1993b). Evolution of Ca<sup>2+</sup>-dependent animal lectins. Prog Nucl Acid Res Mol Biol 45 : 207-232.
- Drickamer K, Taylor ME** (1993) Biology of animal lectins. Annu Rev Cell Biol 9 :237-264.
- Drickamer K** (1995) Increasing diversity of animal lectins structures. Curr Opin Struct Biol 5 :612-616.
- Duvaux-Miret O, Stefano GB, Smith EM, Dissous C, Capron A** (1992) Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. Proc Natl Acad Sci USA 89 :778-781.
- El Ridi R, Velupillai P, Harn DA** (1996) Regulation of schistosome egg granuloma formation : host soluble L-selectin enters tissue-trapped eggs and binds to carbohydrate antigens on surface membranes of miracidia. Infect Immun 64(11) : 4700-4705.
- Erasmus DA** . "The biology of trematodes". New York. Crane, Russak, 1972.
- Erbe DV, Wolitzky BA, Presta LG, Norton CR, Ramos RJ, Burns DK, Rumberger JM, Rao BNR, Foxall C, Brandley BK, Lasky LA** (1992). Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. J Cell Biol 199 : 215-227.
- Erbe DV, Watson SR, Presta LG, Wolitzky BA, Foxall C, Brandley BK, Lasky LA** (1993). P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. J Cell Biol 120 : 1227-1235.
- Etges FJ, Carter OS, Webbe G** (1975) Behavioral and developmental physiology of schistosome larvae as related to their molluscan hosts. Ann. N. Y. Acad. Sci. 266 : 480-496.
- Fallon PG, Tao LF, Ismail MM, Bennet JL** (1996) Schistosome resistance to Praziquantel : fact or artifact ? Parasitol Today 12(8) :316-319.
- Ferreira TM, Medeiros MG, Dietrich CP, Nader HB** (1993). Structure of heparan sulfate from the freshwater mollusc Anomantidae sp : sequencing of its disaccharide units. Int J Biochem 25(9) : 1219-1225.

- Fiedler K, Simons K** (1994) A putative novel class of animal lectins in the secretory pathway homologous to leguminous lectins. Cell 77 : 625-626.
- Fournier A, Théron A** (1985) Sectorisation morphoanatomique et fonctionnelle du sporocyste fils de *Schistosoma mansoni*. Zeitschrift für Parasitenkunde 71 : 325-336.
- Franceschi C, Cossarizza A, Monti D, Ottaviani E** (1991) Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda pulmonata) : implications for the evolution of natural killer cells. Eur J Immunol 21 :489-493.
- Fryer SE, Bayne CJ** (1989) Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) : a strain-specific, time-dependent process. Parasit Immunol 11 :269-278.
- Fryer SE, Bayne CJ** (1996) Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components. Dev Comp Immunol 20(1): 23-27.
- Fryer SE, Hull CJ, Bayne CJ** (1989) Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate specificity of hemocyte receptors and a plasma opsonin. Dev Comp Immunol 13(1):9-16.
- Fuhlendorff J, Clemmensen I, Magnusson S** (1987) Primary structure of tetranectin, a plasminogen kringle 4 binding plasma protein : homology with asialoglycoprotein receptor and cartilage proteoglycan core protein. Biochemistry 26 :6757-6764.
- Gerhardus MJT, Baggen JMC, Van der Knaap WPW, Sminia T** (1991) Analysis of surface carbohydrates of *Trichobilharzia ocellata* miracidia and sporocysts using lectin binding techniques. Parasitology 103 : 51-59.
- Gibson DI** (1987) Questions in digenean systematics and evolution. Parasitology 95 :429-460.
- Gibson DI, Bray RA** (1994) The evolutionary expansion and host-parasite relationships of the Digenea. Int J Parasitol 24 :1213-1226.
- Giga Y, Ikai A, Takahashi K** (1987) The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. J Biol Chem 262(13) :6197-6203.
- Granath WO, Aspevig JE** (1993) Comparison of hemocytes from *Schistosoma mansoni* (Trematoda)-susceptible resistant *Biomphalaria glabrata* (gastropoda) that cross-react with larval schistosome surface proteins. Comp Biochem Physiol 104B(4) :675-680.
- Granath WO, Yoshino TP** (1984) *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in vector snail, *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol 58: 188-193.

- Granath WO**, Yoshino TP (1983) Lysosomal enzyme activities in susceptible and refractory strains of *Biomphalaria glabrata* during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 69 :1018-1026.
- Granath WO**, Connors VA, Tarleton RL (1994) Interleukin 1 activity in haemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: presence, differential expression and biological function. Cytokine 6(1): 21-27.
- Graves BJ**, Crowther RL, Chandran C, Rumberger JM, Li S, Huang KS, Presky DH, Familletti PC, Wolitzisky BA, Burns DK (1994). Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. Nature 367 : 532-538.
- Grinnel BW**, Hermann RB, Yann SB (1994) Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion : role of unique fucosylated oligosaccharide. Glycobiology 4 : 221-225.
- Haas W**, Haberl B, Kalbe M et Körner M (1995). Snail-host-finding by miracidia and cercariae : Chemical host cues. Parasitol. Today 11(12) 468-472.
- Hammond C**, Braakman I, Helenius A (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 913-917.
- Hansen EL** (1973) Progeny-daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*. International J. Parasitol. 3 : 267-268.
- Hansen EL** (1976a) A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata) : establishments and characteristics. In : Maramorosch K (Ed) Invertebrate tissue culture: research applications. Academic Press, New York, pp75-97.
- Hansen EL** (1976b) Application of tissue culture of a pulmonate snail to culture of larval *Schistosoma mansoni*. In : Maramorosch K (Ed) Invertebrate tissue culture: research applications. Academic Press, New York, pp87-97.
- Haq S**, Kubo T, Kurata S, Kobatyashi A, Natori S (1996) Purification, characterization and cDNA cloning of a galactose-specific C-type lectin from *Drosophila melanogaster*. J Biol Chem 271(33) : 20213-20218.
- Harris RA**, Preston TM, Southgate VR (1993) Purification of an agglutinin from the haemolymph of the snail *Bulinus nasutus* and demonstration of related proteins in other *Bulinus* spp. Parasitology 106:127-135.
- Hart GW**, Holt GD, Haltiwanger RS (1988) Nuclear and cytoplasmic glycosylation : novel saccharide linkages in unexpected places. Trends Biochem Sci 13 : 380-384.

- Hatakeyama T**, Kohzaki H, Nagatomo H, Yamasaki N (1994) Purification and characterization of four Ca<sup>2+</sup>-dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. J Biochem 116 :209-214.
- Hatakeyama T**, Murakami K, Migamoto Y, Yamasaki N (1996). An assay for lectin activity using microtiter plate with chemically immobilized carbohydrates. Ana Biochem 237(1) : 188-192.
- Hertel LA**, Stricker SA, Monroy FP, Wilson WD, Loker ES (1994) *Biomphalaria glabrata* hemolymph lectins : binding to bacteria, mammalian erythrocytes, and to sporocysts and rediae of *Echinostoma paraensei*. J Invertebr Pathol 64 :52-61.
- Hickstein DD**, Locksley RM, Beatty PG, Smith A, Stone DM, Root RK (1986) Monoclonal antibodies binding to human neutrophil C3bi receptor have disparate functional effects. Blood 67 : 1054-1062.
- Himeshima T**, Hatakeyama T Yamasaki N (1994) Amino acid sequence of a lectin from the sea cucumber, *Stichopus japonicus*, its structural relationship to the C-type animal lectin family. J Biochem 115 :689-692.
- Hirabayashi J**, Satoh M, Kasai K (1992) Evidence that *Caenorhabditis elegans* 32 kDa  $\beta$ -galactoside-binding protein is homologous to vertebrate  $\beta$ -galactoside-binding lectins. J Biol Chem 267 :15485-15490.
- Hoek RM**, Smit AB, Frings H, Vink JM, de Jong-Brink M, Geraerts WPM (1996) A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from *Lymnea stagnalis*, is down-regulated during parasitosis. Eur J Immunol 26:939-944.
- Hokke CH**, Neeleman AP, Koeleman CA, Van den Eijden DH (1998) Identification of an  $\alpha$ 3-fucosyltransferase and a novel  $\alpha$ 2-fucosyltransferase activity in cercariae of the schistosome *Trichobilharzia ocellata* : biosynthesis of the Fuc $\alpha$ 1-2Fuc $\alpha$ 1-3(GalNac $\beta$ 1-4)GlcNac sequence. Glycobiology 8(4) : 393-406.
- Hollenbaugh D**, Bajorath J, Stenkamp R, Aruffo A (1993). Interaction of P-selectin (CD62) and its cellular ligand : analysis of critical residues. Biochemistry 32 : 2960-2966.
- Horák P** (1995) Developmentally regulated expression of surface carbohydrate residues on larval stages of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati*. Folia Parasitologica 42 : 255-265.
- Horák P**, Mikeš L (1995) Cercarial surface saccharides of six trematodes species from the pond snail, *Lymnea stagnalis*. Parasite 2: 419-421.

- Horák P**, Van der Knaap WPW (1997) Lectins in snail-trematode immune interactions : a review. Folia Parasitologica 44 :161-172.
- Hordijk PL**, Schallig HDFH, Ebberink RHM, De Jong-Brink M, Joosse J (1991) Primary structure origin of schistosomin, an anti-gonadotropic neuropeptide of the snail *Lymnea stagnalis*. Biochem J 279 :837-842.
- Houchins JP**, Yabe T, McSherry c, Bach FH (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA encoding typeII integral membrane protein on human natural killer cells. J Exp Med 173 : 1017-1020.
- Ii M**, Kurata H, Itoh N, Yamashima I, Kawasaki T (1990) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding the macrophage lectin specific for galactose N-acetylgalactosamine. J Biol Chem 265 :11295-11298.
- Imhof BA**, Dunon D (1995) Leukocyte migration and adhesion. Adv Immunol 58 : 345-360.
- James SL**, Sher A (1990) Cell-mediated immune response to schistosomiasis. Curr Top Microbiol Immunol 155 : 21-31.
- Johnston DA**, Kane RA, Rollinson D (1993) Small subunit (18S) ribosomal RNA gene divergence in the genus *Schistosoma*. Parasitology 107:147-152.
- Johnston LA**, Yoshino TP (1996) Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Parasitology 112 : 469-479.
- Jomori T**, Natori S (1991) Molecular cloning of cDNA for lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the american cockroach, *Periplaneta americana*. J Biol Chem 266(20) :13318-13323.
- Jourdane J** (1980) Distribution binomiale des probabilités d'infestation du mollusque dans le couple *Schistosoma mansoni*-*Biomphalaria glabrata*. Halictis 10 :74.
- Jourdane J** (1982) Etude des mécanismes de rejet dans les couples mollusque-schistosome incompatibles à partir d'infections par voie naturelle et par transplantations microchirurgicales de stades parasitaires. Acta Tropica 39, 325-335.
- Jourdane J**, Southgate VR (1992) Genetic exchanges and sexual interactions between species of the genus *Schistosoma*. Res Rev Parasitol 52:21-27.
- Jourdane J**, Théron A (1987) Larval development : eggs to cercariae. In : « The biology of schistosomes » Rollinson D. et A. J. G. Simpson eds. New York Academic Press 83-113.
- Jourdane J**, Xia M (1987) The primary sporocyst stage in the life cycle of *Schistosoma japonicum* (Trematodes : Digenea) Trans. Am. Microsc. Soc. 106 (4) : 364-372.

- Kamiya H**, Muramoto K, Goto R, Sakai M, Endo Y, Yamazaki M (1989) Purification and characterization of an antibacterial and antineoplastic protein of a sea hare, *Aplysia juliana*. Toxicon 27(12): 1269-1277.
- Kasai K**, Hirabayashi J (1996) Galectins :a family of animal lectins that decipher glycodes. J Biochem 119 :1-8.
- Kawasaki T**, Ashwell G (1977) Isolation and characterization of an avian hepatic binding protein specific for N-acetylglucosamine-terminated glycoproteins. J Biol Chem 252 :6536-6543.
- Kechemir N**, Combes C (1982) Développement du trématode *Schistosoma haematobium* après transplantation microchirurgical chez le gastropode *Planorbarius metidjensis*. CR Acad Sci Paris 295:505-508.
- Khoo KH**, Sarda S, Xu X, Caulfield JP, McNeil MR, Homans SW, Morris HR, Dell A (1995) A unique multifucosylated -3GalNac beta 1-4GlcNac beta 1-3Gal alpha 1-motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem 270(29) : 17114-17123.
- Kilpatrick JM**, Volanakis JE (1985) Opsonic properties of C-reactive protein. Stimulation by phorbol myristate acetate enables human neutrophils to phagocytize C-reactive protein coated cells. J Immunol 134 :3364-3370.
- Kinoti GK** (1971) The attachment and penetration apparatus of the miracidium of *Schistosoma*. J. Helminth. 14 : 229-235.
- Kjellen L**, Lindahl U (1991) Proteoglycans : structure and interactions. Annu Rev Biochem 60 :443-475.
- Klein J** (1989) Are invertebrates capable of anticipatory immune response? Scand J Immunol 29 : 499-505.
- Knibbs RN**, Osborne SE, Glick GD, Goldstein IJ (1993) Binding determinants of the sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. J Biol Chem 268(25) :18524-18531.
- Ko AI**, Dräger UC, Harn DA (1990) A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1. Proc Natl Acad Sci USA 87 : 4159-4163.
- Kölher P**, Voight WP. Nutrition and metabolism. In Parasitology in focus. Factors and Trends. H.Melhorn Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1988.
- Kornfeld S** (1992). Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors. Annu Rev Biochem 61 :307-330.

- Köster B**, Strand M (1994) *Schistosoma mansoni* : immunolocalization of two different fucose-containing carbohydrate epitopes. Parasitology 108 : 433-446.
- Laemli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685.
- Lardans V**, Boulo V, Duclermortier P, Serra E, Mialhe E, Capron A, Dissous C (1996). DNA transfer in a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line by DOTAP lipofection. Parasitol Res 82 : 574-576.
- Lardans V** (1997). Approche de la transformation génétique du gastéropode *Biomphalaria glabrata*, hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. Thèse de doctorat, Université de Lille.
- Lardans V**, Dissous C (1998) Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. Parasitol Today 14(10) : 413-417.
- Larson SE**, Andersen PL, Miller AN, Cousin CE, Richards CS, Lewis FA, Knight M (1996). Use of a RAPD-PCR to differentiate genetically defined lines of an intermediate host of *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 82(2) : 237-244.
- Lasky LA**, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Gimley C, Fennie C, Gillet N, Watson SR, Rosen SD (1992). An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. Cell 69(6) : 927-938.
- Lassere C**, Christa L, Simon MT, Vernier P, Brechot C (1992) A novel gene (HIP) activated in human primary liver cancer. Cancer Res 52 : 5089-5095.
- Laursen JR**, Yoshino TP (1999). *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports *in vitro* miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. Parasitology 118 : 187-194.
- Leung MK**, Dissous C, Capron A, Woldegaber H, Duvaux-Miret O, Pryor S, Stefano GB (1995) *Schistosoma mansoni* : presence and potential use of opiate-like substances. Exp Parasitol 81 : 208-215.
- Leverly SB**, Weiss JB, Salyan MEK, Roberts CE, Hakomori S, Magnani JL, Strand M (1992) Characterization of a series of novel fucose-containing glycosphingolipid immunogens from eggs of *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem 267 : 5542-5551.
- Lie KJ**, Jeong KH, Heyneman D (1981) Selective interference with granulocyte function induced by *Echinostoma paraensei* (Trematoda) larvae in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). J Parasitol 67(6) : 790-796.

- Lie KJ** (1982) Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. A discussion of the interference hypothesis. Trop Geogr Med 34 :111-117.
- Lodes MJ, Yoshino TP** (1989) Characterization of excretory-secretory proteins synthesized *in vitro* by *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. J Parasitol 75: 853-862.
- Lodes MJ, Yoshino TP** (1990) The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. J Invertebr Pathol 56 :75-85.
- Lodes MJ, Connors VA, Yoshino TP** (1991) Isolation and functional characterization of snail hemocyte-modulating polypeptides from primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 49 :1-10.
- Loker ES, Adema CM** (1995) Schistosomes, echinostomes and snails: comparative immunobiology. Parasitol Today 11 :120-124.
- Loker ES, Bayne CJ, Buckley PM, Kruse KT** (1982) Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 68(1) :84-94.
- Loker ES, Yui MA, Bayne CJ** (1984) *Schistosoma mansoni*: agglutination of sporocysts, formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol 58 :56-62.
- Loker ES, Boston ME, Bayne CJ** (1989) Differential adherence of M-line *Biomphalaria glabrata* hemocytes to *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* larvae, and experimental manipulation of hemocyte binding. J Invertebr Pathol 54 :260-268.
- Loker ES, Cimino DF, Hertel LA** (1992) Excretory-secretory products of *Echinostoma paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. J Parasitol 78(1) :104-115.
- Loker ES, Couch L, Hertel L** (1994) Elevated agglutination titers in plasma of *Biomphalaria glabrata* exposed to *Echinostoma paraensei*: characterization and functional relevance of a trematode-induced response. Parasitology 108 :17-26.
- Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F, Dobrina A** (1998). Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signalling receptors. J Cell Biol 142 : 1381-1390.
- Ludin C, Hofstetter H, Sargati M, Levy CA, Suter U, Alaimo D, Kilcherr E, Frost H, Delespesse G** (1987) Cloning expression of the cDNA coding for human IgE receptor. EMBO J 6 :109-114.

- Lukyanov SA** (1995) : Lectine type C, *Girardia tigrina*, Banque Swiss-Prot, N° d'accession 3063776.
- MacInnis AJ**, Bethel WH, EM Cornford EM (1974) Identification of chemicals of snail origin that attract *Schistosoma mansoni* miracidia. Nature 248 : 361-363.
- Malek EA** (1985) Snails host of schistosomiasis and other snail transmitted diseases in tropical america : a manual. Washington DC. Pan American Health Organization Scientific Publication 478 : 1-325.
- Mansour MH** (1995) Evidence for a family of schistosome glycan-binding lectins in *Biomphalaria alexrina*. Dev Comp Immunol 19(5) :365-376
- Mansour MH**, Negm HI, Hahim Saad A, Taalab NI (1995) Characterization of *Biomphalaria alexandrina*-derived lectins recognizing a fucosyllactose-related determinant on schistosomes. Mol Biochem Parasitol 69 :173-184.
- Mansour HM** (1996) Purification and characterization of SM37 : a fucosyllactose determinant-bearing glycoprotein probed by a *Biomphalaria alexandrina* lectin on adult male schistosomes. J Parasitol 82(4) :586-593.
- Marques ETAJr**, Weiss B, Strand M (1998). Molecular characterization of a fucosyltransferase encoded by *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 93 : 237-250.
- Mason PR**, Fripp PJ (1977) Chemical stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidial activity. Zeitschrift für Parasitenkunde 53 : 287-295.
- Meester I**, Ramkena MD, Van Minnen J, Boer HH (1992) Differential expression of four genes encoding molluscan insulin-related peptides in the central nervous system of the pond snail *Lymnea stagnalis*. Cell Tissue Res 269 : 183-188.
- Meier M**, Meier-Brook C (1981) *Schistosoma mansoni* : effect on growth, fertility, and development of distal male organs in *Biomphalaria glabrata* exposed to miracidia at different ages. Z Parasitenkd 66(2) : 121-131.
- Meuleman EA** (1972) Host-parasite inter relationships between the freshwater pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and the trematode *Schistosoma mansoni*. Netherlands J. Zool. 22 : 355-427.
- Michelson EH**, Dubois L (1977) Agglutinins and lysins in the molluscan family Planorbidae :a survey of hemolymph, egg-masses, and albumen-gland extracts. Biol Bull 153 :219-227.

- Miller AD**, Ofori K, Lewis F, Knight M (1996). *Schistosoma mansoni* : use of a subtractive cloning strategy to search for RFLPs in parasite-resistant *Biomphalaria glabrata*. Exp parasitol 84 : 420-428.
- Moné M**, Combes C (1986) Analyse expérimentale de l'effet "decoy" (ou effet leurre) exercé par les Mollusques non cibles sur le système hôte-parasite *Biomphalaria glabrata* (Say,1818)-*Schistosoma mansoni* Sambon 1907. Acta Oecologica-Oecologica Applicata 7 : 281-286.
- Monteil JF**, Matricon-Gondran M (1993) Structural and cytochemical study of the hemocytes in normal and trematode-infected *Lymnea truncatula*. Parasitol Res 79:675-682.
- Monroy F**, Hertel LA, Loker ES (1992) Carbohydrate-binding plasma proteins from the gastropod *Biomphalaria glabrata* : strain specificity and the effects of trematode infection. Dev Comp Immunol 16 :355-366.
- Monroy F**, Loker ES (1993) Production of heterogenous carbohydrate-binding proteins by the host snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 79 :416-423.
- Moore CA**, Gelder SR (1985) Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca bivalvia) Trans Am Microsc Soc 104: 242-249.
- Moore KL**, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RC, Varki A, McEver RP (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. J Cell Biol 118 : 445-454.
- Mulder H**, Spronk BA, Schachter H, Neeleman AP, Van den Eijnden DH, De Jong-Brink M, Kamerling JP, Vliegthart JF (1995) Identification of a novel UDP-GalNac:GlcNac  $\beta$ -R  $\beta$ 1-4 N-acetylgalactosaminyltransferase from the albumen and the connective tissue of the snail *Lymnea stagnalis*. Eur J Biochem 227(1-2) : 175-185.
- Mullainadhan P**, Renwrantz L (1989) Comparative analysis of agglutinins from hemolymph and albumen gland of *Helix pomatia*. J Comp Physiol 159 :443-452.
- Muramoto K**, Kamiya H (1990) The amino acid sequences of multiple lectins of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* and its homology with animal lectins. Biochim Biophys Acta 1039 :42-51.
- Muta T**, Miyata T, Misumi Y, Tokunaga F, Nakamura T, Toh Y, Ikehara Y, Iwanaga S (1991) Limulus factor C : an endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. J Biol Chem 266(10) : 6554-6561.

- Nasu T**, Fukuda Y, Nagahira K, Kawashima H, Noguchi C, Nakanishi T (1997) Fucoidin, a potent inhibitor of L-selectin function, reduces contact hypersensitivity reaction in mice. Immunol Lett 59 : 47-55.
- Neeleman AP** (1996) Biosynthesis of oligosaccharide chains in the schistosome *Trichobilharzia ocellata* and the snail *Lymnea stagnalis*, and their role in parasite-snail interactions. PhD Thesis, Amsterdam University.
- Neeleman AP**, Van der Knaap WPW, Van den Eijnden DH (1994) Identification and characterization of a UDP-GalNac:GlcNac  $\beta$ -R  $\beta$ 1-4-N-acetylgalactosaminyltransferase from cercariae of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Catalysis of a key step in the synthesis of N,N'-diacetylactosedi amino (lacdiNac)-type glycans. Glycobiology 4(5) : 641-651.
- Negm HI** (1996) Characterization of fucosyllactose determinant-bearing glycoproteins probed by a *Biomphalaria alexrina* lectin in *Schistosoma mansoni* cercariae. Dev Comp Immunol 20(2) :87-96.
- Nguyen NY**, Suzuki A, Boykins KA, Liu TY (1986) The amino acid sequence of *Limulus* C-reactive protein. Evidence of polymorphism. J Biol Chem 261 :10456-10465.
- Nielsen H**, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10 : 1-6.
- Noda S**, Loker ES (1989) Phagocytic activity of M-line *Biomphalaria glabrata* snail : effect of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*. J Parasitol 75 :261-269.
- Nutten S**, Papin JP, Woerly G, Dunne D, McGregor J, Trottein F, Capron M. Selectin and Lewis x interactions are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni*. Eur J Immunol Sous Presse.
- Nyame AK**, Cummings RD, Damian RT (1987) *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues. J Biol Chem 262 : 7990-7995.
- Nyame AK**, Cummings RD, Damian RT (1988) Characterization of the high mannose asparagine-linked oligosaccharides synthesized by *Schistosoma mansoni* adult male worms. Mol Biochem Parasitol 28 : 265-274.
- Nyame AK**, Pilcher JB, Tsang VCW, Cummings RD (1996) *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytotoxic antibodies to surface Lex determinants on myeloid cells. Exp Parasitol 82(2) : 191-200.

- Nyame AK**, DeBose-Boyd R, Long TD, Tsang VCW, Cummings RD (1998) Expression of Lex antigen in *Schistosoma japonicum* and *S.haematobium* and immune responses to Lex in infected animals : lack of Lex expression in other trematodes and nematodes. Glycobiology 8(6) : 615-624.
- Nunez PE** (1992) Interactions between trematodes and their hosts. PhD dissertation, Univ. Aberdeen, UK.
- Nunez PE**, Adema CM, de Jong-Brink M (1994) Modulation of the bacterial clearance activity of haemocytes from the freshwater mollusc, *Lymnea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilharzia ocellata*. Parasitology 109 :299-310.
- O'Reilly DR**, Miller RK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors : a laboratory manual. New-York. Oxford University Press, 1994.
- Omer-Ali P**, Smithers SR, Bickle Q, Phillips SM, Harn D, Simpson AJG (1988) Analysis of the anti-*Schistosoma mansoni* surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. J Immunol 140 : 258-264.
- Ottaviani E** (1983) The blood cells of the freshwater snail *Planorbis corneus*. Dev Comp Immunol 7: 209-216.
- Ottaviani E** (1992) Immunorecognition in the gastropod molluscs with particular reference to the fresh-water snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). Biol Zool 59 :129-139.
- Otsuka-Fuchino H**, Watanabe Y, Hirakawa C, Tamiya T, Matsumoto JJ, Tsuchiya T (1992) Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant African snail. Comp Biochem Physiol C 101(3): 607-613.
- Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O**, Porchet E, Capron A, Dissous C (1994) Characterization of immunoreactive TNF $\alpha$  molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. Dev Comp Immunol 18(3):211-218.
- Pan CT** (1965) Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14 : 931-976.
- Perret S**, Whitfield PJ (1996) Currently available molluscicides. Parasitol Today 12 :156-159.
- Pfeifer K**, Hasseman M, Gamulin V, Bretting H, Farhenholz F, Müller WEG (1993) S-type lectins occur also in invertebrates : high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. Glycobiology 3 :179-184.

- Picker LJ**, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC (1991). The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. Cell 66 : 921-930.
- Picquet M** et al (1996) The epidemiology of human schistosomiasis in the senegal river basin. Trans R Soc Med Hyg 90 :340-346.
- Pointier JP**, Théron A, Imbert-Establet D, Borel G (1991) Eradication of a sylvatic focus of *Schistosoma mansoni* using biological competitor snails. Biological Control 1 :244-247.
- Pointier JP**, Guyard A (1992) Biological control of the snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Martinique, French West Indies. Trop Med Parasitol 43 :98-101.
- Powell LD**, Varki A (1995) I-type lectins. J Biol Chem 270 :14243-14246.
- Prah SK** et **James C** (1977). The influence of physical factors on the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. J. Helminthol. 51 : 73-85.
- Preston TM**, Southgate VR (1994). The species specificity of *Bulinus-Schistosoma* interactions. Parasitol Today 10 :69-74.
- Rauch U**, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU Margolis RK (1992) Cloning primary structure of neuroccan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. J Biol Chem 267 :19536-19547.
- Renwrantz L** (1986) Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles on immunity. Symp Zool Soc Lond 56:81-93.
- Renwrantz L**, Stahmer A (1983) Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. J Comp Physiol 149 :535-546.
- Revelle BM**, Scott D, Kogan TP, Zheng J, Beck PJ (1996). Structure-function analysis of P-selectin-sialyl lewis x binding interactions. J Biol Chem 271(8) : 4289-4297.
- Richards CS** (1970) Genetics of a molluscan vector of Schistosomiasis. Nature 227 : 806-810.
- Richards CS** (1973) Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22 : 748-756.
- Richards CS** (1977) *Schistosoma mansoni* : susceptibility reversal with age in the snail host *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol 42 :165-173.

- Richards CS, Knight M, Lewis FA** (1992) Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. Parasitol. Today 8 (5) 171-174.
- Richards EH, Renwantz L** (1991) Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, galNac specific lectin and a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent, mannose 6-phosphate lectin which recognises activated homologous opsonins. J Comp Physiol 161 :43-54.
- Rivera-Marrero CA, Cummings RD** (1990) *Schistosoma mansoni* contains a galactosyltransferase activity distinct from that typically found in mammalian cells. Mol Biochem Parasitol 43 : 59-68.
- Robledo Y, Madrid JF, Leis O, Cajaraville MP** (1997). Analysis of the distribution of glycoconjugates in the digestive gland of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* by conventional and lectin histochemistry. Cell Tissue Res 288(3) : 591-602.
- Rollinson D, Southgate VR.** The genus *Schistosoma*, a taxonomic appraisal, in The Biology of Schistosomes. Rollinson G Simpson AJG. Academic Press, London, 1987, Chap 1.
- Rosen SD, Bertozzi CR** (1994). The selectins and their ligands. Curr Opin Cell Biol 6 : 663-673.
- Ross AGP, Li YS, Sleigh AC, McManus DP** (1997) Schistosomiasis control in the people's republic of China. Parasitol Today 13(4) :152-155.
- Ruiz-Tiben E, Palmer JR, Fergusson FF** (1969) Biological control of *Biomphalaria glabrata* by *Marisa cornuarietis* in irrigation ponds of Puerto-Rico. Bull WHO 41 :329.
- Rumjanek FD, Smithers SR** (1978) mannosyl transferase activity in homogenate of adult *Schistosoma mansoni*. Parasitology 77(1) : 75-86.
- Rumjanek FD, Broomfield KE, Smithers SR** (1979) *Schistosoma mansoni* : glycosyl transferase activity and the carbohydrate composition of the tegument. Exp Parasitol 47 : 24-35.
- Saladin KS** (1979) Behavioral parasitology and perspectives on miracidial host-finding. Z. Parasitenkd 60 (3) : 197-210.
- Samuelson JC, Quinn JJ et Caufield JP**(1984) Video microscopy of swimming and secreting cercariae of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 70 (6) : 996-999.
- Sasaki K, Kurata K, Funayama K, Nagata M, Watanabe E, Ohta S, Hanai N, Nishi T** (1994). Expression cloning of a novel  $\alpha$ 1-3- fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis X carbohydrate determinants in leukocytes. J Biol Chem 269 : 14730-14737.

- Sastry K, Zahedi K, Lelias JM, Whitehead AS, Ezekowitz RA (1991).** Molecular characterization of the mouse mannose-binding proteins. The mannose-binding protein A but not C is an acute phase reactant. J Immunol 147 : 692-697.
- Schallig HDFH, Sassen MJM, de Jong-Brink (1992)** *In vitro* release of the anti-gonadotropic hormone schistosomin from the central nervous system of *Lymnea stagnalis* is induced with a methanolic extract of cercariae of *Trichobilharzia ocellata*. Parasitology 104 :309-314.
- Schoenberg DA, Cheng TC (1981)** Lectin-binding specificities of *Bulinus truncatus* hemocytes as demonstrated by microhemadsorption. Dev Comp Immunol. 3 :37-44.
- Schutte HJ (1974)** Studies of the South African strain of *Schistosoma mansoni*. Part 2 : The intra-molluscan larval stages. South African J. Sci. 70 : 327-346.
- Sharon N, Lis H (1972)** Lectins : cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177(53) : 949-959.
- Sher A, Fiorentino D, Caspar P, Pearce E, Mosmann T (1991)** Production of IL 10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. J Immunol 147 : 2713-2716.
- Shoemaker C, Ramachandran H, Landa A, Miterlayer dos Reis G, Stein L (1992).** Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. Mol Biol Parasitol 53 : 17-32.
- Shozawa A, Suto C, Kumada N (1989)** Superoxide production by the haemocytes of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, stimulated by miracidia of *Schistosoma mansoni*. Zool Sci 6 :1019-1022.
- Simpson AJG, Rumjanek FD, Payares G, Evans WH (1981)** Glycosyl transferase activity are associated with the surface membrane in adult *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 4 : 107-115.
- Simpson AJG, Correa-Oliveira R, Smithers SR, Sher A (1983)** The exposed carbohydrates of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their modification during maturation *in vivo*. Mol Biochem Parasitol 8 : 191-205.
- Sire C, Rognon A, Théron A (1998)** Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails : acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? Parasitology 117 : 117-122.
- Skubitz KM, Weisdorf DJ, Peterson PK (1987)** Monoclonal antibody AHN-1 inhibits phagocytosis by human neutrophils. Blood 65 : 333-339.

- Sminia T**, van der Knaap WPW. Immunorecognition in invertebrates with special references to molluscs. In *Immunity in Invertebrates*. Ed Bréhelin M. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1986.
- Smit AB**, Vreugdenil E, Ebbering RHM, Geraerts WPM, Klootwijk J, Joosse J (1988). Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. Nature 331 : 535-538.
- Smith LA**, Amar M, Harvey RJ, Darlinson MG, Earley FG, Beadle DJ, King LA, Bermudez I (1995). The production of a stably transformed insect cell line expressing an invertebrate GABAA receptor beta-subunit. J Recept Signal Transduct Res 15(1-4) : 33-41.
- Smyth JD**. Introduction to animal parasitology. Cambridge University Press, 1994.
- Spiess M**, Schwartz AL, Lodish HF (1985) Sequence of human asialoglycoprotein receptor cDNA. An internal signal sequence for membrane insertion. J Biol Chem 260 : 1979-1982.
- Spiess M** (1990) The asialoglycoprotein receptor : a model for endocytic transport receptors. Biochemistry 29 : 10008-10019.
- Srivastan J**, Smith DF, Cummings RD (1992) The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis x antigen. J Biol Chem 267(28) : 20196-20203.
- Srivastan J**, Smith DF, Cummings RD (1994) Demonstration of a novel UDPGalNac:GlcNac  $\beta$ 1-4 N-acetylgalactosaminyltransferase in extracts of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 80 : 884-890.
- Stahl PD** (1990) The macrophage mannose receptor : current status. Am J Respi cell Mol Biol 2 : 317-318.
- Steele RE** (1993) Tyrosine Kinase Receptor, *Hydra vulgaris*, Banque Swiss Prot, Numéro d'accession 348922.
- Stein PC**, Basch PF (1977) Metarcercarial cyst formation *in vitro* of *Echinostoma paraensei*. J Parasitol 63 : 1031-1040.
- Stein PC**, Basch PF (1979) Purification binding properties of hemagglutinin from *Biomphalaria glabrata*. J Invertebr Pathol 33 : 10-18.
- Steiner D**, Chan S, Welsh J, Kwok S (1985). Structure and evolution of the insulin gene. Annu Rev Genet 19 : 463-484.
- Sturrock RF** (1995) Current concept of snail control. Mem Inst Oswaldo Cruz 90 : 241-248.

- Sun SC**, Lindström L, Boman HG, Faye Y, Schmidt O (1990) Hemolin : an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. Science 250: 1729-1732.
- Suzuki T**, Takagi T, Furukohri T, Kawamura K, Nakauchi M (1990) A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. J Biol Chem 265 :1274-1281.
- Takahashi H**, Komano H, Kawaguchi N, Kitamura N, Nakanishi S, Natori S (1985) Cloning and sequencing of cDNA of *Sarcophaga peregrina* humoral lectin on injury of the body wall. J Biol Chem 260 (22) :12228-12233.
- Takahaschi T**, Mori K et Shiceta Y (1961). Phototactic, thermotactic and geotactic responses of miracidia of *Schistosoma japonicum*. Japanese J. Parasitol. 10 : 686-691.
- Tarry DW** (1969) *Dicrocoelium dendriticum*:the life cycle in Britain. J Helminth 43:403-425.
- Taylor ME**, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD, Drickamer K (1990). Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate recognition domains. J Biol Chem 265 : 12156-12162.
- Théron A**, Gerard C, Mone H (1992a) Early enhanced growth of the digestive gland of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* : side effect or parasite manipulation? Parasitol Res 78(5) : 445-450.
- Théron A**, Mone H, Gerard C (1992b) Spatial and energy compromise between host and parasite : the *Biomphalaria glabrata-Schistosoma mansoni* system. Int J Parasitol 22(1) : 91-94.
- Thompson SN**. Physiological alteration during parasitism and their effects on host behaviour. In Parasitism and host behaviour. CJ Barnard and JM Behnke Eds. Taylor and Francis, London, 1990.
- Thornhill JA**, Jones JT, Kusel JR (1986) Increased oviposition and growth in immature *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Schistosoma mansoni*. Parasitology 93 : 443-450.
- Thorpe A**, Duve H (1984). Insulin and glucagon-like peptides in insects and molluscs. Mol Physiol 5 : 235-260.
- Towbin H**, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76 : 4350-4354.
- Trottein F**, Nutten S, Papin JP, Leportier C, Poulain-Godefroy O, Capron A, Capron M (1997) Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. J Immunol 159 : 804-811.

- Turner W** (1996) Mannose-binding lectin:the pluripotent molecule of the innate immune system. I Today 17(11):532-540.
- Uchikawa R, Loker ES** (1991) Lectin-binding properties of the surface of *in vitro*-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporocysts. J Parasitol 77(5) :742-748.
- Uchikawa R, Loker ES** (1992) *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni* : adherence of unaltered and modified latex beads to hemocytes of the host snail *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol 75 :223-232.
- Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlaf E, Ross GT** (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J Clin Endocrinol Metab 33 : 988-991.
- Van Dam GJ, Bergwerff AA, Thomas-Oates JE, Rotmans JP, Kamerling JP, Vliegenthart JFG, Deelder AM** (1994) The immunological reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. Eur J Biochem 225 : 467-482.
- Van der Knaap WPW, Boerrigter-Barendsen LH, Van den Hoven DSP, Sminia T** (1981) Immunocytochemical demonstration of a humoral defense factor in blood cells (amoebocytes) of the pond snail *Lymnea stagnalis*. Cell Tissue Res 219 :291-296.
- Van der Knaap WPW, Doderer A, Boerrigter-Barendsen LH, Sminia T** (1982) Some properties of an agglutinin in the haemolymph of the pond snail *Lymnea stagnalis*. Biol Bull. 162 :404-412.
- Van der Knaap WPW, Sminia T, Schutte R, Boerrigter-Barendsen LH** (1983) Cytophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leukocytes : *in vitro* phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnea stagnalis*. Immunology 48 :377-383.
- Van der Knaap WPW, Boots AMH, Meuleman EA, Sminia T** (1985) Search for shared antigens in the schistosome-snail combination *Trichobilharzia ocellata-Lymnea stagnalis*. Z Parasitenkd 71(2) :219-226.
- Van der Knaap WPW, Meuleman EA, Sminia T** (1987) Alterations in the internal defense system of the pond snail *Lymnea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Parasitol Res 73 :57-65.
- Van der Knaap WPW, Adema CM, Sminia T** (1993) Invertebrate blood cells : morphological functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnea stagnalis*. Comp Haematol Int 3 :20-29.

- Van der Knaap WPW**, Loker ES (1990) Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol Today 6(6) :175-182.
- Varki A** (1994). Selectin ligands. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 7390-7397.
- Vasta GR**, Sullivan JT, Cheng TC, Marchalonis JJ, Warr GW (1982) A cell membrane associated lectin of the oyster hemocyte. J Invertebr Pathol 40 :367-377.
- Vasta GR**, Hunt J, Marchalonis JJ, Fish WW (1986) Galactosyl-binding lectins from the tunicate *Didemnum candidum*. Purification and physiological characterization. J Biol Chem. 261 :9174-9181.
- Vasta GR**, Ahmed H (1996) Animal lectins as cell surface receptors :current status for invertebrate species. Prog Mol Subcell Biol 712 :158-182.
- Vianey-Liaud M** (1990) Biologie de la reproduction de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (mollusque, gastéropode, planorbidae). Thèse d'Etat.
- Velupillai P**, Harn DA (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome infected mice : a mechanism for regulation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 18-22.
- Vestweber D** (1996). Ligand-specificity of the selectins. J Biol Chem 61 : 585-591.
- Vieira LQ**, Kusel JR (1991) *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata* have some common epitopes. I. Common epitopes are present on the surface of early stages of *S.mansoni*. Comp Biochem Physiol 100B(3) : 507-516.
- Webbe G** (1965) Transmission of bilharziasis. 2. Production of cercariae. Bulletin WHO 33 : 155-162.
- Weiss JB**, Magnani JL, Strand M (1986) Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. J Immunol 136(11) : 4275-4282.
- Weis WI**, Kahn R, Fourme R, Drickamer K, Hendrickson WA (1991). Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. Science 254 : 1608-1615.
- Weis WI**, Drickamer K, Hendrickson WA (1992). Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. Nature 360 : 127-134.
- WHO** (1993) The control of schistosomiasis. WHO Tech Rep Ser 830 :1-85.
- Wolmarans CT**, Yssel E (1988) *Biomphalaria glabrata* : influence of selected abiotic factors on leukocytosis. J Invertebr Pathol 51(1) :10-14.
- Wright CA** (1974) Snail susceptibility or trematode infectivity ? J Nat Hist 8 :545-548.

- Xu X**, stack R, Rao N, Caulfield JP (1994) *Schistosoma mansoni*: fractionation and characterization of the glycocalyx and glycogen-like material from cercariae. Exp Parasitol 79 : 399-409.
- Yoshimatsu K**, Ohya Y, Shikata Y, Seto T, Hasegawa Y (1992) Purification and cDNA cloning of a novel factor produced by human T-cell hybridoma: sequence homology with animal lectins. Mol Immunol 29:537-546.
- Yoshino TP**, Cheng TC, Renwanz LR (1977) Lectin and human blood group determinants of *Schistosoma mansoni* : alteration following *in vitro* transformation of miracidium to mother sporocysts. J Parasitol 63 :818-824.
- Yoshino TP**, Bayne CJ (1983) Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol 5 :317-328.
- Yoshino TP**, Granath WO Jr (1983) Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. Cell Tissue Res 232 :553-564.
- Yoshino TP**, Granath WO Jr (1985) Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes : functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. J Invertebr Pathol 45 :174-186.
- Yoshino TP**, Boswell CA (1986) Antigen sharing between larval trematode and their snail hosts : how real the phenomenon in immune evasion? Symp Zool Soc London 56:221-238.
- Yoshino TP**, Laursen JR (1995). Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. J Parasitol 81(5) : 714-722.
- Yoshino TP**, Lodes MJ, Rege AA, Chappel CL (1993) Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 79(1) :23-31.
- Yoshino TP**, Wu XJ, Liu HD (1998). Transfection and heat-inducible expression of molluscan promoter-luciferase reporter gene constructs in the *Biomphalaria glabrata* embryonic snail cell line. Am J Trop Med Hyg 59(3) : 414-420.
- Yuasa HJ**, Furuta E, Nakamura A, Takagi T (1998). Cloning and sequencing of three C-type lectins from body surface mucus of the land slug, *Incilaria fruhstorferi*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 119(3) : 479-484.
- Zelck U**, Becker W (1990) Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. J Invertebr Pathol 55 :93-99.

- Zelck U, Becker W** (1992) *Biomphalaria glabrata* : influence of calcium, lectins, and plasma factors on *in vitro* phagocytic behavior of hemocytes of noninfected or *Schistosoma mansoni*-infected snails. Exp Parasitol 75 :126-136.
- Zelck U, Becker W, Bayne CJ** (1994) Non-self binding plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). Dev Comp Immunol 18, Suppl 1, S113.
- Zimmermann DR, Ruoslahti E** (1989) Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. EMBO J 8 :2975-2981.

## TABLE DES MATIERES

<b>GENERALITES : LES RELATIONS MOLLUSQUES-TREMATODES</b>	<b>12</b>
<b>I LA SCHISTOSOMIASE</b>	<b>13</b>
<b>II RELATIONS MOLLUSQUES-TREMATODES</b>	<b>16</b>
<b>A- LES TREMATODES</b>	<b>16</b>
<b>1- GÉNÉRALITÉS</b>	<b>16</b>
<b>2- CYCLES DE VIE DES TRÉMATODES</b>	<b>18</b>
<b>3- LES STADES LARVAIRES DES SCHISTOSOMES</b>	<b>19</b>
<i>a- Le miracidium</i>	19
<i>b- Les sporocystes</i>	22
b 1- Le sporocyste mère	22
b 2- Le sporocyste fille	23
<i>c- La cercaire</i>	24
<b>B- L'HOTE INTERMEDIAIRE, LE MOLLUSQUE</b>	<b>25</b>
<b>1- BIOLOGIE DE <i>BIOMPHALARIA</i>, GASTÉROPODE PULMONÉ</b>	<b>25</b>
<b>2- LE SYSTÈME DE DÉFENSE INTERNE</b>	<b>25</b>
<i>a- préambule : la défense externe</i>	26
<i>b- Reconnaissance</i>	26
<i>c- Les cellules de défense: -Les cellules fixes</i>	27
<i>d- Cellules de défense: -les hémocytes circulants</i>	28
<b>C- INTERACTIONS SCHISTOSOMES-MOLLUSQUES</b>	<b>30</b>
<b>1- LA SPÉCIFICITÉ D'HÔTE</b>	<b>30</b>
<b>2- SUSCEPTIBILITÉ/RÉSISTANCE. BASES GÉNÉTIQUES</b>	<b>31</b>
<b>3- IMPACTS PHYSIOLOGIQUES DE L'INTERACTION TRÉMATODE-MOLLUSQUE</b>	<b>34</b>
<b>4- MÉCANISMES DE DÉFENSE DE L'HÔTE</b>	<b>36</b>
<b>5-STRATÉGIES D'ÉVASION DES PARASITES</b>	<b>37</b>
<i>a- Défense</i>	37
<i>b- Non-reconnaissance et mimétisme moléculaire</i>	38
<i>c- Immunomodulation-Interférence</i>	40
<i>d- Développement d'une immunité à la réinfection</i>	42
<b>6- LES CELLULES BGE : MODÈLES DE COCULTURE ET OUTILS DE TRANSFECTION</b>	<b>43</b>
<b>GENERALITES : LES LECTINES ET LA RELATION MOLLUSQUE-SCHISTOSOME</b>	<b>48</b>
<b>III LES LECTINES DANS LA RELATION MOLLUSQUE-SCHISTOSOME</b>	<b>49</b>
<b>A- LES LECTINES ANIMALES</b>	<b>50</b>
<b>1- LES LECTINES DE TYPE C</b>	<b>50</b>
<i>a- Lectines membranaires</i>	51
a 1- Groupes II et V	51
a 2- Groupe IV	51

a 3- Groupe VI.....	53
b- Lectines solubles.....	53
b 1- Groupe III.....	53
b 2- Groupe I.....	54
b 3- Groupe VII.....	54
c- Lectines de type C chez les invertébrés.....	54
<b>2- LES GALECTINES.....</b>	<b>55</b>
<b>3- LES PENTRAXINES.....</b>	<b>56</b>
<b>4 LES LECTINES "HÉPARINE-BINDING".....</b>	<b>57</b>
<b>5- LES LECTINES DE TYPE P.....</b>	<b>57</b>
<b>6- LES LECTINES DE TYPE I.....</b>	<b>57</b>
<b>7- AUTRES LECTINES ANIMALES.....</b>	<b>57</b>
<b>B- LECTINES ET RELATIONS MOLLUSQUES-TREMATODES.....</b>	<b>58</b>
<b>1- LES LECTINES CHEZ LES MOLLUSQUES.....</b>	<b>58</b>
<b>2- RECONNAISSANCE BASÉE SUR LES LECTINES ET PHAGOCYTOSE DÉPENDANTE DE LECTINES.....</b>	<b>60</b>
<b>3- ROLE DES LECTINES DANS LA RELATION MOLLUSQUE-TRÉMATODE.....</b>	<b>61</b>
a- <i>Biomphalaria glabrata</i> / <i>Schistosoma</i> et <i>Echinostoma</i> .....	61
b- <i>Biomphalaria alexandrina</i> / <i>Schistosoma mansoni</i> .....	63
c- <i>Bulinus</i> / <i>Schistosoma</i> .....	63
d- <i>Lymnaea</i> / <i>Trichobilharzia</i> .....	64
<b>C- LES GLYCANES DE SCHISTOSOMES.....</b>	<b>64</b>
<b>1- IMPORTANCE DES DÉTERMINANTS GLYCANNIQUES.....</b>	<b>64</b>
<b>2- STRUCTURES.....</b>	<b>66</b>
<b>3- GLYCOSYLTRANSFÉRASES PARASITAIRES.....</b>	<b>67</b>
<b>4- LES SUCRES DANS LA RELATION AVEC L'HÔTE INTERMÉDIAIRE.....</b>	<b>69</b>
<b>5- IMPORTANCE DU LEWIS X CHEZ LES SCHISTOSOMES.....</b>	<b>70</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>75</b>
<b>I RECHERCHE D'UN SYSTEME "SELECTINE-LEWIS X" DANS LA RELATION HEMOCYTES-SPOROCYSTES.....</b>	<b>76</b>
<b>1- IMMUNOMARQUAGE ANTI-LE<sup>X</sup> SUR LES LARVES DE S.MANSONI.....</b>	<b>76</b>
<b>2- IMMUNOMARQUAGE ANTI-SÉLECTINE SUR LES HÉMOCYTES DE B.GLABRATA.....</b>	<b>76</b>
<b>3- EFFET DU FUCOÏDAN SUR LES CELLULES BGE.....</b>	<b>78</b>
<b>II CLONAGE ET CARACTERISATION D'UNE MOLECULE APPARENTEE AUX SELECTINES CHEZ B.GLABRATA.....</b>	<b>81</b>
<b>1- RECHERCHE D'UN DOMAINE LECTINE HOMOLOGUE AUX SÉLECTINES.....</b>	<b>81</b>

<b>2- CLONAGE DE LA SÉQUENCE BGSEL À PARTIR D'ARN DE MOLLUSQUE.....</b>	<b>82</b>
<i>a- RT-PCR.....</i>	<i>82</i>
<i>b- Criblage d'une banque d'ADNc de B.glabrata. ....</i>	<i>82</i>
<b>3- ANALYSE DU DOMAINE LECTINE RECOMBINANT.....</b>	<b>83</b>
<b>III ETUDE DE LA PROTEINE BGSEL CHEZ LES CELLULES BGE.....</b>	<b>85</b>
<b>1- ANALYSE DU GÉNOME DES CELLULES BGE.....</b>	<b>85</b>
<b>2- ANALYSE DE L'ARN DES CELLULES BGE.....</b>	<b>85</b>
<b>3- BGSEL NATIVE.....</b>	<b>91</b>
<b>IV ANALYSE STRUCTURALE DE BGSEL.....</b>	<b>97</b>
<b>1- CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE PRIMAIRE DE BGSEL.....</b>	<b>97</b>
<b>2- COMPARAISON AVEC LES SÉLECTINES.....</b>	<b>97</b>
<b>3- COMPARAISON AVEC LES LECTINES DE TYPE C.....</b>	<b>100</b>
<b>4- COMPARAISON AVEC DES LECTINES D'INVERTÉBRÉS.....</b>	<b>106</b>
<b>V EXPRESSION DE BGSEL DANS DES SYSTEMES HETEROLOGUES.....</b>	<b>108</b>
<b>1- EXPRESSION DE LA PROTÉINE RECOMBINANTE CHEZ E. COLI VIA LE SYSTÈME D'EXPRESSION "QIAEXPRESS" (R1BGSEL).....</b>	<b>108</b>
<b>2- EXPRESSION DE BGSEL CHEZ E. COLI VIA LE SYSTÈME D'EXPRESSION PET32.....</b>	<b>109</b>
<b>3- EXPRESSION DE BGSEL PAR VECTEUR D'EXPRESSION BACULOVIRUS EN CELLULES D'INSECTES (R4BGSEL).....</b>	<b>113</b>
<b>VI FONCTION DE BGSEL.....</b>	<b>117</b>
<b>1- RECHERCHE DE LA FONCTION LECTINE.....</b>	<b>117</b>
<b>2- RECHERCHE DE LA FONCTION DE BGSEL DANS L'INTERACTION HÔTE-PARASITE.....</b>	<b>118</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>121</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>135</b>
<b>I MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>136</b>
<b>1- CYCLE PARASITAIRE.....</b>	<b>136</b>
<b>2- OBTENTION DE SPOROCYSTES.....</b>	<b>136</b>
<b>3- PRÉPARATION DES HÉMOCYTES.....</b>	<b>136</b>
<b>4- LES CELLULES BGE.....</b>	<b>136</b>
<i>a- culture.....</i>	<i>136</i>
<i>b- Préparation des cellules pour les RT-PCR semi-quantitatives.....</i>	<i>137</i>
<i>c- Préparation des membranes.....</i>	<i>137</i>
<i>d- Préparation des produits d'excrétion/sécrétion (E/S).....</i>	<i>138</i>
<b>II COCULTURE : CELLULES BGE-SPOROCYSTES DE S.MANSONI.....</b>	<b>138</b>

<b>III IMMUNOCYTOCHIMIE.....</b>	<b>139</b>
1- MARQUAGE DES CELLULES .....	139
2- MARQUAGE PAR IMMUNOFUORESCENCE DES SPOROCYSTES.....	139
<b>IV ANALYSE DES PROTEINES .....</b>	<b>139</b>
1- MARQUAGE MÉTABOLIQUE DES CELLULES BGE.....	139
2- ELECTROPHORÈSE .....	140
3- WESTERN BLOT .....	140
4- IMMUNOPRÉCIPITATION .....	140
5- LIAISON AUX MONO- ET POLYSACCHARIDES.....	141
<b>V PURIFICATION ET PREPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES.....</b>	<b>141</b>
1- ADN GÉNOMIQUE .....	141
2- ARN .....	142
3- ADN COMPLÉMENTAIRE .....	142
<b>VI CONDITIONS DE PCR .....</b>	<b>142</b>
1- AMORCES.....	142
2- RÉACTIONS.....	143
3- PCR SEMI-QUANTITATIVES .....	144
4- PURIFICATION ET SOUS-CLONAGE DES PRODUITS.....	144
<b>VII CRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADNC .....</b>	<b>144</b>
<b>VIII MARQUAGE DES SONDAS RADIOACTIVES .....</b>	<b>145</b>
<b>IX ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES.....</b>	<b>145</b>
1- SOUTHERN BLOT .....	145
2- NORTHERN BLOT .....	146
3- SÉQUENÇAGE .....	147
<b>X TRANSFORMATION BACTERIENNE .....</b>	<b>147</b>
<b>XI EXPRESSION DE PROTEINES RECOMBINANTES.....</b>	<b>147</b>
1- EXPRESSION EN PQE30.....	147
2- EXPRESSION EN PET32 .....	148
<i>a- Expression du domaine lectine .....</i>	<i>149</i>
<i>b- Expression du clone BgSel en pET32.....</i>	<i>149</i>
3- EXPRESSION EN SYSTÈME EUCARYOTE : BACULOVIRUS ET CELLULES D'INSECTES.....	149

<i>a- Cellules et milieu de culture</i> .....	149
<i>b- Construction du vecteur de co-transfection</i> .....	150
<i>c- Production du stock de baculovirus recombinant</i> .....	151
<i>d- Titration du stock de baculovirus recombinant</i> .....	151
<i>e- Production et purification de GST/BgSel</i> .....	152
<b>XI ANTICORPS UTILISES</b> .....	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>154</b>

