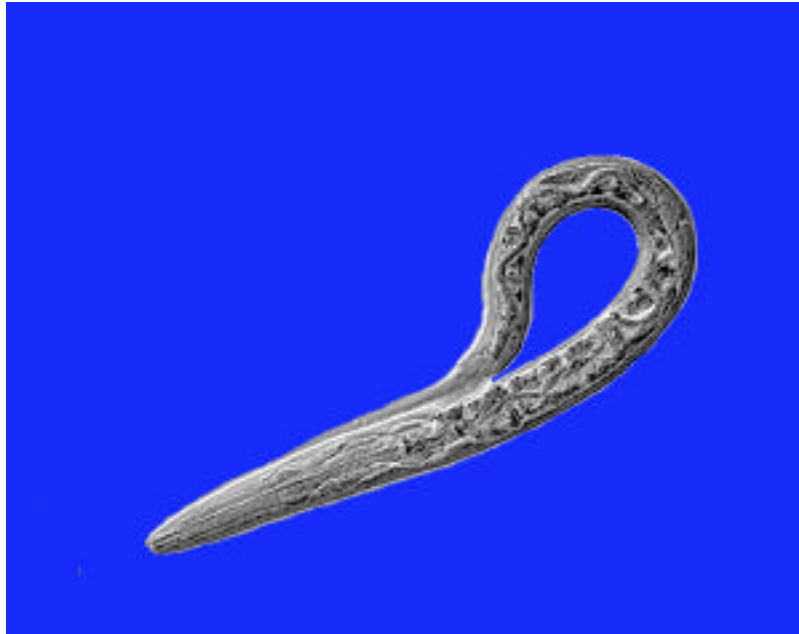


Etudes moléculaires de la surface des nématodes



*Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en
Biologie*

par

Ferial Alaeddine

**Université de Neuchâtel, Institut de Zoologie, Département de
Parasitologie**

Neuchâtel 2000

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Etudes moléculaires de la surface des nématodes
de Mme Ferial Alaeddine

UNIVERSITE DE NEUCHATEL
FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

MM. B. Betschart (directeur de thèse), J.-M. Neuhaus et
F. Müller (Fribourg)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 21 novembre 2000

Le doyen:



J.-P. Derendinger

Études moléculaires de la surface des nématodes:

Détection d'une activité chitinolytique chez *Caenorhabditis elegans*

**Isolation et caractérisation des clones d'ADNc codant pour une
protéine structurale insoluble de l'épicuticule d'*Ascaris suum*,
l'AS-EPICUT1**

**Détermination de l'organisation génétique de l'as-epicut1 sur le
génome et détermination des caractéristiques moléculaires de l'AS-
EPICUT1**

*Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en
Biologie*

Par Ferial Alaeddine

Directeur de thèse: Professeur Bruno Betschart

Membres du jury: Professeur Jean-Marc Neuhaus (Neuchâtel)
Professeur Fritz Müller (Fribourg)

**Université de Neuchâtel, Institut de Zoologie, Département de
Parasitologie**

Neuchâtel 2000

TABLE DES MATIERES

	Page
Sommaire	6
Chapitre I. Introduction générale	8
Les nématodes : Vue générale.....	9
<i>Caenorhabditis</i> un excellent modèle biologique.....	10
Buts de la thèse.....	11
Ascariidose: Description et importance de la maladie.....	12
Description de l'agent responsable de l'Ascariidose.....	12
Le cycle de vie d' <i>Ascaris</i>	13
Epidémiologie de l'Ascariidose.....	14
Manifestations cliniques, pathogénie, diagnostic et traitement de l'Ascariidose.....	14
Filarioses lymphatiques: Les filaires responsables de la maladie.....	15
Le cycle de vie de <i>B.malayi</i>	16
Epidémiologie de la filariose lymphatique.....	16
Le spectre de la maladie.....	17
Diagnostic et traitement de la filariose lymphatique.....	18
Aspects généraux de la surface des nématodes.....	19
La morphologie de la cuticule.....	20
La chitinase: Définition et rôle biologique.....	23
L'importance de la chitinase dans la transmission des parasites.....	25
Le rôle de la chitinase dans le cycle des nématodes parasitaires et son identification comme vaccin.....	26
Etudes génétiques et moléculaires des chitinase chez les nématodes.....	27

Les collagènes: Vue générale.....	29
Les collagènes des nématodes.....	30
Les collagènes de la membrane basale: Aspects génétiques et biochimiques.....	30
Les collagènes de la cuticule.....	31
Aspects génétiques et moléculaires des collagènes cuticulaires.....	32
La cuticuline: Définition et vue générale.....	35
La composition biochimique de la cuticuline.....	36
Etudes génétiques de la cuticuline.....	38
L'épicuticule: Morphologie et aspects biochimiques.....	39
Aspects immunologiques de la surface des nématodes.....	41
Bibliographie.....	44
Chapitre II. Détection des protéines chitinolytiques chez <i>Caenorhabditis</i> <i>elegans</i> et étude du taux chitinolytique au cours du cycle.....	56
Introduction.....	57
Matériel et Méthodes.....	59
Préparation du matériel.....	59
Extraction des protéines et tests enzymatiques.....	60
Chromatographie d'affinité avec une colonne de lectine.....	61
SDS-PAGE.....	61
Détection de l'activité chitinolytique sur un gel SDS-PAGE.....	62
Préparation du matériel de la mue L3-L4 pour des tests Western blot....	63
Tests western blot.....	64
Résultats.....	64
Tests préliminaires de détection d'une activité chitinolytique chez <i>C.elegans</i>	64
Détection de l'activité chitinolytique dans les stades synchronisés de <i>C.elegans</i>	66
Dosage de l'activité chitinolytique dans l'extrait protéique d'œufs d' <i>A.suum</i>	67
Purification de la chitinase de <i>C.elegans</i> avec une colonne de lectine.....	67

Etudes des réactions croisées avec des anticorps monoclonaux d' <i>A.viteae</i> sur des stades de <i>C.elegans</i> et les œufs d' <i>A.suum</i>	68
Etudes des réactions croisées avec des anticorps monoclonaux d' <i>A.viteae</i> sur des milieux de culture et des larves de <i>C.elegans</i> pendant et après la mue de L3-L4.....	70
Discussion.....	71
Bibliographie.....	76
 Chapitre III: Isolation et caractérisation des clones d'ADNc codant pour	
AS-EPICUT1.....	
Introduction.....	82
Matériel et Méthodes.....	83
Les bibliothèques d'ADNc.....	86
Séquençage avec le système ExoIII/Mung Bean nuclease (MBN).....	87
Criblage des bibliothèques d'ADNc par hybridation.....	88
Polymerase chain reaction (PCR).....	89
Conversion par excision in vivo des phages ZAP en plasmides pBlue-script et séquençage.....	91
Résultats.....	91
Séquençage complet du clone 31B1A.....	91
Isolation des clones supplémentaires d'ADNc contenant as-epicut1.....	95
Détection des fragments homologues à as-epicut1 dans:	
1) <i>C.elegans</i>	104
2) <i>B.pahangi</i> , <i>B.malayi</i> et <i>O.volvulus</i>	108
Comparaison des acides aminés entre les différentes protéines insolubles.....	109
Discussion.....	110
Bibliographie.....	120

Chapitre IV: Détermination des fragments génomiques codants pour la cuticuline d'<i>Ascaris suum</i>	125
Introduction.....	126
Matériel et Méthodes.....	128
La librairie Lambda EMBL3 et les nématodes <i>Ascaris suum</i>	128
Criblage de la librairie d'ADN génomique.....	128
Réactions PCR.....	129
Extraction d'ADN des phages et d'ADN génomique.....	131
Insertion d'un fragment génomique dans l'ADN phagique ZapII et encapsidation.....	131
Excision in vivo des phages ZAPII en plasmides pBlue-script.....	131
Séquençage.....	132
Résultats.....	133
Criblage de la librairie génomique EMBL3 d' <i>Ascaris suum</i>	133
Identification des fragments d'ADN de la librairie génomique contenant le gène as-epicut1.....	133
L'analyse des fragments contenant as-epicut1 issus de la librairie génomique.....	135
L'identification de la structure d'as-epicut1 sur le génome.....	143
Comparaison des séquences as-epicut1 des clones d'ADNc avec le clone génomique G3.....	151
Discussion.....	157
Bibliographie.....	163
Chapitre V: Discussion générale	167
1.La chitinase	168
Détection d'une activité chitinolytique au cours du cycle de <i>Caenorhabditis elegans</i>	169
Discussion du rôle de la chitinase chez les filaires parasitaires et <i>C.elegans</i> au cours du cycle.....	170
Les aspects immunologiques de la chitinase chez les filaires parasitaires.....	172
Perspectives.....	176

2. La cuticuline	177
Les caractéristiques de l'épicuticule et la caractérisation d'une protéine de la cuticuline d' <i>Ascaris suum</i>	177
Composition biochimique des cuticulines.....	177
Aspects immunologiques de la cuticuline.....	178
Etudes structurales de la cuticuline et de l'épicuticule.....	179
Comparaison entre la cuticuline AS-EPICUT1 et les autres protéines cuticulaires insolubles.....	180
Perspectives.....	183
 Bibliographie.....	185
 Remerciements	196
 Curriculum viteae	197

SOMMAIRE

L'objectif de cette thèse a consisté à étudier la surface des nématodes: (1) au niveau de la chitinase qui représente une substance sécrétée, et (2) au niveau de la cuticuline ou AS-EPICUT1 qui représente une protéine structurale de l'épicuticule. Ce dernier constitue le sujet principal de nos études.

1. La chitinase

L'activité chitinolytique a été examinée chez un nématode libre, *C.elegans*. Pour la première fois, cette activité a été détectée chez *C.elegans* et a été mesurée dans tous les stades de développement. Par réactions croisées avec d'anticorps monoclonaux préparés contre L3 d'*A.viteae*, des épitopes ont été détectés en stade L3 et dans le surnageant de la mue de L3 en L4 de *C.elegans*, indiquant la présence des structures communes de la chitinase entre les espèces parasites et *C.elegans*. L'activité la plus élevée a été trouvée pendant l'éclosion de l'œuf, puis le taux de cette activité diminue progressivement dans les stades larvaires suivants. Elle se révèle négligeable dans l'extrait protéique des jeunes adultes, mais elle commence à augmenter progressivement à partir des adultes gravides pour devenir relativement importante pendant la ponte. D'après les études réalisées sur la chitinase de nématodes parasites, le rôle de l'activité chitinolytique a été attribué à certains stades infectieux, à la dégradation de la paroi de l'œuf ou à la dégradation de la gaine membranaire de microfilaires, mais nos résultats démontrent que cette activité pourrait jouer un rôle dans le maintien de tous les stades du cycle.

2. La cuticuline

Les informations concernant la composition et l'immunogénicité du composant insoluble de la surface des nématodes sont encore faibles. Le gène *as-epicut1* isolé à partir d'une librairie d'ADNc d'*A.suum* codant pour une protéine insoluble de l'épicuticule a été complètement séquencé au cours de cette thèse. Les caractéristiques génétiques et les caractéristiques des protéines prédites ont été déterminées par isolation des clones d'ADNc supplémentaires et

d'un clone d'ADN génomique, ainsi que par l'étude d'*as-epicut1* directement sur le génome. Le gène *as-epicut1* a montré une complexité génétique importante représentée par la présence des régions répétitives et par le mode de transcription et l'arrangement d'*as-epicut1* dans le génome. Les clones d'ADNc et d'ADN génomique d'*A.suum*, contenant le gène *as-epicut1*, indiquent la présence des copies multiples d'*as-epicut1* sur le génome et/ou l'implication de l'épissage différentiel dans la production des messagers d'*as-epicut1* avec des longueurs différentes. Ceci peut, par conséquent, produire des protéines avec des masses moléculaires différentes. Par comparaison entre les clones d'ADNc et les séquences génomiques, on constate que la partie 5' codante d'*as-epicut1* dans les inserts des clones génomiques, a été remplacée par une autre petite séquence dans les clones d'ADNc. Cette partie qui n'existe pas dans les transcrits, se termine avec un accepteur d'épissage dans les clones génomiques. Ce fait indique la présence de trans-épissage à ce niveau. Malgré les difficultés de manipuler les séquences génétiques contenant *as-epicut1*, ce(s) gène(s) a (ont) été déterminé(s) avec toutes ses (leurs) caractéristiques essentielles, un codon d'initiation "ORF-start", un codon de terminaison "ORF-end", et la protéine prédite avec ses constituants biochimiques.

La comparaison d'*as-epicut1* dans les banques des données a révélé de séquences homologues à *as-epicut1* chez *C.elegans*, *B.malayi* et *O.volvulus*. Comme *as-epicut1*, ces séquences sont formées des régions répétitives. Une identité de 77 % avec AS-EPICUT1 a été trouvée dans certaines régions des séquences peptidiques. L'analyse de la structure protéique d'une séquence identifiée chez *C.elegans* montre le même profil d'hydrophobicité que celui d'AS-EPICUT1.

L'identification des régions homologues à *as-epicut1* chez d'autres nématodes supporte les résultats immunologiques précédents qui démontrent la présence d'épitopes communs entre AS-EPICUT1 et la surface d'autres nématodes.

Chapitre I

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les nématodes : Vue générale

Les nématodes sont des helminthes du phylum nematoda. Ils possèdent une structure filiforme relativement simple. Leur corps, qui est essentiellement cylindrique et non segmenté, les distingue facilement des autres helminthes. Cette structure possède une symétrie bilatérale avec des fibres musculaires longitudinales et une cavité centrale. La cuticule est produite par la couche hypodermique qui est très épaisse au niveau des cordes longitudinales hypodermiques.

La plupart des nématodes libres sont microscopiques. Certaines espèces parasites sont de petites tailles avec une longueur de 200 μm comme *Mansonella perstans*, ou plusieurs centimètres comme *Dirofilaria immitis*. Les nématodes qui se développent dans les tissus peuvent atteindre parfois une longueur énorme, jusqu'à quelques mètres comme *Dracunculus medinensis*. Les espèces vivant dans l'intestin sont généralement plus larges. Parmi elles *Ascaris* représente un excellent modèle.

Les nématodes sont largement distribués dans la nature. On en trouve dans les eaux douces, les mers, le sol et ils représentent les parasites les plus tolérés par les plantes et les animaux. Certains nématodes se nourrissent de micro-organismes qui se trouvent dans la matière en phase de dégradation. D'autres vivent sur les plantes dont ils se nourrissent en provoquant d'énormes dégâts dans l'agriculture (Nickle, 1991). Les espèces *Meloidogyne*, parasites des racines d'un grand nombre de plantes, constituent la cause d'une perte économique évaluée à 11-25 % de la culture dans les régions tropicales (Sasser, 1979). Chez les vertébrés, les nématodes peuvent parasiter les yeux, la bouche, la langue, le canal alimentaire, le foie, le poumon ou la cavité interne, et souvent ils causent une fatigue indicible.

Le cycle de vie est très varié, il est très simple dans certains cas et extrêmement compliqué dans d'autres. La majorité des nématodes sont ovipares comme *Ascaris suum*, mais certaines espèces sont vivipares comme *Brugia* ssp. Le développement des œufs hors de l'hôte est largement dépendant des conditions de température et d'oxygène dans l'environnement. Dans

tous les lieux d'éclosion, soit dans l'eau, la terre ou dans l'hôte, la plupart des larves des nématodes doivent passer par 4 mues avant d'atteindre leur maturité, mais un faible nombre d'espèces possède un cycle de développement raccourci.

Caenorhabditis un excellent modèle biologique

En 1965, Sidney Brenner a proposé *Caenorhabditis elegans* comme modèle pour étudier le développement et le système nerveux. Le progrès dans l'étude de *C.elegans* a montré que ce nématode peut être le meilleur métazoaire à étudier en ce qui concerne son anatomie, sa génétique, son comportement et son développement biologique (Wood, 1988).

Caenorhabditis elegans est un petit ver libre, qui se trouve dans plusieurs régions du monde. Ce nématode se nourrit principalement de bactéries et se reproduit avec un cycle de vie de trois jours dans les conditions optimales. Les deux sexes, hermaphrodite et mâle, sont d'une taille de 1 mm chacun, et les adultes sont morphologiquement différents. La forme hermaphrodite produit des oocytes et du sperme et peut se reproduire par autofécondation. Les mâles, qui se trouvent à une fréquence faible, peuvent féconder les hermaphrodites, mais les hermaphrodites ne peuvent pas se féconder entre eux. L'hermaphrodite peut produire environ 300 œufs pendant sa vie fertile.

Caenorhabditis elegans, comme la plupart des nématodes, passe par les quatre stades larvaires L1, L2, L3, et L4. A chaque passage d'un stade à un autre, les larves doivent subir une mue durant laquelle une nouvelle cuticule est synthétisée dans l'hypoderme. L'anatomie et la génétique de *C.elegans* sont très simples et ce nématode représente un modèle facile à maintenir dans les laboratoires. Différents mutants ont été déjà obtenus par traitement avec des agents mutagènes chimiques ou par exposition à des irradiations.

C.elegans a été choisi comme l'un des premiers organismes multicellulaires animaux pour un projet de séquençage complet du génome, dont les résultats ont été publiés en décembre 1998 (Hodgkin et al., 1998, Science; voir site: <http://www.sanger.ac.uk>)

La séquence complète comprend environ 97 millions de paires de bases d'ADN, soit un trentième du génome humain.

Plusieurs auteurs ont rapporté que ce nématode peut servir de modèle pour l'étude des espèces parasitaires. Il forme une ligne de base pour mesurer les adaptations liées au

parasitisme (Politz et Philipp, 1992; Lewis et al., 1999; Blaxter, 1993a). Bien que les styles de vie menés par les espèces parasitaires soient divers, il est toujours possible que plusieurs propriétés de la structure et du développement de la cuticule de *C.elegans* puissent être partagées avec la cuticule des espèces de nématodes parasitaires. *Caenorhabditis* représente alors un excellent modèle biologique pour étudier la structure et la formation de la cuticule des nématodes car la structure de la cuticule dans le stade adulte ressemble au plan général de la cuticule des autres nématodes.

Buts de la thèse

La surface des parasites joue un rôle important dans les interactions entre le parasite et son hôte. Chez les nématodes et en comparaison avec les autres parasites, les informations concernant la nature, les propriétés de la surface, et les interactions hôte-parasite sont encore limitées (Mackenzie et al., 1978; Maizels et al., 1993).

Chez les nématodes parasitaires, la cuticule établit un contact direct avec l'environnement de son hôte. La compréhension des interactions hôte-parasite au niveau de la cuticule contribue à révéler des informations plus précises sur la maladie (Maizels et Selkirk, 1988). Les études immunologiques, génétiques, et moléculaires conduisent à la compréhension de l'expression, de l'assemblage et de l'arrangement des molécules sur la surface de la cuticule. Ces études peuvent ainsi donner des renseignements sur le rôle de la structure cuticulaire dans la survie et la défense des nématodes dans l'environnement de leur hôte.

La cuticule des nématodes est composée de trois structures majeures, les collagènes cuticulaires, la cuticuline de l'épicuticule, et les protéines non-structurales excrétées et sécrétées sur la surface.

Les collagènes cuticulaires ont été relativement bien étudiés chez le nématode libre *Caenorhabditis elegans* et chez certaines espèces parasitaires, tandis que seules quelques études concernant la cuticuline ont été effectuées.

Les protéines non-structurales constituent des sujets importants dans plusieurs laboratoires, parmi lesquelles nous mentionnerons seulement la protéine chitinolytique ou chitinase, qui montre un pouvoir antigénique très élevé et peut jouer un rôle important dans le cycle vital. Les recherches précédentes concernant la chitinase sont limitées à des espèces parasitaires

comme *Acantocheilonema viteae*, *Onchocerca volvulus* et *Brugia ssp* (Venegas et al., 1996; Fuhrman et al., 1995; Harrison et al., 1999; Wang et al., 1999).

Afin de comprendre certains aspects moléculaires des interactions hôte- parasite nous avons étudié les protéines non-structurales et structurales de la surface des nématodes.

0. Parmi les protéines non-structurales, la chitinase a été choisie comme sujet d'étude dans le nématode libre *C.elegans*. La détection d'une activité chitinolytique dans un nématode libre pourrait permettre d'élucider le rôle de la chitinase dans le développement des nématodes au cours de tous les stades du cycle. Plusieurs études ont montré que l'expression et l'activité de la chitinase sont corrélées avec le cycle vital des parasites, surtout avec le mécanisme de l'infection à partir des stades larvaires infectieux.

0. Parmi les protéines structurales, la cuticuline du nématode intestinal, *Ascaris suum*, a constitué le sujet principal de notre recherche. Le gène de la cuticuline a été isolé d'une librairie d'ADNc et partiellement séquencé (Bisoffi et Betschart, 1996a). Afin de compléter le travail précédent, les techniques de biologie moléculaire ont été utilisées pour isoler, séquencer et caractériser le(s) gène(s) codant pour la cuticuline et pour prédire la (les) protéine(s) correspondante(s) chez *A.suum*, *B.pahangi* et *C.elegans*.

Ascariidose: Description et importance de la maladie

Description de l'agent responsable de l'Ascariidose

Les ascarides sont des nématodes de la classe Secernentea, ordre Ascaridida, famille Ascarididae (Blaxter, 1993b; Blaxter et al., 1998). Ces vers ronds sont larges, longs, et effilés à leurs extrémités. Les mâles et les femelles matures mesurent respectivement 200 et 300 mm, avec une largeur de 2-6 mm. Le mâle est plus mince que la femelle et peut être distingué par une courbure saillante à son extrémité postérieure (Crompton, 1989). Les vers d'*Ascaris* vivants sont rigides, ils peuvent avoir une couleur entre blanc et jaune mais souvent aussi rose et ils sont très mobiles dans les milieux physiologiques chauds et salins. La morphologie d'*Ascaris* reflète le plan général du corps des nématodes décrit par Wharton (1986).

Ascaris lumbricoides est l'agent infectieux responsable de l'Ascariidose humaine. La question de la relation systématique du parasite de l'homme *Ascaris lumbricoides* avec le parasite du porc *A.suum* n'est pas encore résolue complètement. Sur la base des faibles différences morphologiques, chromosomiques, et biochimiques, ces deux parasites ont été souvent décrites comme deux espèces différentes (Crompton, 1989). Des études concernant la distinction entre les deux populations d'*Ascaris* sont en train de se développer (Anderson et al, 1993; Anderson et Jaenike, 1997). Récemment, Peng et al. (1998) ont démontré que des différences significatives existent dans l'ADN mitochondrial et l'ADN ribosomique entre les deux populations d'*Ascaris*. Ces variations génétiques, révélées par le polymorphisme des produits PCR digérés avec des enzymes de restriction, indiquent que *A.suum* et *A.lumbricoides* représentent bien deux espèces ou deux sous-espèces différentes (Peng et al, 1998)

La femelle d'*Ascaris* produit d'environ 200.000 œufs chaque jour, et ce, pendant un an environ. Les œufs fertiles sont généralement ovoïdes, ils mesurent $50-70 \times 40-50 \mu\text{m}$ et possèdent une paroi épaisse brune, transparente à la lumière, qui peut avoir quatre couches. Les différentes couches contiennent des mucopolysaccharides, des protéines, des chitines, et des lipides spécifiques d'*Ascaris* ou ascarosides (Crompton, 1989). Les stades larvaires d'*Ascaris* (L1-L4) ont été étudiés à fond dans des souris infectées (Nichols, 1956). Les larves du deuxième stade larvaire L2, trouvées dans le foie, mesurent en moyenne $260-280 \mu\text{m}$ en longueur et $14-16 \mu\text{m}$ en largeur. Les stades trouvés dans les poumons mesurent en moyen $564 \mu\text{m}$ en longueur et $28 \mu\text{m}$ en largeur pendant la mue de L2 à L3 et $1700-2000 \mu\text{m}$ juste avant la mue de L3 à L4. Le développement est très rapide et les larves complètent leur dernière mue de L4 en adultes dans l'intestin grêle.

Le cycle de vie d'Ascaris

Les œufs fertilisés se développent jusqu'au stade larvaire L2 de 10-40 jours dans le sol humide ou dans l'eau à $20-30^{\circ}\text{C}$. Le premier stade larvaire L1 subit la mue dans l'œuf après une semaine environ. L'œuf contenant le stade L2 représente la forme infectieuse des vertébrés, et les œufs infectieux peuvent survivre plus de sept ans. L'infection se produit par voie orale et l'éclosion de l'œuf se déroule dans le duodénum. La paroi de l'œuf se dissout dans les

conditions suivantes: température de 37°C, concentration élevée de CO₂, potentiel oxydation-réduction faible, et pH autour de 7. Les larves L2 pénètrent dans la paroi de l'intestin, elles passent à travers le foie vers le cœur. Ce passage est effectué en trois jours environ. La larve subit deux mues dans les poumons (L2-L3 de 2-5 jours, et L3-L4 ,10 jours après l'infection), puis elle pénètre dans les alvéoles. Elle arrive dans la trachée puis elle descend dans l'œsophage pour arriver dans l'intestin grêle. Dans l'intestin les vers subissent la 4ème mue de L4 en adultes immatures, puis mûrent, à partir de la 8ème semaine après infection. Les adultes vivent de 1 à 2 ans (Mehlhorn, 1988).

Epidémiologie de l'Ascariidose

Ascaris est un parasite cosmopolite. L'Ascariidose est une infection commune dans les régions tropicales et tempérées, dans des conditions d'humidité suffisante et dans des conditions faibles d'hygiène et du système sanitaire. *Ascaris* forme un groupe d'helminthes humain parmi les plus communs, qui infectent environ 22% de la population mondiale (Crompton, 1989). Les œufs sont résistants aux désinfectants, à la pollution, et à un manque d'oxygène. Ils sont capables de continuer leur développement dans l'eau de mer et restent viables pendant 40 jours à -23°C. La qualité du sol joue un rôle important dans la transmission: un sol argileux humide favorise la survie des œufs. Les régions disposant de conditions sanitaires standard ont généralement une faible densité d'infection. Au niveau personnel, il est important de laver ou de cuire les végétaux et de surveiller les endroits de jeu des enfants. Il est aussi important d'utiliser les moyens modernes dans le traitement de terrains cultivés comme par exemple l'utilisation des réservoirs d'eau pure désinfectée. Ces conditions recommandées pourraient éliminer ou détruire la majorité des œufs d'*Ascaris* (Kilama, 1989).

Manifestations cliniques, pathologie, diagnostic et traitement de l'Ascariidose

Bien que la majorité des personnes atteintes ne montrent pas de symptômes (asymptomatiques), il est toujours possible que certains vers deviennent dangereux. Le premier signe clinique peut se manifester comme une pneumonie accompagnée de toux et parfois de fièvre le cinquième ou le sixième jour après l'infection. Ces symptômes sont accompagnés d'une éosinophilie modérée. La sévérité des symptômes dépend du nombre

d'œufs ingérés et du déroulement d'infections précédentes. L'hypersensibilité à l'infection peut causer des symptômes asthmatiques forts. Au cours de la migration, la larve peut provoquer des lésions dans le foie et les poumons, et parfois des réactions granulomateuses peuvent se produire autour de la larve encapsulée. La seconde phase des symptômes pathologiques est provoquée par la présence de vers adultes dans l'intestin. Les manifestations principales d'une Ascaridiose avancée sont des troubles gastro-intestinaux, nausée, colique, et un manque de sommeil. Des complications sérieuses dues à l'Ascaridiose peuvent se manifester par une obstruction accompagnée de douleurs abdominales et d'un manque d'appétit. Des complications rares comme une inflammation des conduits biliaires et pancréatiques sont dues à la présence des parasites adultes dans ces régions (Manson-Bahr et Bell, 1987; Pawlowski et Davis, 1989).

Le diagnostic de l'Ascaridiose peut être effectué par la détection des œufs dans les fèces du patient ou cliniquement par la détection de l'éosinophilie accompagnant une pneumonie causée par la migration larvaire. Ces tests peuvent être complétés par des méthodes du diagnostic, comme la radiographie et le diagnostic sérologique, mais souvent les résultats de ce dernier ne sont pas clairs à cause des réactions croisées avec d'autres antigènes helminthiques (Manson-Bahr et Bell, 1987).

Le traitement est effectif seulement contre les vers adultes. Souvent, la majorité des infections d'*Ascaris* causent des symptômes légers, et parfois aucun, mais il est important de traiter tous les infections.

Filarioses lymphatiques

Les huit espèces de nématodes parasitaires responsables d'une filariose sont de la classe *Secernentea*, de l'ordre *Spirurida*, de la famille *Filariidae*. Ces espèces sont les suivantes: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *Mansonella ozzardi*, et *Mansonella perstans* (Manson-Bahr et Bell, 1987).

Le cycle de vie de B.malayi

Les microfilaires (stade L1) passent dans la circulation sanguine périphérique souvent pendant les périodes nocturnes. Pendant la journée elles restent dans la circulation interne, dans les poumons par exemple. Les études réalisées sur la périodicité des microfilaires ont montré que pendant la journée les microfilaires restent principalement dans les petites veines des poumons, et ceci à cause de la différence de tension en oxygène entre les artères et les veines des poumons. La circulation périphérique représente un mauvais environnement et les microfilaires y restent le temps minimum nécessaire pour qu'elles soient transmises par le vecteur arthropode. Quand des microfilaires sont absorbées avec le repas sanguin par l'espèce convenable de moustiques (principalement du genre *Mansonia* et *Aedes*), elles perdent leur gaine en 5-30 minutes dans l'estomac de l'insecte. Puis elles pénètrent à travers la paroi de l'intestin moyen et migrent vers les muscles thoraciques dans un délai de 1-24 heures. Après deux jours, elles subissent la mue en L2 (deuxième stade larvaire). Pendant la deuxième semaine, elles subissent la mue vers le troisième stade larvaire L3 qui est la forme infectieuse pour l'homme. Elles migrent vers la tête du moustique et pénètrent dans le labium. Quand le moustique se nourrit sur l'hôte, les larves migrent à travers la trompe et pénètrent dans la peau de l'hôte. Chez celui-ci, les larves migrent vers les glandes et les vaisseaux lymphatiques où elles subissent les mues de L3 à L4 et de L4 au stade adulte. Les femelles adultes sont vivipares, elles produisent des microfilaires un an après l'infection. Les microfilaires sont entourées d'une gaine membranaire (sheath) qui correspond à la paroi modifiée de l'œuf. Les microfilaires migrent du système lymphatique vers le sang où elles se préparent pour la transmission par les moustiques (Manson-Bahr et Bell, 1987).

Epidémiologie de la filariose lymphatique

Les parasites *W.bancrofti* et *Brugia* sont les agents responsables de la filariose lymphatique, une maladie très répandue dans les régions tropicales. On a estimé que 900 millions de personnes dans le monde sont exposées aux nématodes parasites responsables de la filariose lymphatique. D'après l'évaluation de l'organisation mondiale de la santé de 1992, 72.8 millions de personnes sont atteintes. La plupart de ces personnes sont infestées par

W.bancrofti qui est très répandue en Afrique et en Inde. *Brugia malayi* et *Brugia timori* ne concernent que 5.8 millions d'individus.

W.bancrofti est transmise par le moustique *Culex quinquefasciatus* et par certaines espèces d'Anopheles (WHO, 1992). Les infections par *Brugia* ont lieu principalement dans le sud-est de l'Asie. Ces filaires parasitaires sont souvent transmises par des moustiques des genres *Mansonia* et *Aedes*.

Des réservoirs animaux extensifs ont été reportés pour les espèces de *Brugia*. Il a été démontré que *B.malayi* infecte naturellement des animaux sauvages et domestiques, comme les singes (*Presbytis* ssp) et les chats. Le chat forme l'hôte naturel de *B.pahangi* (filaire parasitaire qui infecte les animaux domestiques et sauvages) dans le sud-est de l'Asie. Les études expérimentales de la transmission de *B.pahangi* indiquent que l'homme ne représente pas un hôte pour ces parasites (Edeson, 1960). Des recherches extensives sur les espèces de *Brugia* ont été développées grâce à l'existence de modèles animaux, des rongeurs (Wang et al., 1999; Rao et al., 1999). Les deux espèces pathogènes de l'homme, *B.malayi*, et du chat, *B.pahangi*, peuvent être propagées dans les gerbilles *Meriones unguiculatus* et dans les moustiques du genre *Aedes*. Les infections par *B.pahangi* peuvent aussi être effectuées dans les conditions de laboratoire chez le chat qui représente un modèle pour les filarioses lymphatiques humaines (Denham, 1987).

Le spectre de la maladie.

Certains groupes des personnes, atteintes par la filariose lymphatique, ne montrent aucun symptôme de la maladie pendant plusieurs années, voire pendant toute leur vie. Dans ces cas, la seule preuve de l'infection est la détection de microfilaires dans le sang. Dans d'autres cas après trois mois d'infection, les filaires peuvent provoquer la lymphangite (infection des canaux lymphatiques), avec une inflammation des nodules lymphatiques, maux de tête, nausée, et quelques fois un urticaire (fièvre des filaires). Les manifestations cliniques les plus sérieuses sont dues aux troubles dans le système lymphatique. Ces troubles peuvent provoquer une lymphadenitis (inflammation des nodules lymphatiques), lymphoedème, lymphocoeles, lymphuria, chyluria, et chez les mâles des lésions génitales comprenant l'hydrocoele et le scrotum lymphatique. Au cours des années, ces lésions lymphatiques peuvent conduire à des

éléphantiasis défigurant les membres et le scrotum. Les études histologiques sur du matériel d'autopsies et de biopsies suggèrent que les dégâts dans les vaisseaux lymphatiques qui causent l'éléphantiasis soient dus à une réponse immunitaire excessive contre la présence des vers adultes. De plus, les épisodes successifs de lymphangites conduisent à un fibrome des vaisseaux lymphatiques et à une hypertension lymphatique, causant des troubles de fonctions (Manson-Bahr Bell, 1987).

Des implications médicales supplémentaires résultent de l'accumulation de microfilaires dans les poumons de l'hôte, comme l'éosinophilie pulmonaire tropicale (TPE), réaction typique d'hypersensibilité qui consiste en des épisodes répétitifs de crises nocturnes qui ressemblent à l'asthme. Ces crises sont dues à un taux élevé d'immunoglobulines E (IgE) totales et spécifiques aux filaires, et à une augmentation importante du nombre des granulocytes éosinophiles dans le sang et les tissus (Manson-Bahr et Bell, 1987; Piessens et al., 1990).

Diagnostic et traitement de la filariose lymphatique

Le diagnostic de la filariose lymphatique est basé sur une méthode directe par une visualisation microscopique des microfilaires dans des frottis du sang. Cette méthode n'est pas très efficace. La densité des microfilaires n'est pas corrélée avec la sévérité de la maladie et les microfilaires peuvent n'être présentes dans le sang que pendant les premiers stades. Les microfilaires peuvent être détectées dans le sang par un examen direct, par comptage ou par filtration (Manson-Bahr et Bill, 1987). Ces techniques peuvent être associées à des méthodes immunologiques, qui dans certains cas ne représentent pas des tests de diagnostic bien établis (Hamilton, 1985). Les antigènes des parasites dans la circulation sanguine peuvent être utilisés pour une détection sérologique des infections par filaires (Weil, 1990; Wang et al., 1999). En conséquence, il est nécessaire de développer un diagnostic sérologique convenable pour la détection spécifique de la filariose lymphatique.

Le traitement de la filariose est souvent représenté par une chimiothérapie dirigée contre les microfilaires (microfilaricide). Les médicaments anthelminthiques spécifiques sont rares et ont des effets secondaires considérables. Le médicament le plus utilisé est le Diethylcarbamizine (DEC), un microfilaricide puissant, qui possède aussi une certaine activité adulticide. Le DEC interfère avec le métabolisme des carbohydrates et des folates des parasites filaires

(Subrahmanyam, 1987). L'ivermectine est un autre microfilaricide, actuellement utilisé dans le traitement massif de plus de 2 millions d'habitants dans les régions couvertes par l'"Onchocerciasis Control Programme" (OCP) en Afrique de l'ouest (OCP/WHO, 1997) (*Onchocerca volvulus* est l'agent responsable de la cécité des rivières qui affecte 20 millions de personnes dans le monde; OCP/WHO, 1997). Les recherches de médicaments agissant contre les parasites au stade adulte (macrofilaricides) avec des effets secondaires limités, et utilisables dans les traitements massifs sans supervision médicale, n'ont pas abouti jusqu'au présent.

Actuellement, des efforts massifs sont en train d'être réalisés contre la filariose lymphatique dans le monde (WHO, 2000). Ces efforts sont planifiés par l'union de différentes organisations et compagnies pharmaceutiques mondiales et visent à éliminer la filariose lymphatique des pays endémiques d'ici à l'an 2020. Les organisations impliquées dans ce projet sont: L'Organisation Mondiale de la Santé (WHO); La Banque Mondiale; Le Département de Développement International (United Kingdom); L'Assistance Médicale Inter-églises (NGDOs); SmithKline Beecham qui intervient par la production de l'Albendazole; Merck & Co., Inc par la production de l'Ivermectine sous la marque Mectizan®. Vu qu'aujourd'hui la production d'une qualité standard de Diethylcarbamazine (DEC) est déjà possible, ce médicament a aussi été prévu pour des traitements massifs, mais seulement après coordination entre production et distribution (WHO, 2000). Les régions endémiques sont réparties dans 80 pays, l'Inde et l'Afrique constituant les régions les plus touchées (WHO, 2000).

Aspects généraux de la surface des nématodes

La surface de tous les nématodes est formée essentiellement d'une cuticule comprenant une structure complexe de plusieurs couches. Cette structure résistante constitue le squelette et permet les mouvements de l'animal, tout en lui conférant élasticité et rigidité.

La cuticule joue le rôle d'une barrière sélective dans la nutrition, dans la résistance à la sécheresse, et dans la défense contre le système immunitaire de l'hôte chez les espèces parasites, ou contre des prédateurs (bactéries et champignons nématophages) chez les nématodes libres (Bird et Bird, 1991).

La cuticule est constituée d'un assemblage de macromolécules, et varie d'une espèce à l'autre, ainsi que d'un stade de développement à un autre dans la même espèce (Bird et Bird, 1991; Wright, 1987).

Les nématodes passent par 4 mues pendant leur cycle de vie. La cuticule toute entière est rejetée à chaque mue et remplacée par une autre cuticule synthétisée par les tissus de l'hypoderme entourant l'animal sur toute sa longueur (Maizels et al., 1993). La synthèse et la sécrétion des composants de la cuticule par l'hypoderme sont synchronisées avec les mues (Cox et al, 1981b).

Dans toutes les espèces de nématodes, la cuticule est entourée d'une structure fine trilamellaire (Neville, 1975; Lee et Atkinson, 1976; DeGrise, 1977; De Souza et al., 1993; Lee et al., 1993; Peixoto et De Souza, 1994). Cette couche, qui assure le contact direct entre les nématodes et leur environnement, est constituée essentiellement de lipides et de cuticulines (Proudfoot et al, 1990; Fujimoto et al., 1981).

Trois catégories des protéines cuticulaires ont été identifiées:

0. Les collagènes (collagen-like proteins) dont l'extraction nécessite des détergents ioniques puissants comme le SDS, et des agents réducteurs pour couper les ponts disulfures (Kramer, 1994; Politz and Philipp, 1992).

0. Le résidu insoluble restant après le traitement de la cuticule au SDS et résistant à la collagénase est nommé la cuticuline. Ce résidu est formé de protéines comprenant des fortes liaisons inter- et intramoléculaires croisées (Fujimoto et Kanaya, 1973, Fujimoto et al., 1981).

3. Les protéines associées à la surface de la cuticule et les glycoprotéines sont solubilisées en utilisant des procédures d'extraction douces, en absence de 2ME (Maizels et al., 1993).

La morphologie de la cuticule

La cuticule des nématodes est constituée d'une structure extracellulaire formée de trois régions principales: corticale, médiane, et basale (Figure 1). Cette définition a été établie par Lee et Atkison en 1976. Des exceptions à ce modèle de base ont été trouvées. Ces exceptions sont surtout liées au mode de vie parasitaire. Ainsi la morphologie de la cuticule des nématodes peut être très variée.

La cuticule est absente chez certaines espèces comme par exemple la femelle de *Bradynema* (Riding, 1970), où la membrane de l'hypoderme couvre la surface des nématodes en forme de différentes microvillosités. La cuticule est mince dans d'autres espèces comme la larve de *Reesimermis nielseni* (Poinar et Hess, 1977) puis elle devient très complexe, formée de plusieurs couches chez plusieurs parasites comme *Strongyloides venezuelensis* (Martinez et De Souza, 1997) et chez certaines formes libres comme *C.elegans* (Peixoto et De Souza, 1992).

La technique "Quick-freeze, Freeze-fracture, Deep-etch and Rotary replication" a été utilisée pour analyser l'organisation structurale de la cuticule dans des nématodes adultes de *C.elegans* (Peixoto et De Souza, 1995). L'examen d'une section fine de *C.elegans* montre 6 couches dans la cuticule: une épicuticule trilamellaire, une zone corticale externe, une zone corticale interne, une zone intermédiaire, une couche fibreuse et une couche basale (Peixoto et De Souza, 1992). Une section mince de la cuticule de la larve infectieuse L3 de *Strongyloides venezuelensis* montre la présence de 5 couches: épicuticule, zone corticale, zone intermédiaire, couche fibreuse et zone basale (Martinez et De Souza, 1997).

Des sections de la cuticule de *C.elegans* ont montré une matrice composée d'un réseau de structures en filaments et globules avec des espaces vides occupés probablement par des fluides intracuticulaires (Peixoto et De Souza, 1995). Une structure similaire a été trouvée dans la cuticule de *Strongyloides venezuelensis* (Martinez et De Souza, 1997). De nouvelles informations ont été révélées sur l'organisation structurale de l'épicuticule, qui d'après les études morphologiques récentes, ressemble à une membrane formée de deux faces, la face interne qui contient un grand nombre de particules, et la face externe toujours lisse chez les adultes, mais légèrement granuleuse chez les larves "dauers" (De Sousa et al., 1993).

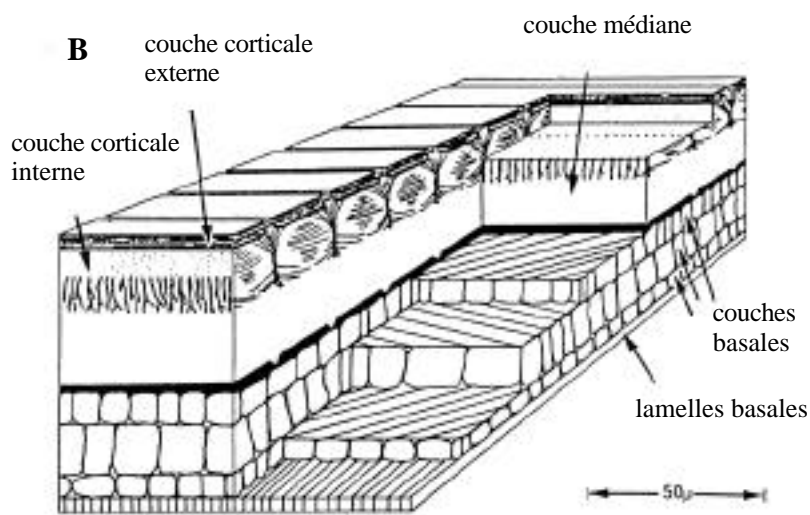
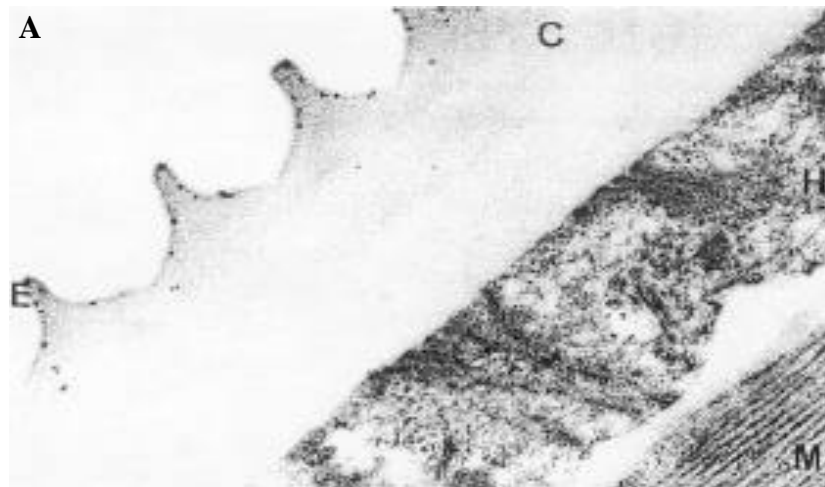


Figure 1. (A) Visualisation par microscopie électronique de la cuticule d'un adulte de *Brugia*, E: l'épicuticule, C: la cuticule, H: l'hypoderme, M: les tissus musculaires. Les points noirs indiquent, par immunolocalisation, les déterminants antigéniques des collagènes (40'800x) (Bisoffi et Betschart, 1996). (B) Diagramme schématisé de la cuticule d'un *Ascaris* adulte (Bird, 1971).

Une section longitudinale de la cuticule de *C.elegans* montre une couche externe très opaque de 62 nm d'épaisseur, une couche corticale moyennement opaque de 100 nm, une couche intermédiaire transparente où les corps globuleux (strats) forment des liaisons entre la région corticale et la région basale de la cuticule, une couche fibreuses avec l'apparition des nouveaux

éléments structuraux, et une couche basale de 180 nm d'épaisseur (Peixoto et al., 1997). La couche fibreuse se révèle composée de deux rangés des fibres qui se rencontrent avec un angle de 60° en forme de squelette de poisson "fish-bonelike pattern", (Peixoto et al., 1997).

La chitinase: Définition et rôle biologique.

Les chitinases (EC 3.2.1.14) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons -N-acetylglucosamine de la chitine.

La chitinase a été découverte par Karrer en 1929, et son activité spécifique dans l'hydrolyse de la chitine a été démontrée par Zechmeister en 1939. Ces enzymes se trouvent dans une rangée importante d'organismes, comprenant les bactéries, les champignons, les crustacés, les insectes (Perrakis et al., 1993), les plantes (Neuhaus, 1999), et même dans les vertébrés (Renkana et al., 1995, 1997, et 1998) .

Le rôle biologique de la chitinase peut être divisé en plusieurs catégories. Par exemple le rôle majeur des chitinases chez les champignons, les crustacés et les insectes peut consister à modifier la chitine qui constitue la structure de ces organismes. La production de chitinase par les plantes est considérée comme un moyen de défense contre les champignons pathogènes qui contiennent de la chitine comme composant structural. Les bactéries produisent la chitinase pour décomposer la chitine afin de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie. Certains champignons utilisent des chitinases pour trouer la paroi d'autres champignons qu'ils parasitent.

L'activité des chitinases peut être mesurée par une variété de substrats et à différentes conditions. Les tests enzymatiques sont souvent effectués avec des substrats artificiels obtenus par l'acetylation du chitosane. D'autres substrats peuvent aussi être utilisés, comme par exemple le glycol-chitine, le chitosane, les chitooligosaccharides, les facteurs de nodulation qui sont des formes modifiées de chitooligosaccharides, et le 4-methyl-umbelliferyl-chitotriose. Ce dernier est connu comme un substrat plutôt pour les lysozymes que pour les chitinases (Neuhaus, 1999).

Selon le mode d'action sur la chitine, les chitinases peuvent être divisées en endo- et exochitinases. Les endo- -1,4-N-acetylglucosaminidases hydrolysent les liaisons -

glycosidiques de glucosaminides, qui peuvent faire partie d'une variété de polymères, comme la chitine, le chitosane ou le peptidoglycane (Neuhaus, 1999; Figure 2). L'endochitinase agit au hasard à l'intérieur de la chaîne de chitine et peut libérer des molécules de tailles différentes. Par contre l'exochitinase, connue sous le nom de chitobiosidase, rogne la chaîne de chitine et libère des monomères ou des dimères à partir de l'extrémité non-réductrice de la chitine.

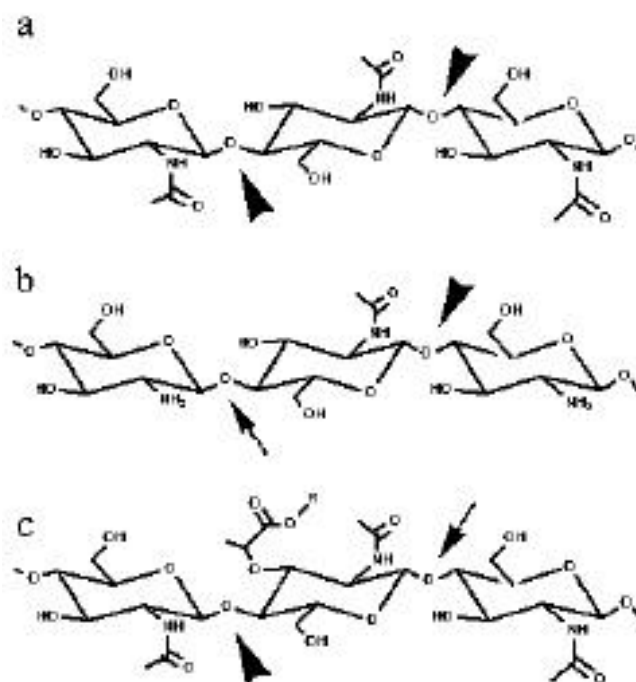


Figure 2. Les substrats des chitinases et les liaisons hydrolysables. (a) chitine (b) chitosane (c) peptidoglycane. Les chitinases hydrolysent les liaisons glycosidiques (têtes des flèches) (1-4)- - à l'intérieur de la chaîne polysaccharidique formée d'un homopolymère des résidus N-acetylglucosamines. Les figures montrent les orientations alternatives des résidus du sucre. Les chitinases ne coupent pas les liaisons des résidus du glucosamine du chitosane indiquées par la flèche en (b) ou les liaisons glycosidiques des résidus de l'acide N-acetylmuramique dans le peptidoglycane, indiquées par la flèche en (c). Ces liaisons sont hydrolysées par les chitosanases et les lysosymes, respectivement (sous permission de Neuhaus, 1999).

Les chitinases ont aussi été classifiées comme chitinases acides et basiques (Perrakis et al, 1993). La diversité des chitinases est remarquable par le degré élevé de la divergence de leurs séquences d'acides aminés. Les chitinases des plantes ont été classifiées récemment en

plusieurs classes, en se basant sur la séquence et la configuration du domaine catalytique qui semble plus conservé que le domaine de fixation (Neuhaus, 1999).

Il existe deux familles d'endochitinases dont la structure et le mécanisme sont différents complètement. L'une, la famille 18 de glycanohydrolases est présente chez les bactéries et tous les règnes d'eucaryotes, alors que la famille 19 n'a été trouvée que chez les plantes et le genre bactérien *Streptomyces*.

L'importance de la chitinase dans la transmission des parasites

Chez plusieurs espèces d'arthropodes hématophages, les tissus internes du tube digestif sont couverts d'une substance chitineuse, nommée la membrane péritrophique (PM), qui constitue un obstacle contre l'invasion parasitaire. Pour dépasser cet obstacle, les parasites ont développé un mécanisme comprenant la sécrétion d'enzymes chitinolytiques. Les insectes hématophages sont souvent des vecteurs pour plusieurs parasites humains, et ils jouent un rôle principal dans la transmission des maladies. Les parasites peuvent être transmis entre hôtes vertébrés à travers des vecteurs insectes, chez qui, ils subissent un développement morphologique comme *Brugia* et *Wuchereria*, ou alors ils se multiplient comme *Plasmodium* ssp et *Leishmania* (Sieber et al., 1991; Huber et al., 1991). L'infection par voie orale et la pénétration des parasites dans le tube digestif non-chitineux, permet aux parasites d'éviter l'exosquelette chitineux de l'insecte. La structure chitineuse du tube digestif de certains vecteurs, pourrait retarder ou bloquer la propagation des parasites. Par exemple, chez les moustiques, la membrane péritrophique sépare le repas sanguin de l'épithélium de l'intestin moyen (Peters, 1992). Dans le cas du Phlébotome, la membrane chitineuse protège la valve et l'épithélium de l'intestin moyen. Pour réussir leur transmission dans ces espèces d'arthropodes, les parasites ont développé un mécanisme pour détruire la barrière chitineuse, par la production des chitinases comme la chitinase (EC 3.2.1.14) qui joue un rôle essentiel dans la transmission de *Plasmodium* ssp et de *Leishmania* à travers les insectes. Donc, certains parasites ont besoin de chitinase pour dégrader des structures chitineuses de l'hôte comme *Leishmania major* (Schlein et al., 1991), et *Plasmodium* ssp (Huber et al., 1991). D'autres parasites dépendent de la chitinase pour vivre en symbiose dans les insectes, comme c'est le cas de certains *Trypanosoma* (Maudlin, 1991). Parfois les parasites ont besoin de

chitinase pour dégrader des structures contenant de la chitine produites par les parasites eux-mêmes, comme l'œuf d'*Onchocerca gibsoni* (Gooday et al., 1988).

Le rôle de la chitinase dans le cycle des nématodes parasitaires et son identification comme vaccin.

Une heure après le repas sanguin (avant la formation de la membrane péritrophique chitineuse, PM, dans l'intestin de l'insecte), les microfilaires de *Brugia* envahissent l'épithélium de l'intestin moyen. Il semble que ces parasites n'ont pas besoin de chitinase pour détruire la PM, mais l'utilisation de l'anticorps monoclonal, MF1, anti-chitinase de *Brugia malayi* bloque leur transmission (Fuhrman et al., 1987 et 1992). Le mécanisme de blocage de la transmission de *Brugia* par le monoclonal MF1 n'est pas connu, mais on sait que l'antigène reconnu par le monoclonal MF1 est exprimé par les microfilaires pendant leur développement dans les moustiques (Fuhrman et al., 1989). La chitinase pourrait intervenir dans la transmission par la destruction de la gaine membranaire des microfilaires, ou par la production de *N*-acétylglucosamine. Après la destruction de la gaine, les microfilaires commencent leur développement dans le vecteur et subissent des mues successives. La gaine des microfilaires contient de la chitine (Fuhrman, et Piessens, 1985; Klonisch et al., 1991) et la chitinase pourrait jouer un rôle important dans le mécanisme de destruction de cette gaine (Fuhrman et Piessens, 1985). La lectine d'origine intestinale des moustiques bloque l'invasion de l'épithélium de l'intestin moyen par les microfilaires de *Brugia pahangi*. Ce blocage peut être éliminé par l'addition de *N*-acétylglucosamine dans la nourriture (Phiri et Ham, 1990). Il semble que les molécules de *N*-acétylglucosamine, libérées dans le milieu sous l'action de la chitinase, peuvent augmenter le pouvoir d'infection des microfilaires par inhibition spécifique de la lectine (Phiri et Ham, 1990; Shahabuddin et Kaslow, 1993).

La chitinase a été détectée chez *Onchocerca gibsoni*, l'agent responsable de la filariose chez les bovins (Gooday et al., 1988). En effet, les microfilaires de ces parasites ne possèdent pas de gaine membranaire, mais la chitine a été trouvée dans la paroi de l'œuf de plusieurs espèces de nématodes (Bird et McClure, 1976). Ces parasites pourraient utiliser la chitinase pour la régulation de la chitine pendant le développement des œufs (Brydon et al., 1987). Si la destruction de la gaine membranaire des microfilaires de *Brugia* et la régulation de la chitine de

la membrane des œufs d'*Onchocerca* sont des mécanismes indispensables pour le développement de ces nématodes, le blocage de l'activité de la chitinase pourrait inhiber leur transmission (Shahabuddin et Kaslow, 1993).

Des molécules de chitotriosides ont été trouvées dans la cuticule de nématodes adultes d'*Haemonchus contortus*, ce qui indique que la chitine est un composant structural de la cuticule de ces nématodes (Rhoads et Fetterer, 1994). La source synthétique de la chitinase a été immunolocalisée par microscopie électronique dans les glandes pharyngiennes, et les produits des glandes pharyngiennes sont exportés à travers la cavité buccale où ils sont supposés jouer un rôle dans la mue (Bird et Bird, 1991).

Deux protéines chitinolytiques ont été identifiées dans les larves infectieuses d'*Acanthocheilonema viteae* (Wu et al., 1996). L'expression de ces protéines est thermosensible et elle a été détectée entre le 3ème et le 6ème jour de développement après infection dans les tiques. Ces protéines spécifiques à ce stade n'ont pas été détectées dans les stades suivants. De plus, des séquences de chitinase d'*Onchocerca volvulus* ont été amplifiées par PCR et les protéines prédites ont été caractérisées. La fonction des chitinases larvaires d'*A.viteae* et d'*O.volvulus* n'est pas encore claire. Elles pourraient aider la larve à sortir de la partie buccale du vecteur, mais cette possibilité est peu probable parce que l'expression de ces protéines n'est pas corrélée avec cette période. Il est plus probable que ces enzymes participent au mécanisme préparatoire de la mue en modifiant la cuticule de L3, dont les propriétés sont supposées différentes de celles des autres stades (Wu et al., 1996).

Etudes génétiques et moléculaires des chitinases chez les nématodes

Une famille d'isozymes de chitinases a été identifiée chez les microfilaires de deux espèces de *Brugia*. Cette famille est formée de trois protéines de 69, 73, et 75 kD chez les microfilaires de *Brugia pahangi* et de deux protéines de 70 et 75 kD chez les microfilaires de *B.malayi* (Fuhrman et al., 1995). Ces cinq protéines sont caractérisés par une forte activité plutôt endo- qu'exochitinolytique. Toutes ces protéines partagent un nombre de caractères: Une séquence d'acides aminés conservée à leur extrémité N-terminale et une structure tertiaire formée de deux domaines: 1) Le domaine N-terminal qui semble responsable de l'activité enzymatique car

l'enzyme perd cette activité lorsque ce domaine est coupé et séparé du reste de la molécule. 2) Le domaine C-terminal riche en résidus de cystéines qui semble jouer un rôle dans la fixation de la chitine. Ces isozymes semblent subir une glycosylation pendant la phase de maturation des protéines dans les deux espèces de *Brugia*. Cette famille d'isozymes n'a pas été détectée dans les microfilaires des autres espèces.

Venegas et al. (1996) ont démontré que l'expression des isozymes de chitinases dans *B.malayi* est corrélée avec la période d'infection du vecteur (moustique) par les microfilaires. La chitinase p70 de *B.malayi* a été clonée et exprimée sous deux formes: la séquence complète de la protéine de 62 kD, et une séquence incomplète de la protéine d'environ 43 kD contenant seulement le domaine catalytique N-terminal. La délétion du domaine C-terminal riche en cystéines augmente l'expression de la chitinase recombinante et ne gêne pas la vitesse de la réaction avec les substrats di- ou trisaccharidique c.à.d. les substrats de poids moléculaire faible (Venegas et al., 1996). Par contre, l'affinité vis-à-vis de la molécule saccharidique du poids moléculaire élevé était plus élevée pour la chitinase non délétée. Après ce résultat, Venegas (1996) a suggéré que le domaine riche en cystéines pourrait jouer un rôle dans la fixation de l'enzyme à son substrat.

Deux produits de chitinases spécifiques au stade larvaire infectieux d'*A.viteae* autour de 220 et 75 kD ont été identifiés (Wu et al., 1996). La synthèse de ces produits est thermo-sensible, et elle se produit à 27°C mais pas à 37°C. A l'aide de la technique de PCR et à partir d'une librairie d'ADNc, la séquence N-terminale de 20 aa (qui pourrait être la séquence signal) a été identifiée avec la protéine de la chitinase mature de 504 résidus de 56 kD (Wu et al., 1996).

En utilisant une amorce de la chitinase d'*A.viteae*, et à partir d'une librairie de ADNc d'*O.volvulus* au stade larvaire infectieux, la séquence d'une chitinase homologue a été amplifiée. La séquence d'*O.volvulus* code pour une séquence de 20 aa qui pourrait être la séquence signal suivie par une protéine mature de 477 résidus (54 kD) (Wu et al., 1996).

Adam et ses collaborateurs (1996) ont identifié la chitinase d'*A.viteae* du stade larvaire infectieux L3 comme une cible pour la réponse immunitaire humorale chez les mériens. L'ADNc de la chitinase de L3 a été séquencé et la séquence des acides aminés montre une homologie importante avec la chitinase des microfilaires de *B.malayi*, et celles des insectes,

levures, bactéries et *Streptomyces* (Adam et al., 1996). La protéine a été analysée par deux techniques: 1) La détection de l'activité enzymatique et détermination du poids moléculaire simultanément sur un gel copolymérisé avec un substrat et 2) La détection immunologique à l'aide des anticorps monoclonaux. La production de l'anticorps monoclonal mAb 2H2 (IgM, KL), a été réalisée par vaccination des souris BALB/c contre le surnageant d'une culture de L3 *A.viteae* pendant la mue, et mAb 24-4 (IgG1, kl) par la vaccination des souris BALB/c contre L3 irradiées. En immunoblot l'anticorps monoclonal mAb 2H2 reconnaît 2 protéines spécifiques au stade L3, de 68 et 205 kD. L'anticorps monoclonal mAb 24-4 reconnaît la bande de 205 kD, mais pas la bande de 68 kD.

La comparaison entre les protéines et les gènes des chitinases de différentes espèces, *Manduca sexta*, *Chelonus*, et *Brugia malayi*, a montré que les chitinases de ces trois espèces possèdent, à l'extrémité C-terminale, un domaine de fixation de la chitine riche en 6 cystéines espacées (Fuhrman et al., 1995).

Les collagènes: Vue générale.

Les collagènes sont des protéines structurales extracellulaires, organisées en forme d'une tige triple-hélicoïdale par association de 3 chaînes polypeptidiques. Chaque troisième acide aminé dans la chaîne polypeptidique doit être une glycine, dans un ordre qui permet l'emballage des polypeptides dans la conformation d'une triple-hélice. Ainsi, les portions triple-hélicoïdales des polypeptides des collagènes contiennent une séquence répétée représentée par (Gly-X-Y)_n, où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé, mais souvent sont des prolines ou des hydroxyprolines. Les collagènes ont été étudiés largement dans les vertébrés où ils constituent une large famille de gènes hétérogènes. Au moins 25 gènes différents de collagène sont présents chez les vertébrés. Les protéines correspondantes peuvent être groupées en 13 types ou familles en se basant sur des différences structurales dans les molécules (Vuorio and De Combrughe, 1990).

Les types variés de collagène forment des structures moléculaires différentes et assurent des fonctions structurales distinctes. Chaque type de collagène possède une distribution particulière dans les tissus. Pendant la phase post-traductionnelle, les collagènes subissent plusieurs modifications. Ces modifications peuvent comprendre des clivages protéolytiques,

l'hydroxylation de résidus proline et glycine, l'addition de sucres, et l'établissement de liaisons covalentes croisées avec les chaînes polypeptidiques adjacentes (Cox, 1992).

Le grand nombre de gènes de collagène couplé avec leurs modifications post-traductionnelles produit des protéines extracellulaires de collagène de différentes formes. Les formes matures des collagènes fibrillaires des vertébrés (comme les collagènes du type I et du type II des os et du cartilage) sont formées presque entièrement des séquences répétées (Gly-X-Y)_n. Ces molécules se rassemblent en associations latérales pour former des fibres très organisées. Les formes matures des collagènes non-fibrillaires des vertébrés comprennent un large groupe et incluent le type IV qui ressemble aux collagènes de la membrane basale des nématodes. Ces collagènes contiennent des domaines globulaires non triple-hélicoïdaux et de courtes extensions d'acides aminés non-triplets parmi les séquences répétitives (Gly-X-Y)_n. Ces molécules forment des associations à leurs extrémités, moins serrées, en constituant des masses flexibles. Les informations extensives sur les collagènes des vertébrés fournissent une structure de base pour les études comparatives sur les collagènes des nématodes (Cox, 1992).

Les collagènes des nématodes

Deux types de protéines de collagène ont été caractérisés chez les nématodes, les collagènes de la membrane basale et les collagènes de la cuticule. Les caractéristiques générales de ces protéines et les gènes correspondants présentent des différences significatives. Les connaissances liées aux structures de ces protéines ont été bien développées pendant les dernières années grâce au développement des techniques de biologie moléculaire qui ont permis le clonage des gènes codant pour les collagènes. Ces études ont montré que les collagènes de la membrane basale des nématodes partagent plusieurs caractéristiques avec les collagènes des vertébrés. Par contre, les collagènes de la cuticule des nématodes possèdent une structure unique (Cox, 1992).

Les collagènes de la membrane basale: Aspects génétiques et biochimiques

Les collagènes de type IV forment le composant majeur de toutes les membranes basales, car ils se trouvent largement dans ces structures extracellulaires, d'où leur synonyme de collagènes de la membrane basale. Cinq différents collagènes (1 à 5) ont été caractérisés de la

membrane basale des vertébrés (Butkowski et al., 1987; Soininen et al., 1987; Hostikka et Tryggvason, 1988; Hostikka et al., 1990). Les protéines 1 et 2 constituent les collagènes prédominants de la membrane basale des vertébrés.

Des collagènes homologues à 1 et 2 des vertébrés ont été identifiés chez *C.elegans* par Guo et Kramer en 1989. Les deux gènes *clb-1* et *clb-2* sont localisés sur des chromosomes différents. L'étude par hybridation suggère que seulement 2 gènes de collagène de la membrane basale sont présents dans le génome de *C.elegans*. Ces deux gènes de collagène sont longs de plus de 7 kb et sont transcrits en ARNm de 5.5 kb. Cette longueur d'ARNm code pour une protéine d'environ 180 kD, et une telle taille a été déterminée pour les collagènes de la membrane basale chez *A.suum* (Noelken et al., 1986), et les collagènes de la membrane basale des vertébrés (Glanville, 1987).

Les collagènes de la cuticule

Les collagènes cuticulaires ont été étudiés d'abord chez *A.lumbricoides* (Josse et Harrington, 1964). Cette étude montre que les collagènes d'un poids moléculaire estimé à 900 kD peuvent être extraits de la cuticule d'un vers adulte. McBride et Harrington (1967) ont montré que des agents réducteurs diminuent le poids moléculaire de ces collagènes à 62 kD. Des études ultérieures ont montré que les agents réducteurs peuvent être utilisés effectivement pour solubiliser les collagènes des cuticules isolées d'*A.lumbricoides* et d'*Ascaris suum* adultes (Fujimoto et Kanaya, 1973; Betschart et Wyss, 1990). La quantité des collagènes cuticulaires solubilisée par agents réducteurs est spécifique à chaque espèce et au stade du développement dans la même espèce. En générale les agents réducteurs solubilisent une proportion plus importante de la cuticule du stade adulte que du stade jeune. Cette différence peut être liée au fait que les collagènes sont plus abondants dans la cuticule au stade adulte qu'au stade jeune (Cox et al., 1981; Reddigari et al., 1986; Fetterer et Urban, 1988) ou à la différence du degré ou de la nature des ponts qui tiennent les collagènes dans la cuticule. Les études par microscopie électronique suggèrent que les collagènes solubilisés dérivent principalement des couches médiane et basale de la cuticule (Bird, 1971; Fujimoto et Kanaya, 1973; Cox et al., 1981; Selkirk et al., 1989). Les collagènes solubilisés de la cuticule d'un nématode dérivent de couches cuticulaires différentes et montrent des poids moléculaires différents d'un stade à un

autre (Cox et al., 1981; Reddigari et al., 1986). Les différences de solubilité indiquent que les protéines extraites de la cuticule par des agents réducteurs représentent une partie seulement de la totalité des collagènes dans la cuticule (Cox et al., 1981).

Aspects génétiques et moléculaires des collagènes cuticulaires

Les gènes de collagène cuticulaire sont largement étudiés dans *C.elegans*, dont plusieurs ont été séquencés et déterminés (Kramer et al., 1982, 1988, et 1990; Von Mende et al., 1988; Cox et al., 1989; Park et Kramer., 1990). Deux séquences de gènes de collagène cuticulaire d'*A.suum* (Kingston et al., 1989) et de *H.contortus* (Shamansky et al., 1989) ont été aussi déterminées. Des analyses comparatives indiquent que les gènes de collagène cuticulaire sont très similaires dans ces différents nématodes. Dans chaque ver les collagènes de la cuticule comprennent une large famille de gènes. Plus de 30 gènes de collagènes de la cuticule de *C.elegans* ont été clonés et les études par hybridation suggèrent que le nombre de gènes pourrait atteindre 150 (Cox et al., 1984). Plus de 60 espèces uniques de protéines de collagène ont été détectées à partir d'ARNm de *C.elegans* traduits in vitro, ce qui indique que plusieurs gènes sont exprimés (Politz et Edgar, 1984). Les résultats d'hybridation de l'ADN génomique suggèrent que les gènes des collagènes de la cuticule seraient moins nombreux chez *A.suum* et *H.contortus* que chez *C.elegans* (Kingston et al, 1989; Shamanski et al 1989). Les collagènes cuticulaires comprennent une large famille de 4 types de gènes chez *Brugia pahangi* (Selkirk et al., 1989). Le clone d'ADNc de *Brugia pahangi* du stade adulte, nommé Bpcol-1, a révélé une similarité avec les collagènes cuticulaires des autres nématodes (Bisoffi et Betschart, 1996a). L'organisation structurale de la protéine déduite de Bpcol-1 s'est révélée identique à celle de *col-14* de *C.elegans* (Bisoffi et Betschart, 1996a). L'immunolocalisation avec des anticorps anti-Bpcol-1 a permis de détecter des épitopes dans toutes les zones de la cuticule de *B.pahangi*, mais aussi dans d'autres structures internes, indiquant la présence d'épitopes identiques dans la membrane basale (Bisoffi et Betschart, 1996a). Chez *Brugia malayi*, le clone isolé de la librairie d'ADNc du stade L3 montre une similarité avec les collagènes de *C.elegans* (Scott et al., 1995). La structure génétique commune des collagènes cuticulaires d'*A.suum*, *C.elegans* et *H.contortus* montre qu'ils ont une longueur de moins de 3 kb, qu'ils contiennent 1 ou 2 introns, qu'ils sont transcrits en ARNm de 1-1.5 kb, et que les protéines correspondantes

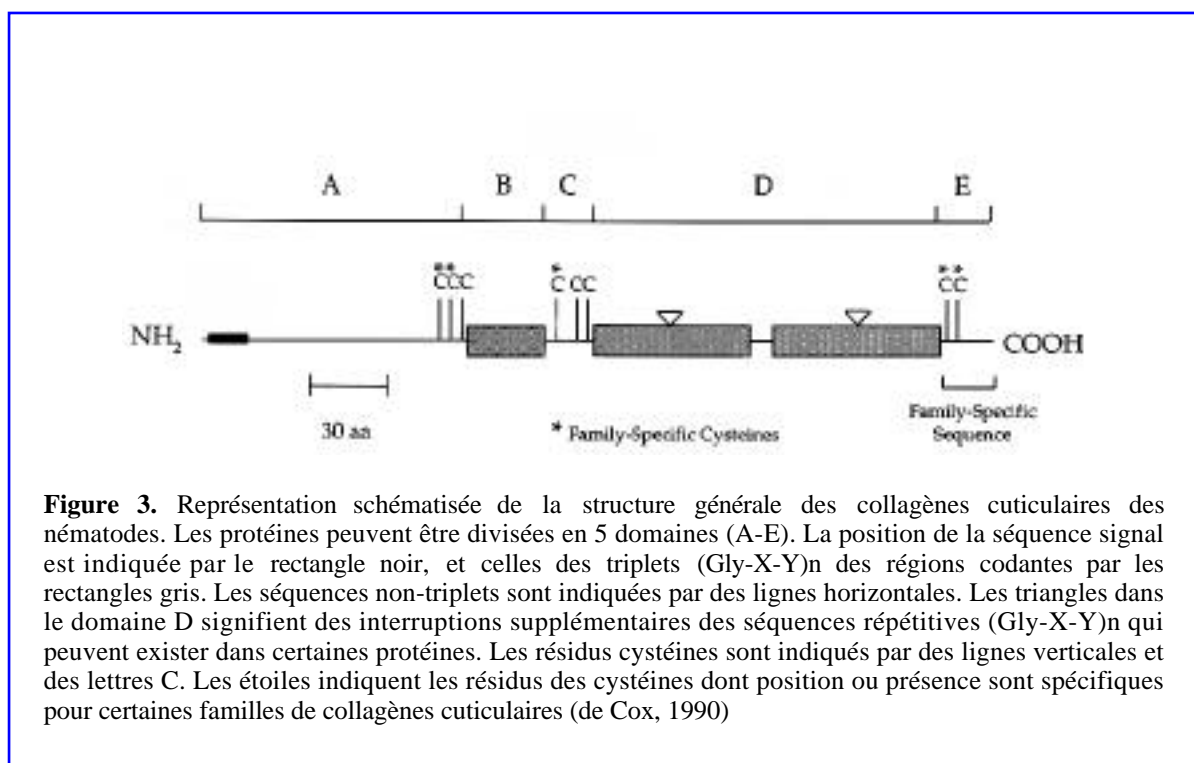
ont un poids moléculaire d'environ 30 kD. Les introns chez *C.elegans* et *H.contortus* sont courts (50-100 pb), mais ils sont plus longs chez *A.suum* dans les deux gènes déjà séquencés. Les positions des introns sont variables, mais les deux introns du gène de collagène 3A3 de *H.contortus* ont des positions identiques à celle de *col-1* et *dpy-13* de *C.elegans*. Cette observation suggère que les gènes de collagène des deux espèces dérivent de leur ancêtre commun avec des introns à ces positions.

Les protéines codées par ces gènes représentent des séquences primaires différentes, mais elles partagent la même structure. Ces protéines sont formées d'environ 300 acides aminés, dont 150 acides aminés font partie des régions répétées (Gly-X-Y)_n. Les protéines peuvent être divisées en 5 domaines (Figure 3). Les tailles de ces domaines sont similaires, mais pas identiques. Chaque protéine contient 2 domaines triple-hélicoidaux (B et D) et trois régions non triple-hélicoidales (A, C, et E). Des cystéines et des tyrosines responsables des ponts se trouvent dans les régions non triple-hélicoidales. Le domaine A possède une longueur plus variable que les autres domaines entre 80 et 146 acides aminés. La séquence riche en acides aminés hydrophobes qui précède le domaine A est probablement la séquence signal nécessaire pour la sécrétion. Le domaine A contient 3 résidus cystéines espacés. La troisième cystéine précède toujours immédiatement le premier triplet (Gly-X-Y) du domaine B. Le domaine B est un domaine triple-hélicoidal court qui est souvent formé de 10 triplets de (Gly-X-Y)_n, mais certaines protéines possèdent 9 ou 11 triplets. La taille du domaine C non triple-hélicoidal varie de 12 à 21 acides aminés, et ce domaine contient 2 résidus cystéines conservés. Certains gènes contiennent un troisième résidu cystéine à une position conservée. Le domaine D triple-hélicoidal contient de 40-42 triplets (Gly-X-Y)_n. Chaque protéine contient 1 ou 2 interruptions près de la région médiane de ce dernier domaine. L'interruption est formée d'un nombre variable d'acides aminés (entre 2 et 8). Ces interruptions peuvent servir à rendre la triple-hélice formée par ces protéines plus flexible, ou bien à construire des ponts avec les polypeptides adjacents, car certaines protéines contiennent des résidus tyrosine dans ces interruptions, comme par exemple *col-8* (Cox et al, 1989). Le domaine final E, non triple-hélicoidal, varie entre 9 à 25 acides aminés et contient des acides aminés responsables de la formation des ponts. Ce domaine contient toujours 2 cystéines légèrement espacées, dont la deuxième constitue parfois l'acide aminé final du domaine D. Le domaine E contient aussi des

résidus conservés des tyrosines et des lysines, souvent près des résidus conservés de cystéines. Une partie du domaine E est présente dans la protéine mature car un anticorps dirigé contre cette partie réagit avec les cuticules purifiées et avec les collagènes extraits des cuticules (Cox et al., 1990).

Il n'est pas connu quelle portion du domaine A est présente dans les protéines matures. Le fait que les protéines matures contiennent approximativement 27 mol% de glycines suggère que le domaine A n'est pas présent entièrement dans ces protéines.

En se basant sur certaine similarité entre les séquences et les structures des protéines, les gènes des collagènes cuticulaires de *C.elegans*, *A.suum*, et *H.contortus*, ont été groupés en 4 familles (Kramer et al., 1982, 1988, et 1990; Von Mende et al., 1988; Cox et al., 1989; Kingston et al., 1989; Shamansky et al., 1989; Park et Kramer 1990).



La cuticuline: Définition et vue générale

La cuticuline est un composant insoluble, non collagèneux de la cuticule des nématodes. Ce composant a été identifié chez *A.lumbricoides* par Fujimoto et Kanaya en 1973, et il a été localisée dans la zone corticale de la cuticule. L'étude par diffraction de rayons X, et celle de la structure de la cuticuline d'*A.lumbricoides* adulte, a montré que ce résidu insoluble est constitué de protéines avec un nombre de liaisons inter- et intra-moléculaires très élevé (Fujimoto et Kanaya, 1973). Ce résidu a montré une forte résistance face à la collagénase, et il est différent des collagènes par d'autres critères. Alors que les collagènes sont liées par des liaisons covalentes avec des ponts disulfures, l'insolubilité de la cuticuline, en présence de détergents et d'agents réducteurs, indique que cette substance contient des liaisons non-réductibles.

La cuticuline d'*A.lumbricoides*, examinée par microscopie électronique, s'est révélée composée de plusieurs couches légères. D'après la première définition de Fujimoto, le terme cuticuline est limité à la zone corticale externe (ou épicuticule) de la cuticule d'*A.lumbricoides* (Fujimoto et Kanaya, 1973). Les structures de la cuticuline isolée d'*A.lumbricoides* (Fujimoto et Kanaya, 1973) et d'*A.suum* (Betschart et al., 1990) sont identiques. Seuls les anticorps préparés contre la cuticuline d'*A.suum* (Betschart et al., 1990, Bisoffi et Betschart, 1996b) ont réagi avec la zone corticale externe (ou épicuticule) d'*A.suum*, les couches denses de la zone corticale d'*Acanthocheilonema viteae* et de *B.pahangi* au stade adulte, ainsi qu'avec la zone corticale d'*Onchocerca volvulus*, mais à une densité faible. L'anticorps monoclonal mAb 8.1 dirigé contre la cuticuline purifiée d'*Ascaris suum*, a permis l'isolation d'un clone d'ADNc dénommé ascut (renommé as-epicut1 dans cette thèse) codant pour la protéine AS-EPICUT1. Cette protéine riche en alanines et en prolines a été immunolocalisée dans l'épicuticule (Bisoffi et Betschart, 1996b). La protéine AS-EPICUT1 répond à la définition de base de la cuticuline qui doit être présente dans l'épicuticule.

Par contre, il semble que certaines études, qui ont utilisé le terme de cuticuline pour des composants insolubles immunolocalisés dans d'autres zones de la cuticule, ne conviennent pas exactement à la définition classique, comme par exemple les protéines CECUT-1 et CECUT-2 (Sebastiano et al., 1991; Lassandro et al., 1994). Bien que les deux protéines CECUT-1 et CECUT-2 de *C.elegans*, qui ont été identifiées comme des composants du résidu insoluble de

la cuticule, ne sont pas des composants de l'épicuticule, elles ont été nommées des cuticulines. La protéine CECUT-1 a été immunolocalisée essentiellement dans le composant fibreux qui forme deux bandes latérales longitudinales dans la cuticule de dauer larvae de *C.elegans* (Sebastiano et al., 1991; Ristoratore et al., 1994; Favre et al., 1998). La protéine CECUT-1 a été légèrement détectée dans la zone corticale de la cuticule de tous les stades de *C.elegans* (Ristoratore et al., 1994) et de la cuticule de dauer larvae de *C.elegans* et *Heterorhabditis* (Favre et al., 1998). Seule la zone corticale externe du stade L1 de *C.elegans* a démontré des épitopes de CECUT-1 et de CECUT-2. Des épitopes de CECUT-2 ont été immunolocalisés dans la couche cellulaire de l'hypoderme (Ristoratore et al., 1994). L'utilisation d'anticorps spécifiques montre la présence d'épitopes communs entre CECUT-1 et la cuticule de *Heterorhabditis* sp. (Favre et al., 1995). D'après des études récentes, les réactions croisées ont montré la présence d'épitopes communs entre les protéines de CECUT-1, ASCUT-1 et CUT-1 de *Heterorhabditis* (Favre et al., 1998). La protéine ASCUT-1 a été immunolocalisée dans l'œuf mature d'*A.lumbricoides* à différents endroits: La matrice de l'œuf, la membrane de l'œuf, l'œuf au stade L1-L2 pendant le début de la formation d'une nouvelle cuticule de L2, la cuticule de L2 et les cellules de l'hypoderme (Favre et al., 1998). Des anticorps préparés contre une région bien conservée d'ASCUT-1 ont permis l'immunolocalisation des épitopes dans la couche médiane de la cuticule de *B.pahangi* pendant le sixième jour de la mue, entre L3 et L4, dans les couches internes de la cuticule chez les microfilaires matures, dans la cuticule des microfilaires immatures dans l'utérus, et dans la couche médiane de la cuticule des femelles et mâles adultes de *B.pahangi* (Lewis et al., 1999).

La composition biochimique de la cuticuline

La cuticuline semble être formée par des liaisons croisées covalentes non-réductibles comme les di- et tri-tyrosines (Fujimoto et al., 1981). Le traitement de la cuticuline avec le ME, ainsi qu'avec l'urée 8M, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 88% acide formique et hydroxide de sodium (NaOH) 0.1M, n'a pas abouti à solubiliser les fragments de la cuticuline (Fujimoto et Kanaya, 1973; Marti, 1991).

Les liaisons covalentes non-réductibles inter- et intra-peptidiques sont de deux types: des liaisons isopeptidiques (-(-glutamyl)lysine et des liaisons latérales de di-tyrosines

(Lustigman, 1993). Les liaisons isopeptidiques ϵ -(-glutamyl)lysine, catalysées par la transglutaminase (TGase), sont essentielles pour le développement de l'embryon et la gaine membranaire des microfilaires de *Litomosoides carinii* et *Brugia malayi* (Mehta et al., 1990) et pour la mue de L3-L4 de la larve infectieuse d'*Onchocerca volvulus* (Lustigman et al., 1995). Les études concernant les liaisons isopeptidiques ϵ -(-glutamyl)lysine et le rôle de la transglutaminase (TGase) dans le développement et la maturation des nématodes ont été largement développées (Chandrashekar et Mehta, 2000). La production d'une épicuticule très mince de la larve L4 chez *Dirofilaria immitis* par inhibition de la TGase pendant la mue de L3-L4, est due probablement à l'inhibition de formation des liaisons croisées entre les molécules de l'épicuticule (Mehta, et al 1992; Chandrashekar et Mehta, 2000).

La présence de l'enzyme (TGase) et des produits de celle-ci a été démontrée chez les filaires de *B.malayi* et chez différentes espèces des nématodes à différents stades de développement (Mehta et al., 1990 et 1992; voir Chandrashekar et Mehta, 2000). L'enzyme TGase sous forme active (pTGase), d'une masse moléculaire de 56 kD, a été purifiée de deux espèces au stade adulte, *B.malayi* et *D.immitis*. Une étude biochimique suggère que les pTGases de ces espèces sont similaires mais différentes des pTGases de mammifères. L'étude de Chandrashekar et al. (1998) sur l'ADNc codant pour une forme active de TGase chez *D.immitis* montre que la TGase (rDiTG) recombinante est capable de rendre à une RNase dénaturée sa forme active, une activité liée normalement à la protéine disulfure isomérase (PDI) et à d'autres protéines liées à la PDI.

La composition en acides aminés des préparations de cuticuline purifiée, montre la présence de plus de 30 mol % de proline et 15 mol % de glycine et d'alanine approximativement (Fujimoto et Kanaya, 1973). Plusieurs tentatives ont été réalisées afin de solubiliser les fragments des cuticulines d'*Ascaris suum* avec des agents chimiques et enzymatiques. Les préparations de cuticuline ont été digérées et un mélange de peptides correspondants a été obtenu. Les propriétés de charge et d'hydrophobicité de ces peptides sont très similaires. La purification de ces peptides n'a pas été possible, et cette difficulté d'obtenir des peptides purifiés a été expliquée par la présence de séquences répétitives (Marti, 1991). Des peptides contenant chacun 15 acides aminés ont été séquencés, ces peptides montrent chacun deux régions avec plus de 4 prolines (Marti, 1991). A cause des fortes liaisons croisées dans la cuticuline,

l'isolement de fragments spécifiques était difficile. Dans des conditions alcalines, la cuticuline montre une coloration brune. En utilisant des méthodes de chromatographie, des dityrosines, isodityrosines, trityrosines et isotrityrosines ont été identifiées comme des liaisons croisées (Marti, 1991). Parise et Pazzicaluppo (1997) ont montré la présence de liaisons croisées de dityrosines entre les protéines simples de CUT-2 de *Caenorhabditis elegans*, et ces liaisons favorisent la formation de complexes de ces polymères avec des masses moléculaires élevées. Une inhibition de ces liaisons en présence d'urée réduit les masses moléculaires de ces protéines. Cette inhibition suggère que les interactions hydrophobes sont importantes pour la formation et la stabilisation de ces complexes (Parise et Pazzicaluppo, 1997).

Etudes génétiques de la cuticuline

Les méthodes immunologiques et génétiques réalisées sur la cuticuline ont permis d'isoler et de caractériser des gènes qui interviennent dans la synthèse de la zone corticale de la cuticule des nématodes.

La préparation d'anticorps dirigés contre la cuticuline (résidu insoluble) d'*A.suum* au stade adulte, a permis l'isolation à partir d'une librairie d'ADNc d'*A.suum* adulte, d'un ADNc codant pour une protéine ASCUT ou AS-EPICUT1. Cette protéine immunolocalisée dans la partie supérieure de la zone corticale externe, intervient dans la formation du complexe structural insoluble de la cuticule (Betschart et al., 1990; Bisoffi et Betschart, 1996b). Le clone isolé, contenant la séquence de la cuticuline ascut (renommée as-epicut1 dans cette thèse), est constitué de régions répétitives. Une recherche dans les banques de données n'a pas révélé d'homologie avec d'autres séquences.

Deux gènes de *C.elegans* nommés cut-1 et cut-2 ont été identifiés et clonés (Sebastiano et al., 1991; Lassandro et al., 1994). Le gène cut-1 codant pour une protéine de 40 kD est exprimé spécialement pendant la formation de dauer larvae.

A partir des sondes de cut-1 de *C.elegans*, le gène cut-1 a été isolé et caractérisé chez le nématode parasite des plantes *Meloidogyne artiellia* (De Luca et al., 1994). Cette étude montre une homologie importante du gène cut-1 dans les deux différentes espèces, mais l'organisation génétique de cut-1 dans le génome de *Meloidogyne artiellia* est différente de celle de *C.elegans*.

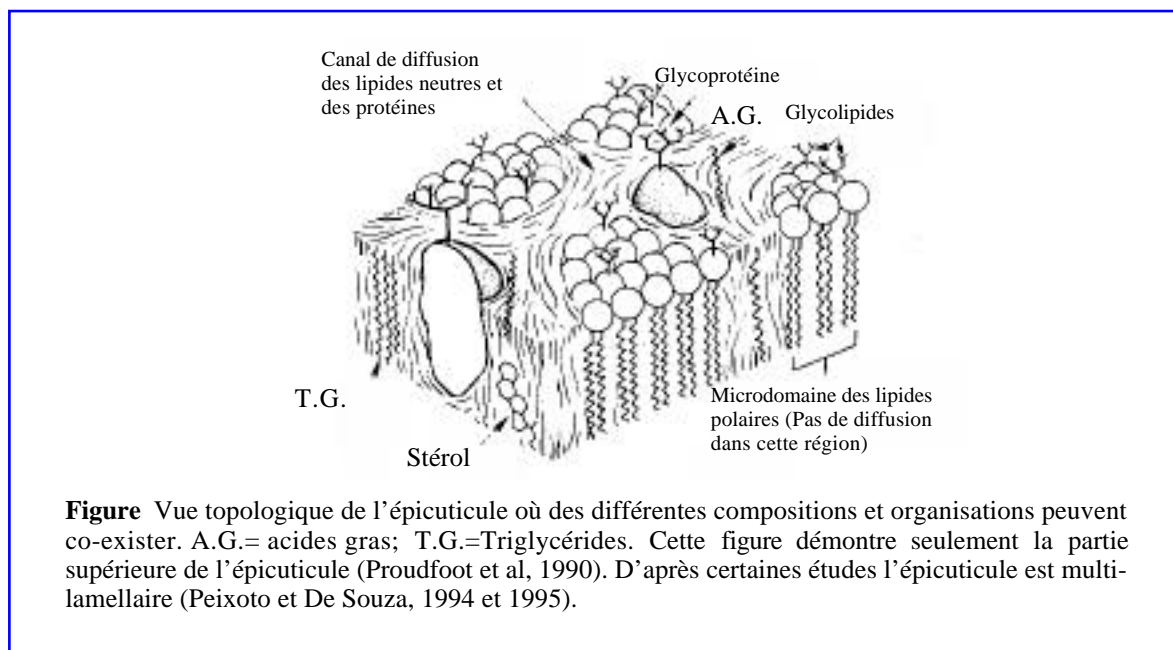
Trois fragments génomiques homologues à cut-1 de *C.elegans* ont été identifiés chez le nématode intestinal *A.lumbricoides* (D'Auria et al., 1998). Deux de ces fragments sont localisés dans une même région du génome et sont séparés par 8-9 kb, et ils possèdent une orientation opposée et une direction de transcription convergente. Le troisième gène a été complètement séquencé et analysé, et la protéine correspondante a été exprimée. Cette étude a montré une homologie importante entre cut-1 de *C.elegans* et cut-1 d'*Ascaris lumbricoides* (D'Auria et al., 1998). La détection d'épitopes de CUT-1 communs dans les deux espèces des nématodes, *A.lumbricoides* (œufs matures), et *C.elegans* (dauer larvae) indique que les gènes cut-1 et les protéines correspondantes sont conservés entre les divers espèces (Favre et al., 1998). Le gène cut-1 a été identifié également dans les deux espèces *B.pahangi* et *B.malayi* (Lewis et al., 1999).

L'épicuticule: Morphologie et aspects biochimiques

L'épicuticule constitue la surface structurale externe de la cuticule, elle est riche en composants lipidiques et contient des cuticulines et d'autres constituants protéiques (Proudfoot et al., 1990).

Certaines études ont comparé l'épicuticule à la membrane cellulaire (Himmelhoch et al., 1977; Himmelhoch et Zuckerman, 1978), à cause de sa rétention du rouge de ruthénium et de la charge négative de la surface externe (Hudson et Kitts, 1971). Certaines données supportent cette idée qui lie l'épicuticule à la membrane cellulaire (Wright, 1976), dont des invaginations de la surface externe pénètrent dans la cuticule en traversant: la zone corticale, médiane et basale, pour former une liaison étroite avec l'hypoderme dans certains endroits comme la région orale, l'anus, et les pores excréteurs.

Les composants lipidiques épicuticulaires sont arrangés dans une structure trilamellaire osmiophile et cette structure a été comparée à la membrane plasmique (Bird, 1980). Par contre d'autres chercheurs ont montré que les propriétés de structure de l'épicuticule sont clairement différentes de celles de la membrane plasmique (Proudfoot et al, 1990, Figure 4; Maizels et al, 1993).



L'analyse morphologique de la cuticule de *C.elegans* a montré que l'épicuticule est une couche trilamellaire, entourée par une couche ondulée qui représente la surface externe (Peixoto et De Souza, 1994 et 1995). Cette structure épicuticulaire est remplacée par une autre chez *Wuchereria bancrofti* où l'épicuticule s'est révélée comme une structure membranaire heptalamellaire et non trilamellaire (De Souza et al., 1993). L'épicuticule, qui d'après ces études ressemble à une membrane, est toujours présente sur la surface de la cuticule de *C.elegans* (Peixoto et De Souza, 1995). Chez *C.elegans*, la structure épicuticulaire est formée de deux faces, la face interne qui contient un nombre des particules, et la face externe toujours lisse chez les adultes, mais légèrement granuleuse chez les dauers (Peixoto et De Souza, 1994 et 1995). Dans certaines sections, deux types de particules ont été trouvés sur la face externe de l'épicuticule de la larve L4 et de l'adulte de *C.elegans*. Une matrice composée d'un réseau des structures globuleuses et filamenteuses se trouve dans l'espace occupé entre ces deux faces, qui probablement contient de l'eau chez les larves L4 et les adultes de *C.elegans* (Peixoto et De Souza, 1995).

Trois classes de lipides de la surface, distinguées par leur différente hydrophobicité, ont été trouvées dans l'épicuticule de *C.elegans*, les lipides non polaires comme les triglycérides et les esters de cholestérols, les lipides polaires comme les phospholipides (phosphatidylcholine et phosphatidylethanolamine), et les glycolipides (Blaxter, 1993a). Il a été indiqué que l'antigène

constitué de la polyprotéine gp 15/400 (l'antigène proximal de la surface de *Brugia malayi*) lie les lipides acides et les rétinoïdes. Le rôle de cette protéine dans la fixation des lipides aux composants lipidiques de la surface de la cuticule reste à prouver (Kennedy et al., 1995).

Aspects immunologiques de la surface des nématodes

Chez les nématodes libres, la surface externe joue un rôle dans la lubrification et la protection contre l'abrasion, la déshydratation et la prédation. Les nématodes du sol sont exposés aux champignons nématophages qui reconnaissent la surface des nématodes par l'intermédiaire de lectines. Ceci est dû à la diversité d'expression de carbohydrates à la surface de ces nématodes. En plus de ces propriétés de base, la surface a été adaptée par les espèces parasitaires pour assurer de nouvelles fonctions. Les espèces parasitaires des plantes sécrètent des substances pour changer l'environnement de leur hôte (Jones, 1981).

Des antigènes de surface ont été identifiés comme immunogènes importants chez plusieurs espèces de nématodes parasitaires. Il est devenu évident que les réactions immunitaires sont liées à des substances telles que des glycoprotéines sécrétées directement dans le voisinage de la surface. Ces substances ne sont pas sécrétées par l'épiderme ou la couche hypodermique, mais par des glandes excrétrices dorsales de l'œsophage et passent à l'extérieur du nématode par des pores ou par l'œsophage (Bird et Bird, 1991; Nelson et Riddle, 1984). Les produits excrétés et sécrétés sont des immunogènes puissants qui jouent des rôles importants dans les interactions avec l'hôte (Maizels, 1988).

Toutes ces études ne montrent aucune réaction immunitaire dirigée directement contre la surface structurale de la cuticule. Les antigènes déjà vérifiés et déterminés sont tous liés à des sécrétions par les nématodes parasitaires dans leur environnement, par exemple, les polyprotéines antigéniques / allergéniques de la surface gp15/400 (McReynolds, 1993). Les antigènes de surface pourraient être utilisés pour le diagnostic parasitaire ou pour la production des vaccins. Récemment des études sur la réponse immunitaire cellulaire inflammatoire contre une infection primaire par *Brugia* consistaient à déterminer la capacité antigénique de 4 protéines de surface, BpL4, la glutathione peroxidase gp29, la "heat shock protein (hsp) 70", et les chitinases des filaires (Rao et al., 1999). Ces analyses indiquent que la protéine gp29 peut constituer un part du complexe antigénique qui induit une réponse

immunitaire primaire. Harrison (1999) a montré que la chitinase d'*Onchocerca volvulus* peut induire une protection partielle contre les larves L3 chez les souris. Parmi les protéines excrétées à la surface des nématodes, la chitinase a été proposée comme vaccin par plusieurs chercheurs (Shahabuddin, 1993 et 1995; Adam et al., 1996). Grâce à sa capacité antigénique élevée, la chitinase a induit une protection élevée contre une infection d'*A.viteae* chez les mérions (Adam et al., 1996). Wang et al. (1999) ont démontré que la chitinase peut être utilisée comme antigène pour le diagnostic sérologique et la surveillance de la filariose lymphatique.

Les analyses détaillées de la structure de la surface des nématodes en utilisant les techniques de marquage radioactive, ont démontré que l'activité spécifique la plus élevée de l'iode radioactif est incorporée dans le matériel insoluble des cuticules (Betschart et Jenkins, 1987). Au cours de différentes extractions cuticulaires en utilisant le SDS et le -ME, à partir de l'espèce parasitaire *Dipetalonema viteae*, les composants somatiques ont été éliminés et tous les collagènes des cuticules ont été extraits dans des conditions réductrices afin de récupérer un résidu pur de cuticuline (Betschart et al., 1985). Toutes ces préparations cuticulaires n'ont pas permis d'obtenir des anticorps qui reconnaissent la surface structurale des cuticules (ou l'épicuticule) au stade adulte, car les anticorps préparés à partir des différentes extractions réagissaient avec les couches des collagènes. D'après ces études, il semble difficile d'obtenir une quantité de cuticuline suffisamment pure en utilisant cette espèce, et le résidu insoluble a toujours été contaminé par les collagènes. Par l'utilisation de vers adultes d'*A.suum*, une purification de la cuticuline avec un degré élevé de pureté, est devenue possible avec des agents réducteurs et de la collagénase. Les anticorps produits contre ces préparations montrent une spécificité élevée à la cuticuline (Betschart et al., 1990; Marti, 1991). Des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de la cuticuline d'*A.suum* ont été aussi préparés. Dans tous les cas, les anticorps anti-cuticuline ne réagissent pas avec la surface externe de la cuticule. Le manque d'immunogénicité et d'antigénicité de la surface de la cuticule a été mentionné dans les études précédentes et a été confirmé dans les études de Betschart et al. (1990). Mais cette dernière préparation d'anticorps, dirigés contre la cuticuline d'*A.suum* au stade adulte, a permis l'isolation pour la première fois, à partir d'une librairie d'ADNc d'*A.suum* adulte, d'une séquence codant pour une protéine de l'épicuticule, nommé ASCUT ou AS-EPICUT1. Cette protéine est la première protéine identifiée comme un composant de la

partie supérieure de la couche corticale externe, mais pas de la surface exposée de la cuticule (Betschart et al., 1990; Bisoffi et Betschart, 1996b).

Bibliographie

- Adam R., Kaltmann B., Rudin W., Friedrich T., Marti T., and Lucius R. (1996) Identification of Chitinase as the Immunodominant Filarial Antigen Recognized by Sera of Vaccinated Rodents. *The Journal of Biological Chemistry* 271(3), 1441-1447
- Anderson T.J.C., Romero-Abal M.E., and Jaenike J. (1993) Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. *Parasitology* 107, 319-334
- Anderson T.J.C., and Jaenike J. (1997) Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. *Parasitology* 115, 325-342
- Betschart B., Marti S., and Glaser M. (1990) Antibodies against the cuticlin of *Ascaris suum* cross-react with epicuticular structures of filarial parasites. *Acta Tropica* 47, 331-338
- Betschart B., and Wyss K. (1990) Analysis of the cuticular collagens of *Ascaris suum*. *Acta Tropica* 47, 297-305
- Betschart B., and Jenkins J.M. (1987) Distribution of iodinated proteins in *Dipetalonema viteae* after surface labelling. *Molecular and Biochemical Parasitology* 22(1), 1-8.
- Betschart B., Rudin W., and Weiss N. (1985) The isolation and immunogenicity of the cuticle of *Dipetalonema viteae*. *Parasitenkunde* 71, 87-95
- Bird A.F., and Bird J. (1991) The structure of nematodes, pp 44-77. Academic Press, San Diego.
- Bird A. F., (1980) The nematode cuticle and its surface, Nematodes Biological Models, volume 2, 213-236
- Bird A.F., and McClure M.A. (1976) The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. *Parasitology* 72, 19-28
- Bird A.F. (1971). The structure of nematodes. Academic Press, New York, pp 318
- Bisoffi M., and Betschart B.(1996a) Identification and sequence comparison of a cuticular collagen of *Brugia pahangi*. *Parasitology* 113, 145-155
- Bisoffi M., and Betschart B. (1996b) Repetitive peptide motifs in the cuticlin of *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80, 55-64

- Blaxter M.L., Ley P.D., Gary J.R., Liu L.X., Scheldenman P., Vierstraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., and Thomas W.K. (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum nematoda. *Nature* 392, 71-75
- Blaxter M.L., (1996) Protein motifs in filarial chitinases. *Parasitology Today* 12(1), 42
- Blaxter M.L. (1993a) Cuticle surface proteins of wild type and mutant *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* 268(9), 6600-6609
- Blaxter M.L. (1993b) Nemoglobins: Divergent nematode globins. *Parasitology Today* 9(10), 353-360
- Blaxter M.L., Page A.P., Rudin W., and Maizels R.M., (1992) Nematode surface coats: Actively evading immunity. *Parasitology Today* 8(7), 243-247
- Brydon L.J., Gooday G.W., Chapell L.H., and King T.P. (1987) Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 25, 267-272
- Butkowski R.J., Langeveld J.P., Wieslander J., Hamilton J., and Hudson B.G. (1987) Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *The Journal of Biological Chemistry* 262(16), 7874-7.
- Campbell W.C. (1985) Ivermectin: An update. *Parasitology Today* 1, 10-16
- Chandrashkar R., and Mehta K. (2000) Transglutaminase-catalysed Reactions in the Growth, Maturation and development of Parasitic Nematodes. *Parasitology Today* 16(1), 11-17
- Chandrashkar R., Tsuji N., Morales T., Ozols V., and Mehta K. (1998) An Erp60-like protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis* has both transglutaminase and protein disulfide isomerase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 531-536
- Cox N., (1992) Molecular and Biochemical aspects of nematode collagens. *The Journal of Parasitology* 78(1), 1-15
- Cox N.G.(1990) Molecular biology of the cuticle collagen gene families of *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. *Acta Tropica* 47, 269-281
- Cox G.N., Fields C, Kramer J.M., Rosenzweig B, and Hirsh D. (1989) Sequence comparisons of developmentally regulated collagen genes of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 76(2), 331-44.
- Cox G.N., Kramer J.M., and Hirsh D. (1984) Number and organization of collagen genes in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Cellular Parasitology* 4, 2389-2395

- Cox G.N., Straprans S., and Edgar R.S. (1981a) The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. II. Stage-specific changes in Ultrastructure and Protein Composition during Postembryonic Development. *Developmental Biology* 86, 456-470
- Cox N.G., Kusch M., Denevi K., and Edgar R.S.(1981b) Temporal regulation of cuticle synthesis during development of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 84: 277-285
- Crompton D.W.T (1989) Biology of *Ascaris lumbricoides*. In: Ascariasis and its prevention and control (Crompton, D.W.T, Nesheim M.C., and Pawlowski, Z.S., eds.), pp 9-44. Taylor & Francis, London.
- D'Auria S., Rossi M., Tanfani F., Bertoli E., Parise G., and Bazzicaluppo P. (1998) Structural analysis of ASCUT-1, a protein component of the cuticle of the parasitic nematode *Ascaris lumbricoides*. *European Journal of Biochemistry* 255, 588-594
- Davis A. (1985) Ascariasis: drugs and drugs policy. In: Ascariasis and its public health significance (Crompton, D.W.T, Nesheim M.C., and Pawlowski, Z.S., eds.), pp 239-244. Taylor & Francis, London.
- DeGrisse A.T. (1977). De ultrastructuur van het zenuwstelsel in de kop van 22 soorten planten parasitaire nematoden, behorende tot 19 genera (Nematoda: Tylenchida). Rijksuniversiteit, Ghent, Belgium.
- De Luca F., De Giorgi C., and Lamberti F. (1994) Cuticlin gene organization in *Meloidogyne Artiellia*. *Advances in Molecular Plant Nematology* (F.Lamberti et al., eds, Plenum Press, New York)
- Denham D.A. (1987) The cat infected with *Brugia pahangi* as a model of human filariasis. *Ciba Foundation Symposium* 127, 225-235
- De Souza W., Souto-Padron T., Dreyer G., and Andrade L.D. (1993) *Wuchereria bancrofti*: freeze-fracture study of the epicuticle of microfilariae. *Experimental Parasitology* 76, 287-290
- Dissanayake S., Perler F.B., Xu M., Southworth M.W., Yee C.K., Wang S., Dreyer G., Watawana L., Kurniawan L., Fuhrman J.A., et al. (1995) Differential recognition of microfilarial chitinase, a transmission-blocking vaccine candidate antigen, by sera from patients with Brugian and Bancroftian filariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53(3), 289-94.
- Edeson J.F.B., Wilson T., wharton R.H., and Liang A.B.G. (1960) Experimental transmission of *Brugia malayi* and *brugia pahangi* to man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 229-234

- Edwards M.K., Busto P., James E.R., Carlow C.K.S., and Philipp M. (1990) Antigenic and dynamic properties of the surface of *Onchocerca* microfilariae. *Tropical Medicine and Parasitology* 41, 174-180
- Favre R., Cermola M., Nunes C. P., Hermann R., Müller M., and Bazzicalupo P. (1998) Immuno-Cross-Reactivity of CUT-1 and cuticlin epitopes between *Ascaris lumbricoides*, *Caenorhabditis elegans*, and *Heterorhabditis*. *Journal of Structural Biology* 123, 1-7
- Favre R., Hermann, R., Cermola M., Hohenberg H., Muller M., and Bazzicalupo P. (1995) Immuno-gold-labelling of CUT-1, CUT-2 and cuticlin epitopes in *Caenorhabditis elegans*, and *Heterorhabditis sp* processed by high pressure freezing and freeze-substitution. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 27, 341-347
- Fetterer R.H., and Urban JR, J.F. (1988) Developmental changes in cuticular proteins of *Ascaris suum*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90B, 321-327
- Fuhrman J.A., Lee J., Dalamagas D. (1995) Structure and function of a family of chitinase isozymes from Brugian microfilariae. *Experimental Parasitology* 80(4), 672-80.
- Fuhrman J.A., Lane W.S., Smith R.F., Piessens W.F., and Perler F.B. (1992) Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 1548-1552
- Fuhrman J.A., and Piessens W.F. (1989) A stage-specific calcium-binding protein from microfilariae of *Brugia malayi* (Filariidae). *Molecular and Biochemical Parasitology* 35(3), 249-57.
- Fuhrman J.A., Urioste S.S., Hamill B., Spielman A., and Piessens W.F. (1987) Functional and antigenic maturation of *Brugia malayi* microfilariae. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36(1), 70-4.
- Fuhrman J.A., and Piessens W.F. (1985) Chitin synthesis and sheath morphogenesis in *Brugia malayi* microfilariae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 17, 93-104
- Fujimoto D., Hortiuchi K., and HIRAMA M. (1981) Isotriptyrosine, a new crosslinking amino acid isolated from *Ascaris* cuticle collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 99, 617-623
- Fujimoto D., and Kanaya S. (1973) Cuticlin: A noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 157, 1-6
- Glanville R.W. (1987) Type IV collagen. In structure and fonction of collagen types, R. Mayne and R.E. Burgeson (eds.). Academic Press, Orlando, Florida, P. 43-79

- Gooday G.W., Brydon L.J., and Chappell L.H., (1988) Chitinase in female *Onchocerca gibsoni* and its inhibition by allosamidin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 29, 223-225
- Guo X.D., and Kramer J.M. (1989) The two *Caenorhabditis elegans* basement membrane (type IV) collagen genes are located on separate chromosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 264(29), 17574-82.
- Hamilton R.G. (1985) Application of immunoassay methods in the serodiagnosis of human filariasis. *Reviews of Infections Diseases* 7, 837-843
- Harrison R.A., Wu Y., Egerton G., and Bianco A.E. (1999) DNA immunisation with *Onchocerca volvulus* chitinase induces partial protection against challenge infection with L3 larvae in mice. *Vaccine* 12(18), 647-655
- Himmelhoch S., and Zuckerman B.M. (1978) *Caenorhabditis briggsae*: aging and the structural turnover of the outer cuticle surface and the intestine. *Experimental Parasitology* 45(2), 208-214.
- Himmelhoch S., Kisiel M.J., and Zuckerman B.M. (1977) *Caenorhabditis briggsae*: electron microscope analysis of changes in negative surface charge density of the outer cuticular membrane. *Experimental Parasitology* 41(1), 118-23.
- Hodgkin J., Horvitz H.R., Jasný B.R., and Kimble J. (1998) *C.elegans*: Sequence to Biology. *Science* 282, 2011-2017
- Hostikka S.L., Eddy R.L., Byers M.G., Hoyhtya M., Shows T.B., and Tryggvason K. (1990) Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87(4), 1606-10.
- Hostikka S.L., and Tryggvason K. (1988) The complete primary structure of the alpha 2 chain of human type IV collagen and comparison with the alpha 1(IV) chain. *The Journal of Biological Chemistry* 263(36), 19488-93.
- Huber M., Cabib E., and Miller L.H. (1991) Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88(7), 2807-10
- Hudson R.J., Kitts W.D. (1971) Electrostatic forces affecting in vitro adherence of polymorphonuclear leukocytes to the cuticle of *Protostrongylus* larvae (Nematoda). *Journal of Parasitology* 57(4), 808-14.
- Jones M.G.K. (1981) In: *Plant Parasitic Nematodes* (Zuckerman, B.M. and Rohde, R.A., eds), pp 255-279, Academic Press

- Josse J., and Harrington W.F. (1964) Role of pyrrolidine residues in the structure and stabilization of collagen. *Journal of Molecular Biology* 9, 269-287
- Kennedy M.W., Allen J.E., Wright A.S., McCrudden A.B., and Cooper A. (1995) The gp15 / 400 polyprotein antigen of *Brugia malayi* binds fatty acids and retinoids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 71, 41-50
- Kilama W.L. (1989) Sanitation in the control of ascariasis. In: Ascariasis and its prevention and control (Crompton, D.W.T., Nesheim M.C., and Pawlowski, Z.S., eds.), pp 289-300. Taylor & Francis, London.
- Kingston I.B., Wainwright S.M., and Cooper D. (1989) Comparison of collagen gene sequences of *Ascaris suum* and *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Biochemical parasitology* 37, 137-146
- Klonisch T., Bardehle G., Linder D., Boschek B., Schott H.H., Zahner H., and Stirm S. (1991) The sheaths of *Brugia microfilariae*: isolation and composition. *Parasitology Research* 77(5), 448-51.
- Kofie B.A.K., and Dipeolu O.O. (1983) A study of human and porcine ascariasis in a rural area of south-west Nigeria. *Intestinal Journal of Zoonoses* 10, 66-70
- Kramer J.M., (1994) Structures and functions of collagens in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal* 8, 329-336
- Kramer J.M., French, R.P., Park, E.C., and Johnson, J.J. (1990) The *Caenorhabditis elegans* *rol-6* gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Molecular and Cellular Biology* 10, 2081-2089
- Kramer J.M., Johnson J.J., Edgar R.S., Basch C., and Roberts S. (1988) The *sqt-1* gene of *C. elegans* encodes a collagen critical for organismal morphogenesis. *Cell*. 55(4), 555-65.
- Kramer J.M., Cox G.N., and Hirsh D. (1982) Comparisons of the complete sequences of two collagen genes from *Caenorhabditis elegans*. *Cell*. 30(2), 599-606.
- Lassandro F., Sebastiano M., Zei F., and Bazzicalupo P. (1994) The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 65, 147-159
- Lee D.L., Wright K.A., and Shivers R.R. (1993), A freeze-fracture study of the cuticle of adult *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda). *Parasitology* 107, 545-552
- Lee D.L., and Atkinson H. J. (1976). "Physiology of nematodes." Macmillan, New York.
- Lewis E., Hunter S.J., Tetley L., Nunes C.P., Bazzicalupo P., and Devaney E. (1999) cut-1-like genes are present in the filarial nematodes, *Brugia pahangi* and *Brugia malayi*, and , as

- in other nematodes, code for components of the cuticule. *Molecular and Biochemical Parasitology* 101, 173-183
- Lustigman S., Brotman B., Huima T., Castelhana A.L., Singh R.N., Mehta K., and Prince A.M. (1995) Transglutaminase-catalyzed reaction is important for molting of *Onchocerca volvulus* third-stage larvae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(9), 1913-1919.
- Lustigman S. (1993) Molting, Enzymes and New Targets for Chemotherapy of *Onchocerca volvulus*. *Parasitology Today* 9, 294-297
- Lustigman S., Huima T., Brotman B., Miller K., and Prince A.M. (1990) *Onchocerca volvulus*: biochemical and morphological characteristics of the surface of third- and fourth-stage larvae. *Experimental Parasitology* 71(4), 489-95.
- Mackenzie C.D., Preston P.M., and Ogilvie B.M. (1978) Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. *Nature* 276, 826-828
- McReynolds L.A., Kennedy M.W., and Selkirk M.E. (1993) The polyprotein Allergens of Nematodes. *Parasitology Today* 9, 403-406
- Maizels R.M., Blaxter M., and Selkirk M.E. (1993) Forms and functions of nematode surfaces. *Experimental Parasitology* 77, 380-384
- Maizels R.M., and Selkirk M.E. (1988) Immunobiology of nematode antigens. In: *The Biology of Parasitism* (Englund, P.T., and Sher, A., eds.), pp 285-308. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Maizels R.M., De Savigny D., and Ogilvie B.M. (1984) Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunology* 6, 23-37
- Maizels R.M., Partono F., Oemijati S., and Ogilvie B.M. (1983a) Antigenic analysis of *Brugia timori*, a filarial nematode of man: initial characterization by surface radioiodination and evaluation of diagnostic potential. *Clinical and Experimental Immunology* 51, 269-277
- Maizels R.M., Meghji M., and Ogilvie B.M. (1983b) Restricted sites of parasite antigens from the surface of different stages and sexes of the nematode parasite *Nippostrangylus brasiliensis*. *Immunology* 48, 107-121
- Manson-Bahr P.E.C., and Bell D.R. (1987) Filariasis. In: *Manson's Tropical Diseases* (nineteenth edition), Baillière Tindall, London.
- Marti S. (1991) Biochemische und immunologische charakterisierung von cuticlin, einem strukturprotein aus der kutikula von *Ascaris suum*. Thesis, Basel.

- Martinez A.B., and De Souza W. (1997) A freeze-fracture and deep-etch study of the cuticle and hypodermis of infective larvae of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). *International Journal for Parasitology* 27(3), 289-297
- Maudlin I. (1991) In: *Advances in Disease Vector research* (Vol.7) (Harris, K.F., ed.), pp 117-148, Springer-Verlag
- McBride O.W., and Harrington W.F. (1967a) *Ascaris* cuticle collagen: On the disulfide cross-linkages and molecular properties of the subunits. *Biochemistry* 6, 1484-1498
- Mehlhorn H. (1988) *Parasitology in Focus. Facts and Trends* (Mehlhorn, H., ed.), Springer-Verlag, Heidelberg
- Mehta K., Rao U.R., Vickery A.C., and Fesus L. (1992) Identification of a novel transglutaminase from the filarial parasite *Brugia malayi* and its role in growth and development. *Molecular and Biochemical Parasitology* 53(1-2), 1-15.
- Mehta K., Rao U.R., Vickery A.C., and Birckbichler P.J. (1990) Significance of transglutaminase-catalyzed reactions in growth and development of filarial parasite, *Brugia malayi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173(3), 1051-1057.
- Nelson F.K. and Riddle D.L. (1984) Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *The Journal of Experimental Zoology* 231, 45-56
- Nesheim, M.C. (1989) Ascariasis and human nutrition. In: *Ascariasis and its prevention and control* (Crompton, D.W.T., Nesheim M.C., and Pawlowski, Z.S., eds.), pp 87-100. Taylor & Francis, London.
- Neuhaus J.M. (1999) *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, (Datta, S.K., Muthukrishnan, S. eds.) CRC Press LLC.
- Neville A.C. (1975). "Biology of arthropod cuticle." Springer-Verlag, Berlin and New York.
- Nichols R.L. (1956) The etiology of visceral larva migrans II. Comparative larval morphology of *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Ancylostoma caninum*. *Journal of Parasitology* 42, 363-399
- Nickle W.R. (1991) Editor "Manual of agricultural Nematology" Marcel Dekker New York.
- Noelken M.E., Wisdom B.J., Dean D.C., Hung C.-H., and Hudson B.G. (1986) Intestinal basement membrane of *Ascaris suum*. Molecular organization and properties of the collagen molecules. *Journal of Biological Chemistry* 261, 4706-4714
- Organisation Mondiale de la Santé. Filariose lymphatique. Cinquième rapport du Comité OMS d'experts, OMS, Genève, série de rapports techniques n° 821, 1991.

- Onchocerciasis Control Programme (OCP) / World Health Organization. (1997) OCP: Facts and History (<http://www.who.int/ocp>)
- Parise G., and Bazzicalupo P. (1997) Assembly of nematode cuticle: role of hydrophobic interactions in CUT-2 cross-linking. *Biochimica et Biophysica Acta* 1337, 295-301
- Park Y.S., and Kramer J.M. (1990) Tandemly duplicated *Caenorhabditis elegans* collagen genes differ in their modes of splicing. *Journal of Molecular Biology* 211(2), 395-406.
- Pawlowski Z.S., and Davis A. (1989) Morbidity and mortality in ascariasis. In: Ascariasis and its prevention and control (Crompton, D.W.T., Nesheim M.C., and Pawlowski, Z.S., eds.), pp 71-86. Taylor & Francis, London.
- Peixoto C.A., Kramer J.M., and De Souza W. (1997) *Caenorhabditis elegans* Cuticle: A description of new elements of the fibrous layer. *Journal of Parasitology* 83(3), 368-373
- Peixoto C.A., and De Souza W. (1995) Freeze -fature and deep-etch view of the cuticle of adult forms of *Caenorhabditis elegans*. *Tissue Cell* 27, 561-568
- Peixoto C.A., and De Souza W. (1994) Freeze -fature characterization of the cuticle of adult and dauer forms of *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology Research* 80, 53-57
- Peixoto C.A., and De Souza W. (1992) Cytochemical characterization of the cuticle of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditoidea). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 24, 425-435
- Peng W., Anderson T.J.C., Zhou X., and Kennedy M.W. (1998) Genetic variation in sympatric *Ascaris* populations from humans and pigs in China. *Parasitology* 117, 355-361
- Perrakis A., Wilson S.K., Chet I., B. Oppenheim A., and E. Vorgias C. (1993) Phylogenetic relationships of chitinases. R.A.A. Muzzarelli, ed., Chitin Enzymology. Eur. Chitin Soc., Ancona.
- Peters W. (1992) Peritrophic membranes. Zoophysiology (Vol.30), Springer-Verlag.
- Phiri, J., and Ham, P.J. (1990) Enhanced migration of *Brugia pahangi* microfilariae through the mosquito mid-gut following N-acetyl-D-glucosamine ingestion. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene* 84, 462
- Piessens W.F., Fuhrman J.A., and Vickery A.C. (1990) Immunology of lymphatic filariasis. In: Modern Parasite Biology, Cellular, Immunological, and Molecular aspects (Wyler, D.J., ed.), pp289-311. W.H. Freeman and Company, New York.
- Poiner G.O., and Hess R. (1977) *Romanomermis culicivorax*: Morphological Evidence of Transcuticular Uptake. *Experimental Parasitology* 42, 27-33

- Politz S.M., and Philipp M. (1992) *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes a focus on the cuticle. *Parasitology Today* 8, 6-12
- Politz J.C., and Edgar R.S. (1984) Overlapping stage-specific sets of numerous small collagenous polypeptides are translated in vitro from *Caenorhabditis elegans* RNA. *Cell* 37(3), 853-60.
- Proudfoot L., Kusel J.R., Smith H.V., Harnett W., Worms M.J., and Kennedy M.W. (1990) The surface lipid of parasitic nematodes: organization, and modifications during transition to the mammalian host environment. *Acta Tropica* 47(5-6), 323-30.
- Rao U.R., Nasarre C., Coleman S.U., Horohov D.W., and Klei T.R. (1999) Granulomatous inflammatory response to recombinant filarial proteins of *Brugia* species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60(2), 251-254
- Rao U.R. Mehta K., Subrahmanyam D., and Vickery A.C. (1991) *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*: antifilarial activity of transglutaminase inhibitors in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 2219-2224
- Reddigari S.R., Jansma P.L., Premachandran D., and Hussey R.H. (1986) Cuticular collagenous proteins of second-stage juveniles and adult females of *Meloidogyne incognita*: Isolation and partial characterization. *Journal of Nematology* 18, 294-302
- Renkema G.H., Boot R.G., Au F.L., Donker-Koopman W.E., Strijland A., Muijsers A.O., Hrebicek M., and Aerts J.M. (1998) Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *European Journal of Biochemistry* 251(1-2), 504-9
- Renkema G.H., Boot R.G., Strijland A., Donker-Koopman W.E., van den Berg M., Muijsers A.O., and Aerts J.M. (1997) Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *European Journal of Biochemistry* 244(2), 279-85
- Renkema G.H., Boot R.G., Muijsers A.O., Donker-Koopman W.E., and Aerts J.M. (1995) Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270(5), 2198-202
- Rhoads M.L., and Fetterer R.H. (1994) Purification and characterization of surface-associated proteins from adult *Haemonchus contortus*. *Journal of Parasitology* 80(5), 756-63
- Riding I.L. (1970) Microvilli on the outside of a nematode. *Nature* 226(241), 179-80.
- Ristoratore F., Cermola M., Nola M., Bazzicalupo P., and Favre R. (1994) Ultrastructural immuno-localization of CUT-1 and CUT-2 antigenic sites in the cuticles of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 26(3), 437-443

- Sasser J.N. (1979) Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. *In: Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species). Systematics, Biology and control*, F. Lamberti and Taylor C.E., eds., Academic Press, London.
- Selkirk M.E., Nielsen L., Kelly C., Partono F., Sayers G., and Maizels R.M. (1989) Identification, Synthesis and immunogenicity of cuticular collagens from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 32, 229-246
- Shahabuddin M. (1995) Chitinase as a vaccine. *Parasitology today* 11(2), 46-47
- Shahabuddin M., and Kaslow D.C. (1993) Chitinase: a novel target for blocking parasite transmission. *Parasitology Today* 9(7), 252-255
- Schlein Y., Jacobson R.L., and Shlomai J. (1991) Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings Royal Society of London. series B. Biological Sciences* 245(1313), 121-6
- Scott, A.L., Yenbutr, P., Eisenger, S.W., and Raghavan, N. (1995) Molecular cloning of the cuticular collagen gene Bmcol-2 from *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 70, 221-225
- Sebastiano M., Lassandro F., and Bazzicalupo P. (1991) cut-1 a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a Dauer-specific noncollagenous component of the cuticle. *Developmental Biology* 146, 001-0012
- Shamansky L.M., Pratt D., Boisvenue R.J., and Cox G.N. (1989) Cuticle collagen genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* are highly conserved. *Molecular and Biochemical Parasitology* 37(1), 73-85.
- Sieber K.P., Huber M., Kaslow D., Banks S.M., Torii M., Aikawa M., and Miller L.H. (1991) The peritrophic membrane as a barrier: its penetration by *Plasmodium gallinaceum* and the effect of a monoclonal antibody to ookinetes. *Experimental Parasitology* 72(2), 145-56
- Smith H.V., Quinn R., Kusel J.R., and Girdwood R.W.A. (1981) The effect of temperature and antimetabolites on antibody binding to the outer surface of second stage *Toxocara canis* larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 4, 183-193
- Soininen R., Haka-Risku T., Prockop D.J., and Tryggvason K. (1987) Complete primary structure of the 1-chain of human basement membrane (type IV) collagen. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 225, 188-194
- Subrahmanyam D. (1987) Antifilarials and their mode of action. Ciba Foundation Symposium 127, 246-264

- Sulston J., Du Z., Thomas K., Wilson R., Hillier L., Staden R., Halloran N., Green P., Thierry-Mieg J., Qiu L., Dear S., Coulson A., Craxton M., Durbin R., Berks M., Metzstein M., Hawkins T., Ainscough R., and Waterston R. (1992) The *C.elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature* 356, 37-41
- Venegas A., Goldstein J.C., Beaugregard K., Oles A., Abdulhayoglu N., and Fuhrman J.A. (1996) Expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function. *Molecular and Biochemical Parasitology* 78, 149-159
- Von Mende N., Bird D.M., Albert P.S., and Riddle D.L. (1988) dpy-13: a nematode collagen gene that affects body shape. *Cell*. 55(4), 567-76.
- Vuorio E., and De Combrugghe B. (1990) The family of collagen genes. *Annual Review of Biochemistry* 59, 837-872
- Wang S., Xiong M., Liu T., and Tang L. (1999) Evaluation of recombinant chitinase antigen in serological diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 30(3), 569-571
- Weil G.J. (1990) Parasite antigenemia in lymphatic filariasis. *Experimental Parasitology* 71, 353-356
- Wharton, D.A., (1986) In: *A Functional Biology of Nematodes* (Calow, P., ed.), Croom Helm, London and Sydney.
- Wood W.B., (1988) *The nematode Caenorhabditis elegans*, ColdSpring Harbor Laboratory Press
- World Health Organization, (1992) TDR Eleventh Programme Report on Lymphatic Filariasis and Onchocerciasis, Geneva
- World Health Organization, (2000) Eliminate Filariasis: Attack poverty; The Global Alliance to Eliminate Filariasis Proceedings of the First Meeting. Santiago de Compostela, Spain 4-5 May. Report prepared by the department of communicable Diseases control, Prevention and Education, World Health Organization. Geneva, 2000
- Wright K.A. (1987) The nematode's cuticle-Its surface and the epidermis: Function, homology, analogy- A current consensus. *Journal of Parasitology* 73, 1077-1083
- Wright K.A. (1976). In "the Organization of Nematodes" (N. A. Croll, ed.), pp. 71-105 Academic press, New York.
- Wu Y., Adam R., Williams S.A., and Bianco A.E.(1996) Chitinase genes expressed by infective larvae of the filarial nematodes, *Acanthocheilonema viteae* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 75, 207-219

Chapitre II

Détection des protéines chitinolytiques chez *Caenorhabditis elegans* et étude du taux chitinolytique au cours du cycle

INTRODUCTION

Les insectes hématophages, vecteurs de différents parasites, contiennent dans leur tube digestif une structure chitineuse nommée la membrane péritrophique (Lehane et al, 1991; Sieber et al, 1991), qui encapsule la masse sanguine absorbée par les moustiques (Richards et Richards, 1977). Pendant leur développement dans l'intestin de leur hôte, les parasites doivent traverser la membrane péritrophique. Pour cette raison, les parasites ont adopté une stratégie pour continuer leur cycle vital, en sécrétant des chitinases hydrolysant la membrane péritrophique. Des nombreuses études démontrent que la chitinase joue un rôle important dans la transmission des parasites, comme par exemple *Plasmodium* (Huber et al, 1991), *Leishmania* (Schlein et al, 1991), et *Trypanosoma*. Dans ce dernier, la source de la chitinase n'est pas parasitaire, mais des "rickettsia-like organisms" RLO qui se trouvent chez la mouche tsé-tsé (Welburn et al, 1993; Welburn et al, 1994).

Plusieurs chitinases des parasites filaires semblent nécessaires pour l'établissement du cycle vital. Une heure après le repas sanguin, les microfilaires de *Brugia malayi* envahissent l'épithélium de l'intestin moyen des moustiques. Dans ce cas, malgré l'absence de la membrane péritrophique, l'activité de la chitinase a été détectée dans les microfilaires de *Brugia malayi* (Fuhrman et al, 1992). Fuhrman (1983) suppose que la chitinase de *Brugia* possède un rôle différent de celui des autres filaires et qu'elle intervient dans la destruction de la gaine membranaire des microfilaires.

La chitine a été identifiée dans la paroi de l'œuf de différentes espèces des nématodes parasitaires comme par exemple *Ascaris suum* (Ward et Fairbairn, 1972). Les études chimiques et cytochimiques réalisées sur les œufs de deux espèces d'*Onchocerca* (*O.gibsoni* et *O.volvulus*) ont démontré que la chitine est un composant de la membrane de l'œuf, et cette membrane peut être digérée avec une chitinase purifiée (Brydon et al, 1987). L'étude de Gooday (1988) suggère que la chitinase d'*O.gibsoni* pourrait jouer un rôle dans l'éclosion de

l'œuf, et elle pourrait également jouer un rôle essentiel dans la régulation de la structure chitineuse pendant la formation de la paroi de l'œuf.

Une famille d'isozymes de chitinases avec une activité plutôt endo- qu'exo-chitinolytique a été trouvée chez *Brugia* (Fuhrman et al, 1995). Toutes les chitinases de cette famille possèdent une séquence très conservée à leur extrémité N-terminale et elles semblent partager une structure tertiaire formée de deux domaines, un domaine catalytique et un domaine de fixation (Fuhrman et al, 1995). Le domaine C-terminal riche de 6 cystéines constitue le site de fixation pour les molécules de chitine de poids moléculaire élevé (Venegas et al, 1996). Une comparaison de séquences du domaine catalytique N-terminal a été établie entre les chitinases de différentes larves infectieuses (Wu et al, 1996). Cette comparaison a démontré une identité d'environ 69 % entre les chitinases des larves infectieuses L3 d'*A.viteae*, d'*O.volvulus* et des microfilaires de *B.malayi* (Wu et al, 1996).

Il a été démontré que l'expression d'isozymes des chitinases est corrélée avec la capacité des microfilaires d'infecter les moustiques (Venegas et al, 1996). Un exemple de cette corrélation est représenté par les larves infectieuses d'*A.viteae* et *O.volvulus* (Wu et al, 1996).

Vu l'importance de la chitinase dans la transmission et le développement de certains nématodes parasites, cette molécule a été proposée comme une cible de vaccination (Shahabuddin, 1993 et 1995). Adam (1996) a identifié la chitinase comme l'antigène dominant reconnu par la réponse immunitaire humorale chez des mériens vaccinés avec des larves L3 d'*A.viteae* atténuées par irradiation. Récemment, Harrison et al (1999) ont démontré que l'immunisation des souris avec l'ADN de la chitinase d'*O.volvulus*, cloné dans un plasmide d'expression eucaryotique, peut induire une protection partielle contre une infection des larves L3. L'étude de Wang et al (1999) a montré que la chitinase recombinante peut être l'antigène idéal pour les détections sérologiques et la surveillance des filarioses lymphatiques dans les régions endémiques.

Dans le but d'étudier les fonctions possibles de la chitinase dans le développement des nématodes, nous avons étudié la présence d'une activité chitinolytique chez le modèle avantageux *Caenorhabditis elegans* (Howells et Jonhston, 1991).

Dans toutes les recherches précédentes, aucune activité chitinolytique n'a été démontrée chez *C.elegans*, mais seulement des gènes contenant entre trois et six domaines similaires au domaine de fixation de chitine ont été identifiés (Sulstone, 1992). Ces domaines sont caractérisés par la présence de six cystéines. Les gènes identifiés, contrairement à la chitinase, ne contiennent pas de domaine catalytique, mais ils ressemblent plutôt à la périrophine-44 qu'à la chitinase (Blaxter, 1996; Tellam, 1996). Par contre, les données récentes venant du séquençage complet du génome de *C.elegans*, montrent la présence de 17 gènes homologues aux chitinases sur le chromosome II (Hodgkin et al., 1998).

Dans ce chapitre, la présence d'une activité chitinolytique dans *C.elegans* a été démontrée. Cette activité a été étudiée à chaque stade du développement. L'activité chitinolytique a été aussi démontrée dans un extrait des œufs d'*A.suum*. Les tests chitinolytiques ont été effectués avec le substrat 4-Methylumbelliferyl-N,N',N''-triacyl- -chitotrioside. Ce substrat peut être hydrolysé par des chitinases ou par des lysozymes (Neuhaus, 1999).

MATERIEL ET METHODES

Préparation du matériel

La maintenance de la culture et les manipulations de *C.elegans* ont été décrites par Brenner (1973) et Wood (1988). La souche sauvage N2 a été reçue du Dr Bürglin (Université de Bâle), et le mutant thermosensible *daf-7* de *C.elegans* a été reçu du Prof. F. Müller (Université de Fribourg). Après le stade larvaire L2, ce mutant entre en phase physiologique dormante durer larvae (DL) résistante aux conditions défavorables du milieu. Les nématodes reprennent leur activité normale après un choc thermique à 15°C et ils subissent la mue en L4 pour continuer leur cycle.

Les œufs d'*A.suum* ont été préparés à partir des femelles gravides et les larves L3 d'*A.viteae* ont été reçues du Prof. N. Weiss (Institut Tropical Suisse, Bâle).

Extraction des protéines et tests enzymatiques (Gooday et al., 1988; Spindler et al., 1994).

Des cultures synchronisées de différents stades de développement de *C.elegans* ont été établies (Wood, 1988). Une meilleure synchronisation des larves L4, et des adultes en phases progressives de maturation (adultes jeunes aj, adultes gravides en phase d'embryogenèse ae, et adultes pendant la ponte ap) a été obtenue en utilisant la souche thermosensible daf-7. Des cultures synchronisées de *C.elegans* L1, L2, et L3 ont été préparées à partir de daf-7 ou de la souche N2. La culture de chaque stade a été récoltée de 3 à 4 boîtes.

Les nématodes *C.elegans* de différents stades et les larves L3 d'*A.viteae* ont été homogénéisés à froid, dans un tampon de citrate de sodium à pH 6.8, avec un homogénéisateur en verre. L'homogénat a été centrifugé à $15000 \times g$ pendant 10 minutes. La concentration des protéines dans les surnageants a été déterminée par le test Bio-rad (Protein assay kit II, Bio-rad; Suisse). Les œufs d'*A.suum* conservés dans le formol, ont été lavés (le volume occupé par les œufs est 2 ml) et resuspendus dans 3 ml de PBS, pH 7.4 en présence de 1 % cetylméthylammonium bromide CTAB. Ensuite les œufs ont été soniqués dans la glace, 7 fois de 2 minutes (200 watts). Les œufs soniqués ont été centrifugés à $10.000 g$ pendant 30 minutes à $4^{\circ}C$. Le surnageant a été récupéré et les protéines ont été dosées.

Dans le dosage des protéines, la présence du cetylméthylammonium bromide CTAB dans certains échantillons peut aboutir à des fausses valeurs. Pour cette raison, ce dosage exige une référence préparée dans les mêmes conditions.

Les tests d'activité chitinolytique ont été réalisés avec le substrat marqué 4-méthylumbelliferyl-N,N',N''-triacetyl-chitotrioside (MUF-chitotrioside; Calbiochem, Juro Supply AG, Suisse), à une concentration finale de $125 \mu M$, dans le tampon citrate-phosphate de sodium, 0.2 M (pH 5.5). Le volume final de la réaction a été ajusté à $100 \mu l$ ($50 \mu l$ de l'extrait de protéine et $50 \mu l$ du substrat). Après une incubation à $37^{\circ}C$ pendant 30 minutes, la réaction a été arrêtée avec le tampon glycine/hydroxide de sodium (1.9 ml; 0.5M, pH 10.4) et la mesure de la fluorescence a été effectuée sous des conditions d'excitation et d'émission de $350nm / 440 nm$.

La chitinase de *Streptomyces griseus* (Sigma, Suisse) a été utilisée comme contrôle positif dans les tests chitinolytiques

La comparaison de l'activité chitinolytique des différents extraits de *C.elegans* a été réalisée en mesurant la densité optique du produit de la réaction enzymatique par μg de protéines de l'extrait (DO/ μg).

Chromatographie d'affinité avec une colonne de lectine (Selon Adam et al., 1996, modifié).

Une culture mixte de *C.elegans* daf-7 contenant tous les stades de développement a été récupérée d'une seule boîte. Les vers ont été lavés avec l'eau distillée et resuspendus dans du PBS à pH 7.4, contenant 1 % cetylméthylammonium bromide (CTAB), puis soniqués à froid (dans la glace), 5 fois à un intervalle de 2 minutes (200 watts). Le produit soniqué a été centrifugé à $12000 \times g$ pendant 30 minutes pour éliminer le matériel insoluble. Le surnageant a été déposé sur une colonne de 5 ml de la lectine "Soybean agglutinin agarose" (SAB; Sigma, Suisse) équilibrée avec du PBS. La colonne a été lavée deux fois avec 20 ml du PBS pour éluer les protéines non spécifiquement fixées à la lectine. L'élution des protéines fixées a été effectuée avec N-acétylgalactosamine à 0.2 M dans du PBS, et les fractions collectées ont été utilisées pour les tests d'activité chitinolytique avec le substrat MUF chitotrioside. Les fractions positives ont été testées sur un gel polyacrylamide SDS-PAGE pour déterminer leur poids moléculaire et sur un gel polyacrylamide SDS-PAGE copolymérisé avec la chitine pour déterminer les bandes chitinolytiques.

SDS-PAGE.

Le polyacrylamide à une concentration de 12 % (masse/volume) a été utilisé pour le gel de migration ($50 \times 100 \times 0.75$) et de 4 % (masse/volume) pour le gel de concentration ($15 \times 100 \times 0.75$). Le bleu du bromophénol a été utilisé à 0.01 % (masse/volume) pour visualiser les échantillons et la migration a été réalisée à 20 mA pendant 2 heures. Le marqueur utilisé contient les protéines suivantes:

"Soybean trypsin inhibitor" (21.500 kD), "carbonic anhydrase" (31.000 kD), "ovalbumin" (45.000 kD), "bovin serum albumin" (66.200 kD), phosphorylase (97.400 kD), - galactosidase (116.260 kD), et myosine (200.000 kD).

Deux différents types de gels ont été préparés pour deux tests différents, avec ou sans ME.

1. SDS-PAGE sans β ME, copolymérisation avec de la glycol-chitine pour le test de détection chitinolytique sur gel.

(Méthode modifiée de Trudel et Asselin, 1989; Adam et al., 1996; et Fuhrman et al., 1992)

Le polyacrylamide à 12 % (masse/volume) a été utilisé pour le gel de migration et de 4 % (masse/volume) pour le gel de concentration. Les échantillons sont bouillis pendant 5 min en présence de la sucrose à 15 % (masse/volume) et du SDS à 2.5 % (masse/volume) dans Tris-HCl, 125 mM, pH 6.7, sans β -mercaptoéthanol. Dans ces conditions la structure et l'activité des protéines sont conservées pendant la migration. Cette préparation a été utilisée uniquement pour la migration sur un gel copolymérisé avec de la glycol-chitine pour les tests chitinolytiques sur gel (voir: Détection de l'activité chitinolytique sur un gel SDS-PAGE).

2. SDS-PAGE avec β ME

(Méthode modifiée de Trudel et Asselin, 1989)

Le polyacrylamide à 12 % (masse/volume) utilisé pour le gel de migration contient 0.1 % SDS. Les échantillons ont été bouillis pendant 5 minutes en présence de glycérine à 12 % (masse/volume) et de SDS à 2.5 % (masse/volume) dans Tris-HCl, 125 mM à pH 6.7, et de β -mercaptoéthanol à 1%. Ces conditions dénaturantes pour les protéines ont été utilisées pour le western-blot ou pour tester l'activité chitinolytique sur gel (voir: Détection de l'activité chitinolytique sur un gel SDS-PAGE).

Pour les tests chitinolytiques, après la migration, le gel a été traité avec du Triton X-100 (Boehringer Mannheim, 789-704) pour rendre aux protéines leur structure native et leur activité enzymatique (voir: Détection de l'activité chitinolytique sur un gel SDS-PAGE).

Détection de l'activité chitinolytique sur un gel SDS-PAGE.

La méthode de détection de l'activité chitinolytique sur un gel contenant 0.01% (masse/volume) de glycol chitine est décrite par Trudel et Asselin (1989). Les extraits des protéines de tous les stades de *C.elegans* ont été préparés comme il a été décrit par Trudel (sans ou avec β ME). Après l'électrophorèse, les protéines préparées avec β ME ont été

renaturées sur le gel pendant une nuit, à la température ambiante, sous une douce agitation, dans le tampon acétate de sodium à 100 mM, pH 5.0, contenant du Triton X-100 à 1 % (Boehringer Mannheim, 789-704). Puis le gel a été incubé pendant 5 minutes dans une préparation fraîche de Calcofluor white M2R à 0.01% (masse/volume) dans Tris-HCl 500 mM, pH 8.9. Ensuite le gel a été lavé avec de l'eau distillée pendant une heure. Les zones lytiques ont été visualisées sous UV sur le gel.

Préparation du matériel de la mue L3-L4 pour des tests western blot.

Trois préparations des milieux de culture ont été effectuées pour tester avec des anticorps d'*A.vitae*, la présence d'épitopes de chitinases chez *C.elegans* pendant et après la mue de L3-L4. Dans ces préparations, le milieu de culture contenait des *E.coli* (souche OP57) pour assurer la nutrition normale des nématodes. Ces cultures ont été lancées à partir des stades larvaires L1 ou L3, incubées à température ambiante pendant une période différente d'une culture à une autre:

La première culture a été lancée à partir des larves L1, et elle a été arrêtée après 30 heures de développement. Cette période a permis le développement de L1 jusqu'au début de L4. Le surnageant récupéré contient ainsi les protéines excrétées et les produits des mues successives de L1-L2, de L2-L3 et de L3-L4.

La deuxième culture a commencé à partir d'une phase jeune de L3 synchronisées. Cette culture a été arrêtée après 8 heures du développement. Ces conditions ont permis la récupération de larves L3 en phase de mue en L4 et d'un surnageant avec des protéines excrétées spécifiques à la mue.

La troisième culture a commencé avec des larves jeunes L3 synchronisées, et le développement a été arrêté après 24 heures. Les larves L4 avancées et le surnageant contenant les produits de la mue L3-L4 ont été récupérés séparément.

Les nématodes récupérés de ces cultures ont été lavés et broyés, et les protéines ont été extraites. Les bactéries ont été séparées des milieux de culture par centrifugation. Les concentrations des protéines ont été dosées dans les deux échantillons obtenus de chaque préparation: l'extrait protéique des nématodes et le milieu de culture purifié. De chaque

échantillon, 25 µg ont été utilisés pour les tests de réactions croisées avec les anticorps monoclonaux d'*A.viteae*.

Tests western blot.

Les gels SDS-PAGE ont été utilisés pour la séparation des protéines des échantillons destinés aux tests immunologiques, et ils ont été préparés dans les mêmes conditions que les gels SDS-PAGE avec ME. Deux anticorps monoclonaux anti-chitinase d'*A.viteae* (Adam, 1996) ont été reçus du Dr. R. Adam (Université de Hohenheim, Allemagne), et utilisés pour tester les réactions croisées.

1) Le mAb 2H2 (IgM, KL) a été préparé par immunisation de souris BALB/c contre le surnageant d'une culture des larves L3 d'*A.viteae* pendant la mue.

2) Le mAb 24-4 (IgG1, kl) a été produit par immunisation de souris BALB/c avec des larves L3 d'*A.viteae* irradiées.

Après la migration, les protéines ont été transférées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été saturée avec du TBS-lait à 5 %, lavée avec du TBS, et incubée une nuit à température ambiante en présence de l'anticorps monoclonal. Ensuite la membrane a été traitée avec l'anticorps secondaire de chèvre (Goat anti-mouse; GAM-pod, anti IgG ou anti IgM, Nordic, Immunology; Pays-Bas) pendant deux heures.

RESULTATS

Tests préliminaires de détection d'une activité chitinolytique chez C.elegans

Des tests préliminaires de détection d'une activité chitinolytique de *C.elegans* ont été réalisés en utilisant le substrat marqué methylumbelliferil-chitotrioside (MUF chitotrioside). L'activité chitinolytique est révélée par la fluorescence résultant de dégradation du substrat marqué. Une activité enzymatique a été détectée à partir d'un extrait d'une culture non synchronisée contenant tous les stades de développement. La culture mixte utilisée est très riche en adultes matures en phase de ponte. Cette culture récoltée de 5 boîtes, a été broyée dans 1 ml du

tampon d'extraction. Le dosage des protéines du surnageant montre une valeur de 453 $\mu\text{g/ml}$. L'activité chitinolytique (voir Table 1) à partir de 12.6 μg de l'extrait protéique d'une culture mixte a montré une densité optique de 15.8. Cette valeur est presque équivalente à celle de 16.5 obtenue d'une activité chitinolytique avec 1.2×10^{-3} unités de la chitinase purifiée de *Streptomyces griseus*.

L'activité chitinolytique préliminaire a aussi été testée dans une culture synchronisée d'œufs. Cette culture a été préparée par javellisation d'une culture mixte récoltée de trois boîtes, riches en adultes en phase de ponte (Wood, 1988). Après la javellisation, les œufs ont été lavés plusieurs fois avec de l'eau distillée et incubés dans le tampon M9 pendant trois heures. Cette préparation a été soniquée dans 500 μl et les protéines du surnageant ont été dosées. La concentration protéique a montré une valeur de 253 $\mu\text{g/ml}$. Le dosage enzymatique (Table 1) de 12.6 μg du surnageant a montré une densité optique (unité de fluorescence; UF) de 3.8, remarquablement moins importante que celle de la culture mixte.

Table 1. Test préliminaire de l'activité chitinolytique chez *C.elegans*

	Extrait de <i>C.elegans</i> en μg		Contrôle positive en unité de l'enzyme			
	Culture mixte de <i>C.elegans</i>	Stade œufs de <i>C.elegans</i>	<i>Streptomyces griseus</i>			
Unité testée	12.6 μg	12.6 μg	1.25 x 10 ⁻³ U	0.31 x 10 ⁻³ U	0.2 x 10 ⁻³ U	0.05 x 10 ⁻³ U
UF = activité de la chitinase	15.8	3.8	16.5	6.6	1.2	0.3
UF/ μg	1.25	0.2				

Les résultats des tests préliminaires démontrent que *C.elegans* possède une activité chitinolytique. La détection d'une activité faible dans les œufs n'est pas fiable à cause de la javellisation qui peut endommager l'activité ou le taux de l'enzyme dans les œufs. Pour cette raison les cultures synchronisées ultérieurement ne contiennent pas le stade œuf. L'étude du stade précédent (adultes pendant la ponte) et suivant (stade de passage entre œufs-L1), semble suffisante pour déduire le taux d'activité chitinolytique dans les œufs.

Détection de l'activité chitinolytique dans les stades synchronisés de *C.elegans* (Table 2 et Figure 1)

Ces tests ont été réalisés pour chaque stade avec deux ou trois concentrations des protéines différentes et la valeur moyenne de l'activité chitinolytique à chaque stade a été déterminée.

La comparaison de la fluorescence résultante de chaque réaction démontre que l'activité chitinolytique la plus élevée se trouve dans l'extrait du stade larvaire L1. L'activité spécifique est moins élevée dans le stade L2 et chez les adultes gravides en phase d'embryogenèse (ae). Une activité plus importante a été trouvée dans les extraits des adultes pendant la ponte (ap). L'activité enzymatique est faible en stade L3 et très faible en stades L4 et adultes jeunes (aj).

Table2. Dosage de l'activité chitinolytique de différents stades de *C.elegans*

L1			L2			L3			L4		
µg	flu	flu/µg	µg	flu	flu/µg	µg	flu	flu/µg	µg	flu	flu/µg
4	3609.5	902.2	4	693.5	173.4	30	254	8.4	30	81.5	2.7
2	2350.5	1175.2	2	266.5	133.25	10	77	7.7	10	7	0.7
1	994.5	994.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
moyenne		1024	moyenne		153.3	moyenne		8	moyenne		1.7

Adultes jeunes			Adultes gravides en phase embryogenèse			Adultes en phase de ponte		
µg	flu	flu/µg	µg	flu	flu/µg	µg	flu	flu/µg
50	36	0.72	30	311	10.36	20	1891	92.32
30	30	1	20	252.5	12.6	10	948.5	94.85
-	-	-	-	-	-	5	426.5	85.3
moyenne		0.86	moyenne		11.49	moyenne		90.8

La synthèse des tests de l'activité chitinolytique de tous les stades, avec le substrat marqué MUF chitotrioside, sont schématisés dans la Figure1.

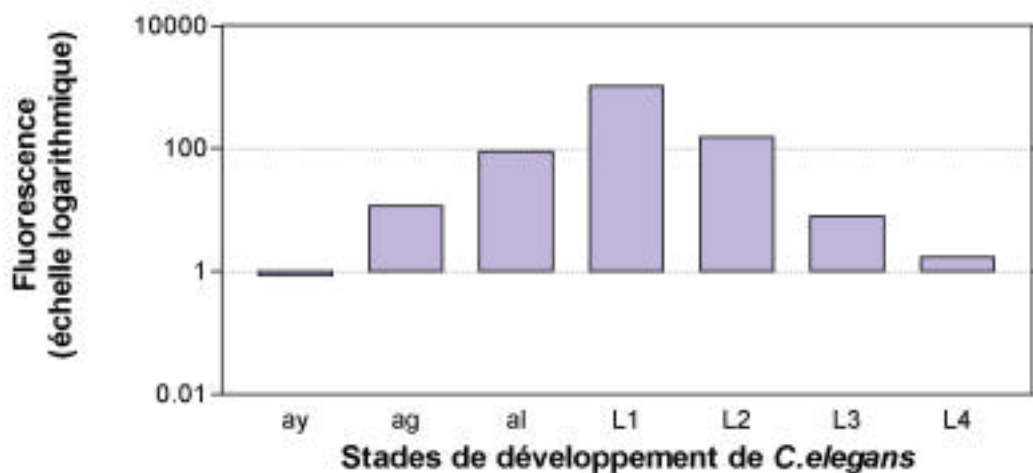


Figure 1. Activité chitinolytique de différents stades de développement de *C.elegans*

Dosage de l'activité chitinolytique dans l'extrait protéique d'œufs d'A.suum

L'extrait protéique d'œufs d'*A.suum* montre une concentration de 800 µg/ml. Le dosage de l'activité chitinolytique de 1 µg de l'extrait protéique montre une activité chitinolytique spécifique avec le substrat MUF chitotrioside de 62.2 DO/µg.

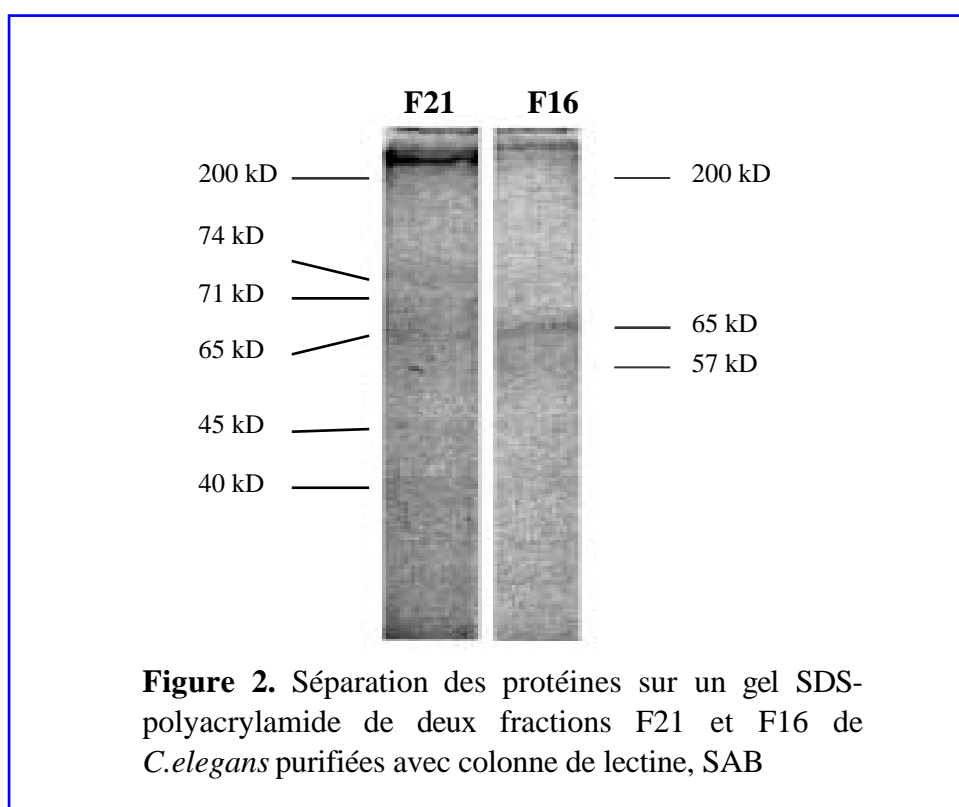
Il est possible que ce dosage chitinolytique des œufs d'*A.suum* ne soit pas très fiable à cause de l'état physiologique d'œufs conservés dans le formol pendant une année. De plus, la sonication prolongée pendant la préparation de l'extrait pourrait influencer l'activité enzymatique. Donc, ce test est un test préliminaire qui montre la présence d'une activité chitinolytique dans les œufs d'*A.suum*, mais cette activité en réalité pourrait être plus intense.

Purification de la chitinase de C.elegans avec une colonne de lectine (Soybean agglutinin agarose)

Plusieurs essais pour purifier la chitinase de *C.elegans* avec le glycol-chitine ont échoué. Par contre, en utilisant une colonne de lectine, certaines fractions d'un extrait de protéines ont été purifiées. Les résultats du dosage protéique dans les fractions éluées sont très faibles et indétectables par Bio-rad, mais deux fractions ont montré une activité chitinolytique importante avec le substrat MUF chitotrioside. Ces fractions ont été lyophilisées et analysées sur un gel SDS-polyacrylamide. Une bande supérieure à 200 kD et plusieurs bandes faibles

(74, 71, 65, 45, et 40 kD) ont été détectées sur le gel dans la fraction F21 d'une préparation. Trois bandes ont été détectées dans une fraction F16 préparée dans les mêmes conditions mais à partir d'une autre boîte de culture. Les bandes de la fraction F16 sont très faibles sur le gel polyacrylamide, mais parmi elles les deux bandes d'environ 57 kD et 65 kD et une bande de plus de 200 kD sont mieux visibles que les autres (Figure 2).

Les fractions purifiées F21 et F16 (concentrées par lyophilisation), et les extraits non purifiés des stades synchronisés de *C.elegans* (20-40 µg) ont été testés pour leur activité chitinolytique sur un gel SDS-polyacrylamide contenant 0.01 % glycol-chitine. Tous les échantillons testés de *C.elegans* n'ont pas réagi avec la glycol-chitine.



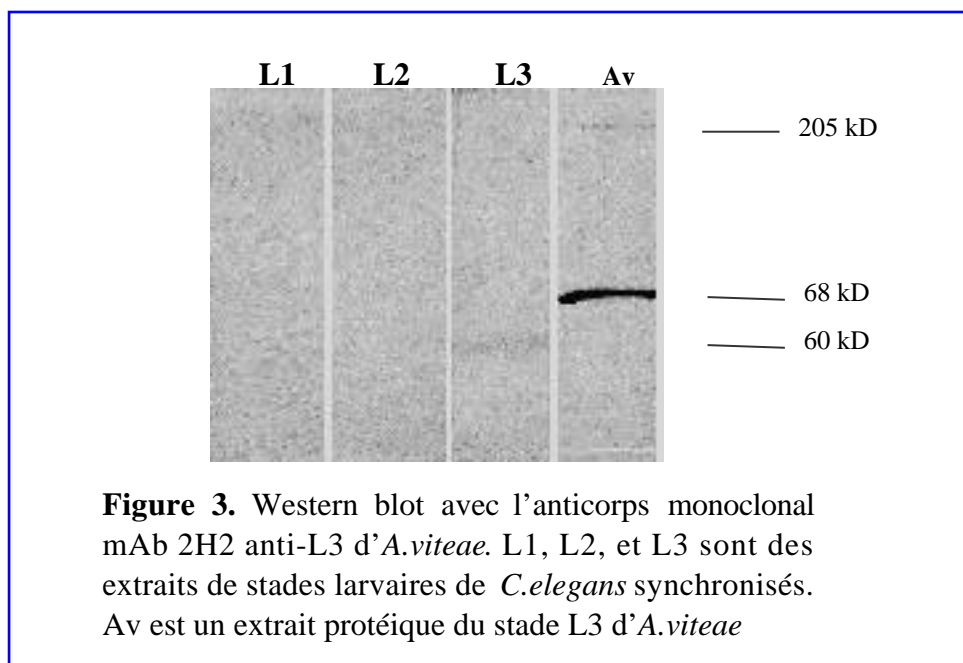
Etudes des réactions croisées avec des anticorps monoclonaux d'A.viteae sur des stades de C.elegans et les œufs d'A.suum.

Les anticorps monoclonaux antichitinase de L3 d'*A.viteae*, mAb 2H2 et mAb 24-4, ont été testés par western blot sur 20 µg d'extraits protéiques de cultures synchronisées de *C.elegans*,

30 μg d'un surnageant d'œufs soniqués d'*A.suum*, et sur 20 μg d'un extrait de L3 d'*A.viteae* utilisé comme contrôle positif.

Le mAb 24-4 a reconnu une bande autour de 205 kD dans l'extrait de L3 d'*A.viteae* (ce résultat, non démontré, confirme les résultats d'Adam et al., 1996). Aucune bande n'a été reconnue par cet anticorps dans les différents stades de *C.elegans* testés (L1, L2 et L3), ni dans les œufs soniqués d'*A.suum*.

Le mAb 2H2 a reconnu deux bandes d'environ 68 et 205 kD chez L3 d'*A.viteae* (ce résultat confirme les données d'Adam, 1996). Seule une bande de 60 kD a été faiblement détectée dans l'extrait de *C.elegans* au stade L3 synchronisé (Figure 3). Aucune bande n'a été reconnue dans les extraits de *C.elegans* aux stades L1 et L2 (Figure 3). Le résultat s'est révélé négatif aussi en testant le monoclonal mAb 2H2 sur un extrait d'une culture mixte de *C.elegans*, les fractions purifiées F21 et F16, ainsi que sur les œufs d'*A.suum*.



Etudes des réactions croisées avec des anticorps monoclonaux d'*A.viteae* sur des milieux de culture et des larves de *C.elegans* pendant et après la mue de L3-L4.

La concentration en protéines a été déterminée dans les milieux de cultures (S) et les extraits protéiques larvaires (E) récupérés de trois préparations, (P1: L1 – L4; après 30 heures), (P2: L3 – L4; après 8 heures) et (P3: L3 – L4; après 24 heures). Un volume contenant 25 µg de chaque échantillon a été testé avec les monoclonaux mAb 24-4 ou mAb 2H2.

Par western blot tous les extraits protéiques des nématodes dans les trois préparations se sont révélés négatifs avec les deux monoclonaux d'*A.viteae*. Le résultat de tous les surnageants contenant les produits de la mue, testés avec l'anticorps monoclonal mAb 2H2, s'est révélé aussi négatif. Par contre l'anticorps mAb 24-4 a révélé une bande autour de 60 kD dans tous les surnageants analysés (Figure 4). La bande est visible dans le surnageant des larves L3 de *C.elegans* après 8 heures d'incubation (phase de passage de L3-L4), et le surnageant de la culture P1 (L1 – L4; après 30 heures) contenant L4 jeunes. La détection de cette bande était plus faible dans le surnageant récupéré de la troisième préparation (L3 – L4; après 24 heures) contenant les larves L4 avancées.

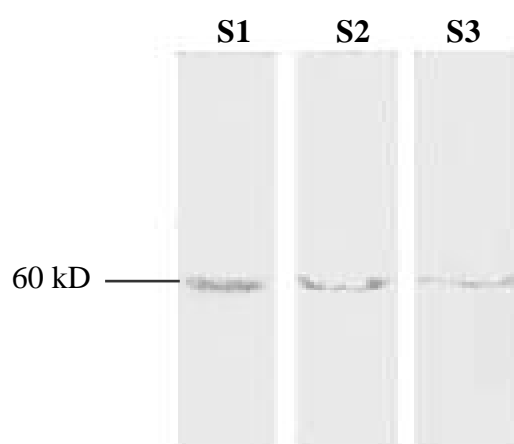


Figure 4. Western Blot avec l'anticorps monoclonal mAb 24-4 anti-L3 d'*A.viteae*. (S1) Surnageant récupéré après les mues successives à partir de L1 jusqu'à L4. (S2) surnageant de la culture des larves L3 pendant la mue en L4. (S3) surnageant récupéré après la mue de L3 en L4.

DISCUSSION

Pour la première fois, un test chitinolytique se révèle positif chez *C.elegans*, en testant un extrait protéique d'une culture mixte avec le substrat MUF chitotrioside. Notre étude au cours du cycle de vie de ce nématode montre la présence d'enzymes chitinolytiques dans tous les stades de développement. Le taux le plus élevé de l'activité chitinolytique a été détecté dans le stade L1 pendant l'éclosion. Le rôle des enzymes chitinolytiques à ce stade œuf-L1 pourrait être important à l'accomplissement de l'éclosion par dégradation de la paroi de l'œuf. Cette idée est supportée par la détection de chitine dans les œufs de certains helminthes intestinaux comme *A.suum* (Justus et Ivey, 1969) et *Heligmosomoides polygyrus* (Arnold et al., 1993), et par l'identification de chitine comme un composant de la paroi de l'œuf d'*O.gibsoni* et *O.volvulus* (Brydon et al., 1987).

La détection d'une activité chitinolytique dans le stade L2 indique que l'enzyme à ce stade peut être une forme de réserve depuis le stade L1, ou une forme exprimée particulièrement à ce stade avec une activité bien spécifique. Contrairement aux stades infectieux L1 et L3, les études concernant les enzymes chitinolytiques dans les autres stades de développement des nématodes parasites n'ont pas été développées.

Le résultat de l'activité chitinolytique chez les adultes suggère que l'enzyme pourrait jouer un rôle dans la régulation de la chitine de la paroi de l'œuf chez les adultes gravides. Cette activité qui est négligeable chez les jeunes adultes augmente progressivement au cours de l'embryogenèse et devient relativement importante pendant la ponte. Ce résultat renforce les données de Justus et Ivey (1969) qui considèrent la chitinase comme un facteur essentiel dans la construction de la paroi de l'œuf chez *A.suum*.

Bien que le résultat du test d'activité chitinolytique soit modeste chez les larves L3 de *C.elegans*, les réactions croisées par western blot avec les anticorps monoclonaux d'*A.viteae* ont justement été détectées en L3 et pas dans les autres stades de *C.elegans*. Ces résultats montrent la présence d'épitopes commun entre une chitinase de L3 de *C.elegans* et une chitinase de L3 d'*A.viteae*. Pendant la préparation de L3 de *C.elegans*, nous avons utilisé le mutant dauer larvae (DL) et il est possible qu'une partie de la culture destinée à la préparation de L3 a été convertie en DL. En conséquence, la culture considérée ici comme stade L3 de *C.elegans* que nous avons testé par western blot, contient en fait les deux formes L3 et DL.

Donc, il est possible que les épitopes de la bande de 60 kD de L3 de *C.elegans* reconnus par le mAb 2H2 (monoclonal antichitinase L3, *A.viteae*) se trouvent sur une chitinase exprimée par DL. En conséquence, l'expression de la bande 60 kD de L3/DL de *C.elegans* pourrait être spécifique au début du passage du stade DL au stade L4. Cette théorie peut être justifiée en regardant l'origine du monoclonal mAb 2H2 qui a été préparé par l'immunisation des souris BALB/c avec le surnageant de la mue de L3 d'*A.viteae* et qui reconnaît deux bandes de chitinases de 68 et 205 kD dans L3 d'*A.viteae* (Adam et al., 1996). D'un autre côté, aucun épitope n'a été reconnu par le mAb 2H2 dans les deux stades (L1 et L2), dans la culture mixte de *C.elegans*, ou dans les fractions purifiées avec la colonne de lectine. Le deuxième monoclonal testé, le mAb 24-4, a été préparé à partir de larves L3 d'*A.viteae* irradiées. Cet anticorps reconnaît une bande de 205 kD chez *A.viteae* (Adam et al., 1996), et par réaction croisée, une bande autour de 60 kD dans le surnageant de mue de L3-L4 de *C.elegans*. Ces données indiquent que les deux monoclonaux mAb 2H2 et mAb 24-4 reconnaissent deux protéines différentes de L3 de *C.elegans* et que les conditions d'expression de ces protéines supposées être des chitinases, sont différentes. Il semble que la bande reconnue par le mAb 2H2 dans l'extrait protéique des DL/L3 de *C.elegans* soit spécifique au stade L3 ou de DL avant la mue, et que celle détectée avec le mAb 24-4 soit spécifique à la mue.

L'absence d'antigènes reconnus par les monoclonaux mAb 2H2 et mAb 24-4 en L4 d'*A.viteae* (Adam et al., 1996) et dans les stades testés de *C.elegans* dans ce chapitre, renforce l'hypothèse d'Adam (1996) qui suggère que les chitinases du stade L3 seraient différentes de celles exprimées dans les autres stades de développement.

La chitinase du stade L3 a été largement étudiée chez les filaires parasitaires, et son importance pour la survie des nématodes a été démontrée. La chitinase a été identifiée comme l'antigène dominant reconnu par la réponse immunitaire humorale chez les mériens vaccinés contre l'infection d'*A.viteae*. La chitinase est exportée pendant la phase initiale de l'infection et pendant la mue de L3 (Abraham et al., 1989; Eisenbeiss et al., 1994). Les larves L3 d'*A.viteae* irradiées induisent plus de 90 % de protection contre une infection ultérieure d'*A.viteae* chez les mériens (Lucius et al., 1991). La chitinase de L3 d'*A.viteae* est l'antigène dominant reconnu par le sérum des mériens vaccinés avec des larves L3 d'*A.viteae* (Adam, 1996).

Le rôle de la chitinase a été discuté en général dans différentes études. A côté de son activité hydrolysant de la chitine (Poly- β -(1-4)-GlcNAc), la chitinase peut cliver d'autres substrats et peut avoir une activité d'une trans-glycosidase (Flach et al., 1992). Le rôle de la chitinase chez les larves L3 n'a pas été suffisamment clarifié. Le fait que l'enzyme soit exprimé pendant toute la période de développement de L3 d'*A.viteae* (Adam et al., 1996), suggère qu'il pourrait avoir d'autres substrats que la chitine. La chitinase est exportée dans le milieu de culture immédiatement après que les larves ont été mises dans les conditions des vertébrés (Adam et al., 1996). Cette période correspond à la phase initiale de l'infection pendant la migration des larves L3 à travers les tissus de l'hôte (Richer et al., 1992). Un enzyme exporté pendant cette phase peut aider à la dégradation des tissus de l'hôte, et il est possible qu'il possède une spécificité aux substrats appropriés. Il est intéressant de noter que des molécules homologues à la chitinase ont été trouvées récemment dans les cartilages et les oviductes des vertébrés (Renkema et al., 1995, 1997 et 1998 ; DeSouza et Murray, 1995; Hakala et al., 1993; Sendai et al., 1994). La présence de chitinase chez les vertébrés indique que cet enzyme pourrait contribuer à la dégradation de structures extracellulaires dans certaines conditions d'inflammations et de dégénération, ou au cours de la fertilisation des vertébrés. La chitinase de L3 est exprimée pendant la mue qui représente la phase de réorganisation de la cuticule. Donc, il semble que la chitine ne représente pas le substrat de la chitinase pendant cette phase, vu que la chitine se trouve particulièrement dans le stade œuf (Arnold et al., 1993; Brydon et al., 1987). En revanche, l'étude de Rhoads et Fetterer (1994) a démontré la présence de molécules de chitotriosides dans la cuticule de *Haemonchus contortus*. Ce résultat indique que les constituants de la chitine sont des composants structuraux de la cuticule des nématodes (Rhoads et Fetterer, 1994). Certaines études ont été effectuées afin de déterminer si le substrat de la chitinase dans la cuticule de L3 est la chitine ou des oligomères de β -(1-4)-N-acetylglucosamine (Kiefer et al., 1989; Rhoads et Fetterer, 1994). En tous cas, la localisation de l'enzyme et la phase de son expression suggèrent que la chitinase de L3 contribue à la procédure de mue. Egalement, dans ce chapitre, les résultats concernant la détection d'une activité chitinolytique et les résultats des réactions croisées sur les surnageants de la mue de L3 de *C.elegans* indiquent que la chitinase pourrait contribuer à la mue. La source de production de la chitinase de L3 sont les glandes pharyngiennes, où l'enzyme a été immunolocalisé par le

microscope électronique (Bird et Bird, 1991). Les produits des glandes pharyngiennes exportés par la cavité buccale pourraient jouer un rôle dans la mue (Bird et Bird, 1991), et ils sont produits pendant la mue de L3 d'*O.volvulus* (Strote et Bonow, 1991). Les produits de la mue chez les nématodes ont été insuffisamment étudiés et le seul composant des glandes pharyngiennes décrit au niveau moléculaire est la métalloprotéase de *H.contortus* (Gamble et al., 1989). L'étude de Kramer et al (1993) démontre que la production de la chitinase de L3 est contrôlée par des hormones stéroïdes. Ce contrôle est homologue à celui de la régulation d'expression des chitinases chez les insectes pendant la mue. Finalement, les chitinases de L2 et L4 n'ont pas été étudiées dans les nématodes parasites. Bien qu'une activité chitinolytique très faible ait été détectée en L4 de *C.elegans*, les chitinases semblent être exprimées pendant tous les stades du développement de *C.elegans*. Il semble également que plusieurs enzymes chitinolytiques soient exprimés au cours du cycle et que l'expression de certains enzymes est spécifique à des stades bien déterminés. Dû à la nature de *C.elegans* qui mène une vie libre, l'activité chitinolytique doit être limitée à un rôle physiologique interne comme la dégradation de la membrane de l'œuf et la dégradation des molécules saccharidiques de la cuticule pendant les mues.

La bande supérieure à 200 kD trouvée dans les fractions purifiées, comme dans tous les échantillons de *C.elegans*, n'a pas montré une activité chitinolytique sur un gel de chitine. Si cette bande peut démontrer une activité chitinolytique avec d'autres substrats, son poids moléculaire élevé pourrait être le résultat d'une polymérisation de plusieurs molécules. Adam et al. (1996) ont démontré que la bande de la chitinase de 205 kD est formée d'un polymère de 3 molécules de la chitinase 68 kD, liées entre elles par des ponts disulfures. La formation des polymères est associée à un changement dans le pouvoir antigénique et dans l'activité de la chitinase. Le monoclonal mAb 24-4 ne reconnaît pas la bande de 68 kD et la bande de 205 kD a montré une faible activité chitinolytique par rapport à la bande de 68 kD sur le gel. La détection par réaction croisée avec le monoclonal mAb 2H2 d'épitopes dans un extrait des femelles d'*A.viteae* et la localisation de l'enzyme dans un stade spécifique suggèrent que l'expression de la chitinase de L3 et de MF seraient soumise à une régulation bien déterminée. En plus, la différence de masse moléculaire de la chitinase entre les larves L3 et les microfilaires d'*A.viteae* montre une structure spécifique de la molécule. Le séquençage des domaines C-

terminaux, grâce à deux ADNc des deux stades, montre des variations dans ces domaines (Elson et al., 1994). En conséquence, la présence de plusieurs gènes de chitinases est possible. Le phénomène d'épissage alternatif ou les modifications post-traductionnelles spécifiques aux différents stades pourraient également contribuer à des différences entre les chitinases de deux stades L3 et MF d'*A.viteae* (Adam et al., 1996).

Les fractions purifiées de *C.elegans* analysées sur un gel polyacrylamide ont montré la présence de bandes supérieures à 200 kD. Aucune bande dans ces fractions n'a été reconnue par les anticorps monoclonaux d'*A.viteae*. Ces fractions ont montré une activité chitinolytique avec le substrat MUF chitotrioside, mais pas sur un gel copolymérisé avec la glycol-chitine. D'un autre côté ces fractions ont été isolées d'une culture de *C.elegans* sur une colonne de lectine, alors qu'avec une colonne de chitine tous les essais de purification de la chitinase ont échoué. Ces résultats indiquent que les enzymes chitinolytiques de *C.elegans* possèdent une affinité plutôt pour les substrats du poids moléculaire faible que pour des molécules très lourdes comme la chitine.

Bibliographie

- Abraham D., Grieve R.B., Holy J.M., Christensen B.M. (1989) Immunity to larval *Brugia malayi* in BALB/c mice: protective immunity and inhibition of larval development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40(6), 598-604
- Adam R., Kaltmann B., Rudin W., Friedrich T., Marti T., and Lucius R. (1996) Identification of Chitinase as the Immunodominant Filarial Antigen Recognized by Sera of Vaccinated Rodents. *J. Biol. Chem.* 271(3), 1441-1447
- Arnold K., Brydon L.J., Chappell L.H., Gooday G.W. (1993) Chitinolytic activities in *Heligmosomoides polygyrus* and their role in egg hatching. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58(2),317-23
- Arnold K., Venegas A., Houseweart C., Fuhrman J.A. (1996) Discrete transcripts encode multiple chitinase isoforms in Brugian microfilariae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80(2), 149-58
- Blaxter M. (1996) Protein motifs in Filarial Chitinases. *Parasitol. Today* 12(1), 42
- Bird A.F. and Bird J. (1991) The structure of nematodes, pp 44-77. Academic Press, San Diego.
- Brydon L.J., Gooday G.W., Chappell L.H., King T.P. (1987) Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25(3), 267-72
- Brenner S. (1973) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94
- DeSouza M.M., Murray M.K. (1995) An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* 136(6), 2485-96

- Eisenbeiss W.F., Apfel H., Meyer T.F. (1994) Protective immunity linked with a distinct developmental stage of a filarial parasite. *J. Immunol.* 152(2), 735-42
- Elson L.H., Guderian R.H., Araujo E., Bradley J.E., Days A., Nutman T.B. (1994) Immunity to *Onchocerciasis*: identification of a putatively immune population in a hyperendemic area of Ecuador. *J. Infect. Dis.* 169(3), 588-94
- Flach J, Pilet PE, Jolles P. (1992) What's new in chitinase research? *Experientia* 48(8), 701-16
- Fuhrman J.A., Lane W.S., Smith R. F., Piessens W.F., and Perler F.B. (1992) Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1548-1552
- Fuhrman J.A., Lee J., Dalamagas D. (1995) Structure and Function of a Family of Chitinase Isozymes from Brugian Microfilariae. *Exp. Parasitol.* 80, 672-680
- Furman A, Ash LR. (1983) Analysis of *Brugia pahangi* microfilariae surface carbohydrates: comparison of the binding of a panel of fluoresceinated lectins to mature in vivo-derived and immature in utero-derived microfilariae. *Acta Trop.* 40(1), 45-51
- Gamble H.R., Purcell J.P., Fetterer R.H. (1989) Purification of a 44 kilodalton protease which mediates the ecdysis of infective *Haemonchus contortus* larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33(1), 49-58
- Gooday G.W., Brydon L.J., Chappell L.H. (1988) Chitinase in female *Onchocerca gibsoni* and its inhibition by allosamidin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29(2-3), 223-5

- Hakala B.E., White C., Recklies A.D. (1993) Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J. Biol. Chem.* 268(34), 25803-10
- Harrison R.A., Wu Y., Egerton G., Bianco A.E. (1999) DNA immunisation with *Onchocerca volvulus* chitinase induces partial protection against challenge infection with L3 larvae in mice. *Vaccine* 12(18), 647-655
- Howells R.E. and Johnstone I. (1991) *Caenorhabditis elegans*: a model for parasitic nematodes. *Parasitol. Today* 7(9), 224-226
- Huber M, Cabib E, Miller LH. (1991) Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(7), 2807-10
- Justus D.E., Ivey M.H. (1969) Chitinase activity in developmental stages of *Ascaris suum* and its inhibition by antibody. *J. Parasitol.* 55(3), 472-6
- Hodgkin J., Horvitz H.R., Jasny B.R., Kimble J. (1998) *C.elegans*: Sequence to Biology. *Science* 282, 2011-2017
- Kiefer E., Rudin W., Hecker H. (1989) Cytochemical demonstration of lectin binding-sites in the cuticle and tissues of *Acanthocheilonema viteae* (Filarioidea). *Acta Trop.* 46(1), 3-15
- Kramer K.J., Corpuz L., Choi H.K., Muthukrishnan S. (1993) Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 23(6), 691-701
- Lehane, M.J. (1991) *Biologie of blood-sucking insects*. Harper collins Academic, London , pp. 143-192

- Lucius R., Textor G., Kern A., Kirsten C. (1991) *Acanthocheilonema viteae*: vaccination of jirds with irradiation-attenuated stage-3 larvae and with exported larval antigens. *Exp. Parasitol.* 73(2), 184-196
- Neuhaus J.M. (1999) Pathogenesis-Related Proteins in Plants, (Datta, S.K., Muthukrishnan, S. eds.) CRC Press LLC.
- Renkema G.H., Boot R.G., Au F.L., Donker-Koopman W.E., Strijland A., Muijsers A.O., Hrebicek M., Aerts J.M. (1998) Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur. J. Biochem.* 251(1-2), 504-9
- Renkema G.H., Boot R.G., Strijland A., Donker-Koopman W.E., van den Berg M., Muijsers A.O., Aerts J.M. (1997) Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur. J. Biochem.* 244(2), 279-85
- Renkema G.H., Boot R.G., Muijsers A.O., Donker-Koopman W.E., Aerts J.M. (1995) Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J. Biol. Chem.* 270(5), 2198-202
- Rhoads M.L., Fetterer R.H. (1994) Purification and characterization of surface-associated proteins from adult *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 80(5), 756-63
- Richards A.G., Richards P.A. (1977) The peritrophic membranes of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 22: 219-40
- Richer J.K., Sakanari J.A., Frank G.R., Grieve R.B. (1992) *Dirofilaria immitis*: proteases produced by third- and fourth-stage larvae. *Exp. Parasitol.* 75(2), 213-22

- Schlein Y., Jacobson R.L., Shlomai J. (1991) Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 245(1313), 121-6
- Sendai Y., Abe H., Kikuchi M., Satoh T., Hoshi H. (1994) Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol. Reprod.* 50(4), 927-34
- Shahabuddin M. (1995) Chitinase as a vaccine. *Parasitol. Today* 11(2), 46-47
- Shahabuddin M., and Kaslow D. C. (1993) Chitinase: a novel target for blocking parasite transmission. *Parasitol. Today* 9(7), 252-255
- Sieber K.P., Huber M., Kaslow D., Banks S.M., Torii M., Aikawa M., Miller L.H. (1991) The peritrophic membrane as a barrier: its penetration by *Plasmodium gallinaceum* and the effect of a monoclonal antibody to ookinetes. *Exp. Parasitol.* 72(2), 145-56
- Spindler K-D., Spindler-Barth M. (1994) Inhibition of Chitinolytic Enzymes from *Streptomyces griseus* (Bacteria), *Artemia salina* (Crustacea), and a cell Line from *Chironomus tentans* (Insecta) by Allosamidin and Isoallosamidin. *Pestic. Sci.* 40, 113-120
- Strote G., Bonow I. (1991) Morphological demonstration of essential functional changes after in vitro and in vivo transition of infective *Onchocerca volvulus* to the post-infective stage. *Parasitol. Res.* 77(6), 526-35
- Sulston J., Du Z., Thomas K., Wilson R., Hillier L., Staden R., Halloran N., Green P., Thierry-Mieg J., Qiu L., Dear S., Coulson A., Craxton M., Durbin R., Berks M., Metzstein M., Hawkins T., Ainscough R., and Waterston R. (1992) The *C.elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature* 356, 37-41
- Trudel J., Asselin A. (1989) Detection of Chitinase Activity after Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178, 362-366

- Tellam R.L. (1996) Protein motifs in filarial chitinases: An alternative view. *Parasitol. Today* 12(7), 291-292
- Venegas A., Goldstein J.C., Beauregard K., Oles A., Abdulhayoglu N., Fuhrman J.A. (1996) Expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78, 149-159
- Wang S., Xiong M., Liu T., Tang L. (1999) Evaluation of recombinant chitinase antigen in serological diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 30(3), 569-571
- Ward KA, Fairbairn D. (1972) Chitinase in developing eggs of *Ascaris suum* (Nematoda). *J. Parasitol.* 58(3), 546-9
- Welburn S.C., Maudlin I., Molyneux D.H. (1994) Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse. *Med. Vet. Entomol.* 8(1), 81-7
- Welburn S.C., Arnold K., Maudlin I., Gooday G.W. (1993) Rickettsia-like organisms and chitinase production in relation to transmission of *trypanosomes* by tsetse flies. *J. Parasitol.* 107 (Pt 2),141-5
- Wood W.B (1988) The nematode *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Wu Y., Adam R., Williams S.A., Bianco A. E.(1996) Chitinase genes expressed by infective larvae of the filarial nematodes, *Acanthocheilonema viteae* and *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75, 207-219

Chapitre III

Isolation et caractérisation des clones d'ADNc codant pour AS-EPICUT1

INTRODUCTION

La cuticule des nématodes est une structure extracellulaire qui fonctionne comme exosquelette de l'animal. A côté de ses fonctions mécaniques, la cuticule assure en général des interactions métaboliques entre les nématodes et leur environnement. Dans le cas des parasites, la cuticule assure les interactions entre les nématodes et le système immunitaire.

La cuticule est constituée des plusieurs couches dont les composants majeurs sont des protéines de collagènes qui peuvent être extraites par la combinaison de détergents ioniques et d'agents réducteurs des ponts disulfures (Cox et al., 1981 ; Politz et Philipp, 1992 ; Kramer, 1994). Le résidu, nommé cuticuline, restant après l'extraction des collagènes et résistant à la collagénase, a été décrit pour la première fois comme un composant insoluble de la cuticule d'*Ascaris lumbricoides*. La composition en acides aminés et la structure déterminée par la diffraction de rayon X indiquent que les composants du résidu insoluble sont différents des collagènes (Fujimoto et Kanaya, 1973). Les études classiques montrent que ces composants sont formés d'un mélange de protéines avec de très fortes liaisons inter- et intramoléculaires.

Deux gènes *cecut-1* (Sebastiano et al., 1991) et *cecut-2* (Lassandro et al., 1994) ont été isolés du nématode libre *C.elegans* et leur produits CECUT-1 et CECUT-2 ont été identifiés comme des composants du résidu insoluble de la cuticule. Ces gènes ont fourni la possibilité d'étudier pour la première fois les propriétés biochimiques des composants insolubles de la cuticule, en particulier le mécanisme de leurs liaisons croisées (Lassandro et al., 1994; Parise et Bazzicalupo, 1997). Un fragment du gène *cecut-1* a été utilisé pour identifier un gène homologue d'un nématode parasite des plantes, *Meloidogyne artiellia* (De Giorgi et al., 1996). Trois gènes homologues à *cecut-1* du nématode intestinal *A.lumbricoides* ont été identifiés, et l'organisation structurale complète d'un de ces gènes nommé *as-cut1* a été décrite (Timinouni et Bazzicalupo, 1997). La PCR avec des amorces d'*as-cut1* a permis l'isolation d'un fragment homologue d'une librairie d'ADNc de *Brugia pahangi*. Un clone génomique homologue a été identifié aussi chez *Brugia malayi* par hybridation (Lewis, 1999). Les séquences d'acides aminés de CECUT-1 et CECUT-2 sont différentes, mais une courte séquence de CECUT-1 (40 aa en longueur) riche en alanines et prolines ressemble à la région répétitive dans CECUT-2 (Lassandro et al., 1994). CECUT-2 est un composant de la cuticule de tous les stades de

C.elegans (Lassandro et al., 1994). CECUT-1 est un composant de la cuticule de dauer larvae (Sebastiano et al., 1991).

Avec des anticorps spécifiques préparés contre les protéines recombinantes, la protéine CECUT-1 a été immunolocalisée essentiellement dans le composant fibreux qui forme deux bandes latérales longitudinales dans la cuticule de dauer larvae de *C.elegans* (Sebastiano et al., 1991; Ristoratore et al., 1994; Favre et al., 1998). La protéine CECUT-1 a été faiblement détectée dans la zone corticale de la cuticule de tous les stades de *C.elegans* (Ristoratore et al., 1994) et dans la cuticule de dauer larvae de *C.elegans* et *Heterorhabditis* (Favre et al., 1998). Seule la zone corticale externe du stade L1 de *C.elegans* a révélé des épitopes de CECUT-1 et de CECUT-2. Des épitopes de CECUT-2 ont été immunolocalisés dans la couche cellulaire de l'hypoderme (Ristoratore et al., 1994). L'utilisation d'anticorps spécifiques démontre la présence d'épitopes communs à CECUT-1 et la cuticule de *Heterorhabditis* sp. (Favre et al., 1995). Des réactions croisées dans des études plus récentes démontrent la présence d'épitopes communs aux protéines CECUT-1, ASCUT-1 et CUT-1 de *Heterorhabditis* (Favre et al., 1998). La protéine ASCUT-1 a été localisée dans l'œuf mature d'*A.lumbricoides* à différents endroits: La matrice de l'œuf, la membrane de l'œuf, l'œuf au stade L1-L2 pendant la phase du début de formation d'une nouvelle cuticule de L2, la cuticule de L2 et les cellules de l'hypoderme (Favre et al., 1998). Des anticorps préparés contre une région bien conservée d'ASCUT-1 ont permis l'immunolocalisation des épitopes dans la couche médiane de la cuticule de *B.pahangi* pendant le sixième jour de la mue entre L3 et L4, dans les couches internes de la cuticule chez les microfilaires matures, dans la cuticule des microfilaires immatures dans l'utérus, et dans la couche médiane de la cuticule des femelles et mâles adultes de *B.pahangi* (Lewis, 1999).

Le manque d'immunogénicité et d'antigénicité de la surface externe de la cuticule a été mentionné dans plusieurs études et il a été confirmé dans les études de Betschart (1990). Seules les protéines non structurales (sécrétées et excrétées) associées à la surface sont souvent accessibles à la fixation des anticorps de l'hôte (Maizels, 1998).

Malgré les différentes analyses de la surface structurelle cuticulaire des nématodes, les connaissances sur la surface sont encore limitées. Des anticorps dirigés contre la cuticuline ont été préparés à partir de la cuticule d'*Ascaris suum* (Betschart et al., 1990, Bisoffi et Betschart,

1996a). Ces anticorps sont spécifiques pour la cuticuline de l'épicuticule, et ils réagissent contre les couches électron-denses de la zone corticale dans les stades L3 et adulte (Betschart et al., 1990; Marti, 1991; Betschart et Bisoffi, 1996a).

L'anticorps monoclonal mAb 8.1 dirigé contre la cuticuline purifiée d'*A.suum* et préparé dans des souris BALB/c, a permis l'isolation d'un clone d'ADNc nommé 31B1A. Ce clone correspond au gène *ascut* (renommé *as-epicut1* dans ce chapitre) codant pour la protéine ASCUT ou AS-EPICUT1. Cette protéine riche en alanines et en prolines a été immunolocalisée dans l'épicuticule (Bisoffi et Betschart, 1996a).

Donc, *A.suum* contient deux groupes de gènes différents, codant pour deux protéines différentes constituantes du résidu insoluble. Ces deux types de gènes ont été nommés *ascut*: Le premier gène *ascut-1* homologue à *cecut-1* a été identifiée dans *A.lumbricoides* (Timinouni et Bazzicalupo, 1997) avec une protéine immunolocalisée dans l'œuf au stade L1-L2 (Favre et al, 1998). Le deuxième gène *ascut* a été isolé d'une librairie d'ADNc d'*A.suum* (Bisoffi et Betschart, 1996a) et code pour une protéine immunolocalisée dans l'épicuticule.

Afin de distinguer entre *ascut-1* (Timinouni et Bazzicalupo, 1997) et *ascut* (Bisoffi et Betschart, 1996a), nous avons renommé le gène *ascut* de l'épicuticule *as-epicut1* et la protéine correspondante AS-EPICUT1. Vu qu'*as-epicut1* est le premier gène identifié de l'épicuticule, nous avons attribué le numéro 1 à sa nomenclature, ceci permet de numérotter les autres gènes de l'épicuticule qui peuvent être identifiés dans l'avenir selon l'ordre de leur identification chronométrique.

L'ADNc d'*as-epicut1* du clone 31B1A a été précédemment partiellement séquencé et certaines caractéristiques de la protéine prédite ont déjà été analysées (Bisoffi et Betschart, 1996a). L'insert du clone 31B1A est formé de 3200 pb avec un fragment 3' correspondant à un filament intermédiaire (~1600pb) et un autre fragment 5' correspondant à la cuticuline d'*A.suum* (~1600pb).

Dans ce chapitre, l'insert du clone 31B1A a été entièrement séquencé. L'absence de codon d'initiation (ORF-start) dans l'extrémité 5' de la séquence *as-epicut1* indique que l'insert ne contient pas la séquence codante complète.

D'autres clones de la même librairie d'ADNc d'*A.suum* ont été isolés et séquencés (C1, C2, et C3). La région codante d'*as-epicut1* dans les clones C1 et C2 montre des similarités

importantes avec celle du clone 31B1A. Dans les clones 31B1A, C1 et C2, la région codante d'as-epicut1 est formée de 6 régions répétitives. Par contre, as-epicut1 dans le clone C3 est formée de 7 régions répétitives. Dans tous les clones isolés, les protéines AS-EPICUT1 sont riches en alanines, prolines et en acides glutamiques avec 3 tyrosines par région répétitive qui est formée de 51 aa. Comme dans le cas du clone 31B1A, la séquence as-epicut1 dans les clones C1, C2, et C3 ne montre pas un ORF-start à l'extrémité 5'.

Par comparaison avec les autres protéines constituant le résidu insoluble, la structure primaire de la protéine prédite AS-EPICUT1 a montré certaines caractéristiques en commun avec CECUT-2. Ces caractéristiques résident dans la présence des régions répétitives et l'abondance de résidus alanines et prolines. Des fragments homologues à as-epicut1 ont été identifiés par Blast (le logiciel de recherche de séquences homologues dans la banque de séquences, EMBL) chez *C.elegans*, *B.malayi* et *Onchocerca volvulus*.

MATERIEL ET METHODES

Les librairies d'ADNc

- La librairie dans le vecteur ZAP II d'ADNc d'*A.suum* a été construite à partir d'ARN messagers isolés de l'hypoderme d'un nématode au stade adulte, et elle a été reçue de Dr T. Geary et Dr R. Klein (The Upjohn Company, Kalamazoo, USA).
- Les 3 librairies dans le vecteur uniZAP d'ADNc de *B.pahangi* ont été préparées à partir d'ARN messagers de 3 stades du développement, stade adulte, stade larvaire L3 précoce avant l'infection et stade larvaire L3 après l'infection pendant la phase de la mue. Ces librairies ont été reçues de Sarah Hunter de l'Université de Liverpool, U.K.
- La librairie dans le vecteur ZAP II d'ADNc de *C.elegans* a été préparée à partir d'ARN messagers isolés d'une culture mixte comprenant tous les stades de développement. Cette librairie a été reçue du Prof. Fritz Müller (Université de Fribourg; Suisse).

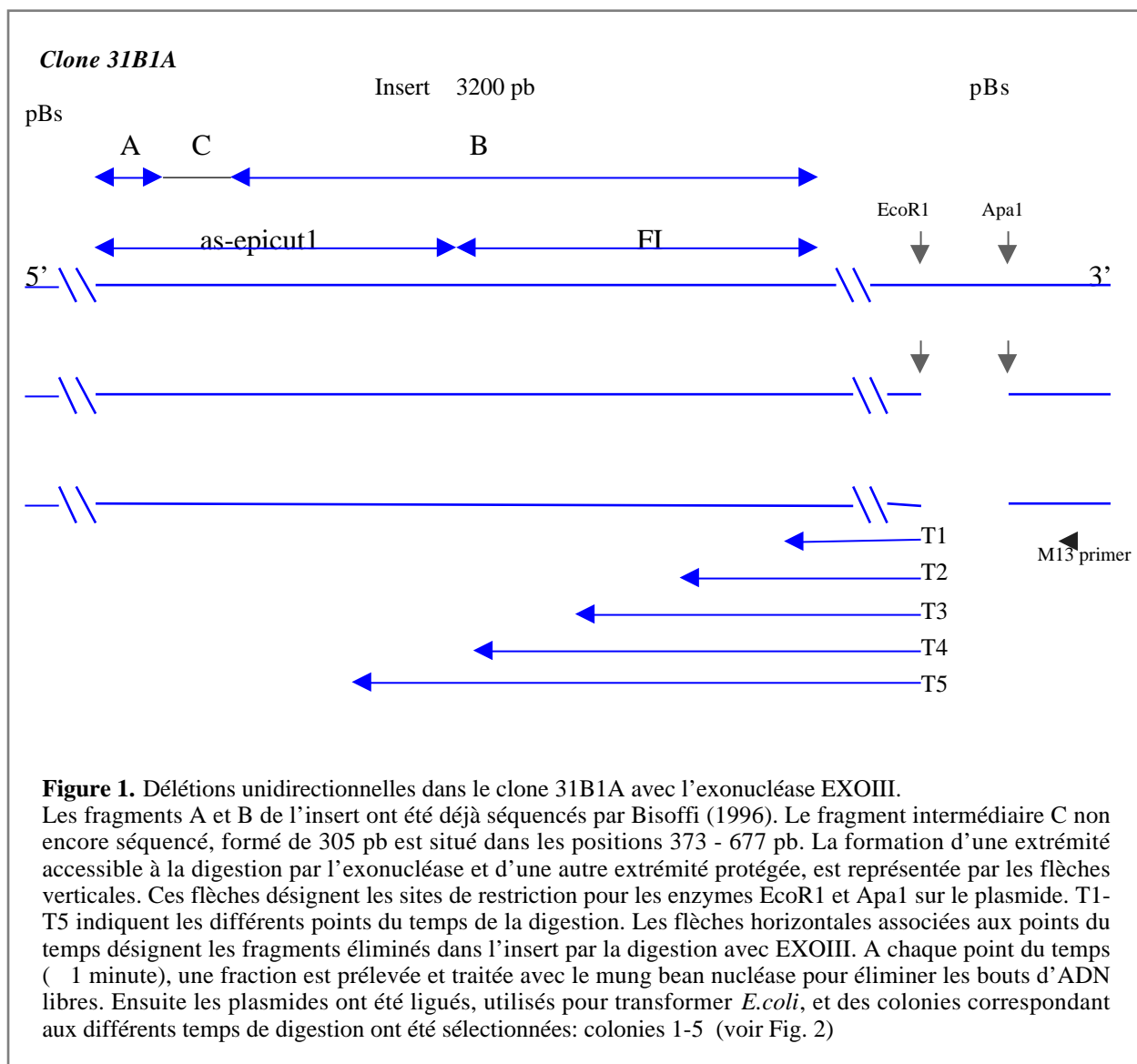
Séquençage du clone 31B1A avec le système ExoIII/Mung Bean nuclease (MBN) (Figure 1)

Le système ExoIII/Mung Bean nuclease est un système permettant la production des délétions unidirectionnelles dans l'insert. ExoIII digère progressivement l'extrémité 5' à partir d'un brin d'ADN libre ou d'une extrémité 3' franche, mais il ne digère pas l'extrémité 3' avec une extension d'ADN libre. 50 µg d'ADN du clone 31B1A a été coupé par deux endonucléases à deux sites correspondants du plasmide pBs, dans la région qui se trouve entre la région de l'amorce M13 universelle et l'insert. L'endonucléase Apa1 coupe à proximité du site de l'amorce M13 universelle pour obtenir une extrémité simple brin en 3', insensible à l'ExoIII, et EcoR1 coupe près de l'insert pour obtenir une extrémité en 5' susceptible à la digestion par l'exonucléase.

Le plasmide recombinant traité par digestion double d'endonucléases a été lavé et soumis à une digestion exonucléasique avec ExoIII à 34°C. Pendant la digestion exonucléasique, 5 fractions ont été prélevées après des intervalles différents d'une minute. Chaque fraction contenant 10 µg d'ADN a été traitée directement avec la Mung Bean nucléase pour éliminer les extrémités libres (simple brin). Puis les fractions ont été liguées séparément par la ligase de T4 (Stratagene). Ces conditions permettent une délétion contrôlée de 400 à 500 pb par minute.

De chaque fraction traitée à la Mung Bean nucléase, 1µg a été utilisé pour contrôler la délétion sur un gel d'agarose. 500 ng de chaque réaction de ligation ont été utilisés pour la transformation de bactéries compétentes *E.coli*, XL1-Blue MRF'. Les bactéries transformées ont été étalées sur des boîtes d'agar contenant du LB-ampicilline. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit. Plusieurs colonies de chaque temps de digestion ont été isolées et mises séparément en culture liquide dans du milieu LB ampicilline (3 ml / colonie) pendant une nuit à 37°C.

Par cette méthode, 5 colonies convenables ont été sélectionnées et l'ADNc de chaque colonie isolée a été séquençé par la méthode de terminaison de la chaîne.



Criblage des bibliothèques d'ADNc par hybridation avec les oligonucléotides marqués à la biotine:

Des oligonucléotides biotinylés à l'extrémité 5' (MWG-Biotech GmbH, Allemagne) ont été utilisés dans le criblage des bibliothèques d'ADNc (Table 1):

- La séquence de la sonde P3-biot formée de 23 nucléotides se retrouve dans chaque région répétitive d'as-epicut1.
- La séquence de la sonde D-biot est formée de 22 nucléotides et elle se retrouve à l'extrémité 5' de la région codante d'as-epicut1.
- La séquence de la sonde F-biot est formée de 24 nucléotides et se retrouve à l'extrémité 3' de la région codante d'as-epicut1 dans le clone 31B1A.

La technique d'hybridation avec des oligonucléotides marqués à la biotine, utilisée dans le criblage des bibliothèques d'ADNc, a été suivie comme il est décrit dans le protocole de Tropix, avec le kit (Tropix Detection of Biotin-Labeled DNA with CDP-Star or CSPD Chemiluminescent Substrate, CSPDC Cat. N° SL100SB, U.S.A.).

Un volume de 600 µl d'*E.coli*, XL1-Blue MRF' à DO 0.6 (600), inoculé avec 50,000 pfu de la bibliothèque d'ADNc, a été étalé sur de grandes boîtes de LB-agar. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit, et les plaques résultant de la lyse bactérienne, pendant l'amplification phagique, ont été transférées sur des membranes de nylon chargées positivement (MS1 Micron Separations INC, MagnaGraph de Life Systems Design, Suisse). Ensuite, les ADN fixés sur les membranes ont été dénaturés avec 1.5 M de NaCl / 0.2 M de NaOH, neutralisés avec 0.4 M de Tris-HCl, pH 7.6 / 2 × SSC, puis les membranes ont été rincées avec 2 × SSC. Après une incubation à 80°C pendant 2 heures pour fixer l'ADN, les membranes ont été préhybridées et hybridées comme il est décrit dans le protocole de Tropix, et soumises à la détection chimioluminescente par déphosphorylation avec la phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine (Avidex-AP). La décomposition du substrat (CSPD) provoque l'émission d'une lumière constante et prolongée avec un maximum à 461 nm sur la membrane de nylon. Après la déphosphorylation enzymatique, la membrane a été exposée à un film (BioMax, Kodak, BML n°5568 de Polylabo SA, Suisse).

Réactions PCR

Dans les réactions PCR nous avons utilisé la polymérase Bio Taq (Quiagen, Suisse) et les amorces de MWG-BIOTECH GmbH, Allemagne :

1) Les amorces modifiées à l'extrémité 5' avec IRD 800 (MWG, BIOTECH) utilisées pour le séquençage (Table 2):

- Les séquences des amorces M13 universel et M13 reverse se trouvent sur le plasmide pBs de deux côtés de l'insert. Ces amorces marquées à IRD 800 ont été utilisées pour séquencer des colonies produites à partir du clone 31B1A avec le système ExoIII/Mung Bean nuclease, et pour séquencer des clones isolés de la bibliothèque d'ADNc.

- La séquence de l'amorce Revcutf a été trouvée à l'extrémité 3' de la région codante d'as-epicut1 dans le clone C2. Cet oligonucléotide marqué à IRD 800 permet le séquençage de la partie interne, au-delà de la région codante dans le sens 5'-3'.

2) Les amorces pour réactions PCR ont été utilisées pour détecter l'as-epicut1 dans les plages isolées des librairies d'ADNc (Table 3) :

- Les séquences des amorces P1 et P2 sont situées aux extrémités 5' et 3' de la région codante d'as-epicut1 dans le clone 31B1A. Le produit de ces amorces avec le clone 31B1A est de 979 pb et il contient la région codante (sans les 7 premiers nucléotides) et une courte séquence de 25 nucléotides de la région 3' non codante.
- Les séquences des amorces P3 et P4 sont situées aux extrémités 5' et 3' de chaque région répétitive de la partie codante d'as-epicut1. Les amorces P3 et P4 ont été choisies dans une région répétitive interne d'as-epicut1. Le produit PCR du clone 31B1A avec ces amorces est formé des fragments de différentes longueurs des régions répétitives. Le fragment le plus court est de 135 pb et le plus long est de 894 pb.

Table 1. Trois oligonucléotides marqués à la biotine à l'extrémité 5', utilisés comme sondes dans le dépistage des librairies d'ADNc.

Sondes biotinyllées	Séquences des sondes biotinyllées	nb des nucléotides	Position sur le clone 31B1A	Sens/antisens
P3-biot	5'-biot-AACGCTTACGGTGACGAACCCGT-3'	23	666-688	sens
D-biot	5'-biot-AGCGCCGCTTTCGCGATTGCGT-3'	22	3-24	sens
F-biot	5'-biot-ATAACCACTAGATTCTACTGCTGC-3'	24	933-956	antisens

Table 2. Oligonucléotides marqués à l'IRD800 à l'extrémité 5' utilisés dans le séquençage.

Amorces	Séquences des oligonucléotides marqués à l'IRD800	nb des nucléotides	Position sur le clone 31B1A	Sens/antisens
M13 universel	IRD800-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	17	-	antisens
M13 reverse	IRD800-AACAGCTATGACCATG-3'	16	-	sens
Revcutf	IRD800-CTAGTGTTATTGATTGT-3'	18	945-963	antisens

Table 3. Oligonucléotides sans modifications, utilisés dans les réactions de PCR.

Amorces	Séquences des oligonucléotides sans modifications	nb des nucléotides	Position sur le clone 31B1A	Sens/antisens
P1	5'-CGCTTTCGCGATTGCGTT -3'.	18	8-25	sens
P2	5'-GGCAGTACAGCAACTTCTA -3'.	19	966-984	antisens
P3	5'- AACGCTTACGGTGACGAACCCGT-3'	23	666-688	sens
p4	5'-CGCTGGATTCCACTGCTGCT-3'	20	779-798	antisens

Conversion par excision in vivo des phages λ ZAP d'ADNc en plasmides pBlue-script et séquençage

Les plages ZAP d'ADNc révélées positives par hybridation, ont été isolées et soumises à trois tours de purification, puis à une vérification par PCR. Les plages qui ont été choisies pour l'analyse, ont été amplifiées dans *E.coli*, XL1-Blue MRF'. Puis, les phages ont été convertis en plasmide pBlue-script par une excision in vivo en présence du phage "Exassist helper" (Stratagene). Les plasmides excisés ont été amplifiés dans *E.coli* SOLR (Stratagene) et les inserts ont été séquencés par la méthode de terminaison de chaîne avec des amorces marquées à IRD800 et le kit: Labstation Thermo Sequenase Labelled primer cycle sequencing avec 7-déaza-dGTP; RPN 2437 ; Amersham, Suisse. La séparation des produits des réactions de séquençage a été effectuée par électrophorèse en gel, dans l'appareil "LI-COR 4200, MWG-BIOTECH, AG". Les séquences ont été analysées et comparées par alignement en utilisant le programme d'ordinateur Clustal X 1.64.

RESULTATS

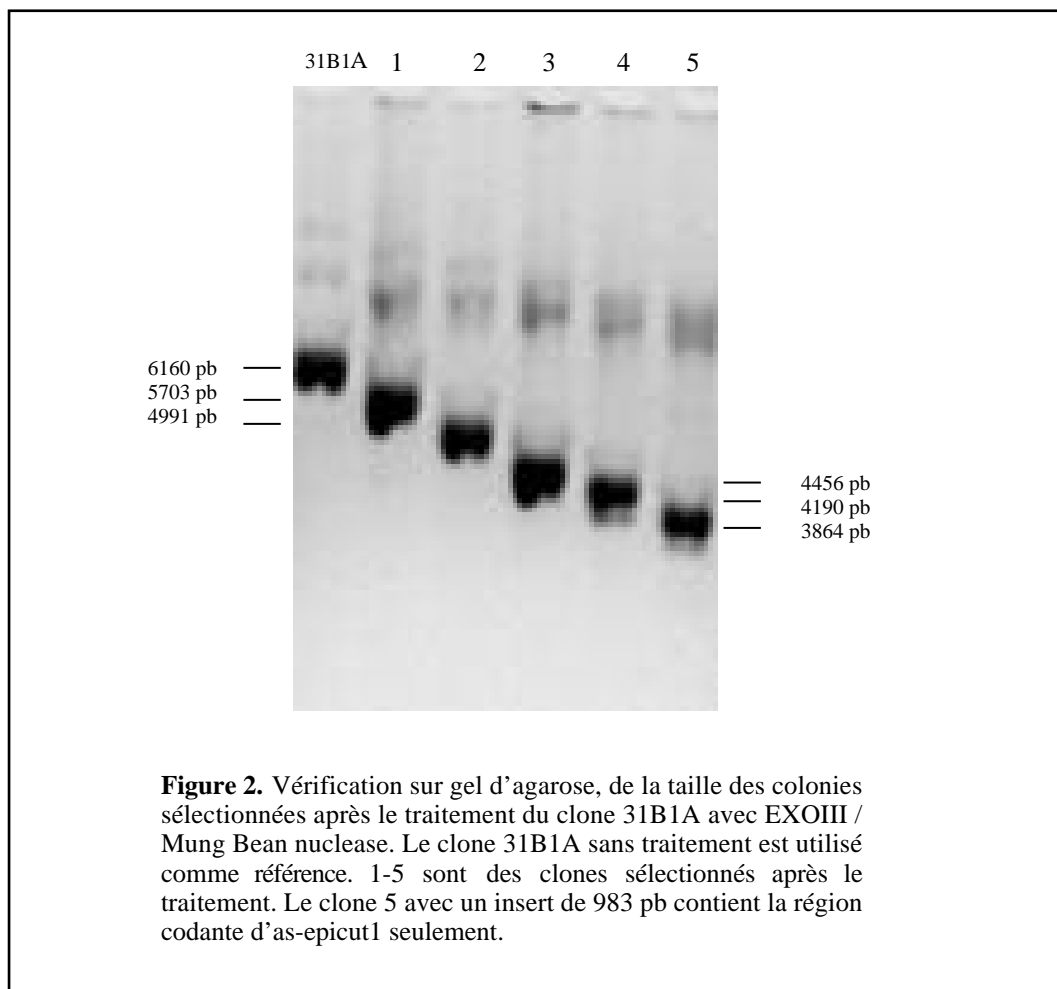
Séquençage complet du clone 31B1A isolé à partir de la librairie d'ADNc d'A.suum adulte

En utilisant l'anticorps monoclonal mAb 8.1, le clone 31B1A a été isolé d'une librairie d'ADNc d'*A.suum* (Bisoffi et Betschart, 1996a). A cause de la présence de régions répétitives dans la séquence d'*as-epicut1*, ce clone a été seulement partiellement séquencé. Dans ce chapitre, l'utilisation du système ExoIII/Mung Bean nuclease a permis l'isolation de fragments de l'insert avec des tailles décroissantes (Figure 1). Ces fragments ont été amplifiés dans *E.coli*

XL1-Blue MRF' et l'ADN plasmidique a été extrait de 5 clones choisis (Figure 2). Ces plasmides ont permis, par des séquençages consécutifs, de déterminer la séquence entière de l'insert, formé de 3200 pb dans le clone 31B1A.

L'assemblage des séquences des inserts des clones 1-3 (Figure 1) séquençés avec l'amorce M13 universel a permis de déterminer la séquence complète d'un filament intermédiaire (FI), formée de 1607 pb. La comparaison de la séquence du filament intermédiaire obtenue du système ExoIII/Mung Bean nuclease avec la séquence du filament intermédiaire décrite par Bisoffi et Betschart (1996b), montre que ces deux séquences sont identiques.

Les séquences obtenues par séquençage des inserts des clones 4-5 (Figure 2) avec les deux amorces M13 universel et M13 reverse (Figure 1) ont été assemblées et alignées. Ainsi, la séquence entière d'as-epicut1 dans le clone 31B1A a été déterminée (Figure 3). La séquence codante d'as-epicut1 dans le clone 31B1A se termine par le codon stop en position 957-959 pb, suivi d'une région non codante de 218 pb et d'un signal de polyadénylation (AATAAA) en position 1178-1183 pb. Après le signal de polyadénylation, on observe une autre région non codante de 414 pb suivie de la séquence du filament intermédiaire. L'absence du codon d'initiation (ORF-start) dans l'extrémité 5' d'as-epicut1 indique que la séquence codante d'as-epicut1 est probablement incomplète. Donc, l'analyse globale du clone 31B1A indique que l'insert contient une région d'as-epicut1 formé de 1597 pb.



La région d'as-epicut1 (Figure 4) code pour une protéine prédite d'au moins de 318 aa avec une masse moléculaire d'au moins de 32 kD. Cette protéine commence avec une séquence de 15 acides aminés riche en alanines, suivie par 6 régions répétitives. Chaque région répétitive est formée de 51 acides aminés.

as-epicut1 dans le clone 31B1A

1 - GC
 3 - AGCGCCGCTTTTCGCGATTGCGTTGGCCGCGGACGCCAAATTTCTTTTCAAGAGGAACAAT - 62
 - S A A F A I A L A A D A K F L F K R N N
 63 - GCGTATGGTACGAACCCGCTCCCGCTGAAGGGTACCGAGCGCCACGCCGAACCA - 122
 - A Y G D E P V A P A E G Y R A P R P E P
 123 - GCTCTGTAGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAACAAGCGGAGAGCTCCAGCAGCAGTA - 182
 - A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A V
 183 - GAATCTAGCGGCTATCGCAAGAAGAGGAACAACGCGTACGGTGATGAGCCTATCGCTCCC - 242
 - E S S G Y R K K R N N A Y G D E P I A P
 243 - GCTGCAGCAGTTGCAGAACCAGCTCCCGCCCCGTTGAGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAA - 302
 - A A A V A E P A P A P V E M A P A P V E
 303 - CAAGCTGCTGAAGCTCCTGCACCTGTAGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAAC - 362
 - Q A A E A P A P V E S S G Y R K K R N N
 363 - GCGTACGGTACGAACCCGCTGGCCCCAGCTGGAGGATACCGCGGCGAGAACCCGGCACCCG - 422
 - A Y G D E P V A P A G G Y A A A E P A P
 423 - GCTCTGTAGAACAGGCGCCGCCCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTG - 482
 - A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A V
 483 - GAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAGAACCCGTCCTCA - 542
 - E S S G Y R K K R N N A Y G D E P V A P
 543 - TCTGGTGGATACGCGCGCCAGCCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCA - 602
 - S G G Y A A A Q P A P A P V E Q A P A P
 603 - ATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGG - 662
 - I E Q A A E A P A A V E S S G Y R K K R
 663 - AATAACGCTTACCGTGACGAACCCGCTCCATCTGGTGGATACGAGCGGCACAGCCT - 722
 - N N A Y G D E P V A P S G G Y A A A Q P
 723 - GCACCAGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGCCCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCA - 782
 - A P A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A
 783 - GCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAGAAAGAGGAATAACGCGTACGGTACGAAACCCGTG - 842
 - A V E S S G Y R R K R N N A Y G D E P V
 843 - GCTCCATCTGGGGGATACGCGCGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCG - 902
 - A P S G G Y A A A Q P A P A P V E Q A P
 903 - GCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTAGAATCTAGTGGTTAT **TG**ATTG - 962
 - A P I E Q A A E A P A A V E S S G Y *
 963 - TTGTAGAAGTTGCTGACTGCCAGGATGTCGACGATCCTCATGTTCCATAATGCAATTTT - 1022
 1023 - TTTTGTGGAATGGGTGGATGGGGCGCGGATGGGGAAGGTGATCGTCTATGGCCCTGGT - 1082
 1083 - GGATTCATGATTCAAGCTGCTGAAAACGACATCGTCACGGATTACAGACGAGAACAACT - 1142
 1143 - GGATCTCCACAAATTAATCATGCTAAAAGCGTTT**ATAA**AGGGTAAAAACCCGCTGGCC - 1202
 1203 - TTGCGACATATATTGCATCAATGACAAAAGTTCCCTTCTCTGAGTGGAACGGTTTGTCTAA - 1262
 1263 - AAGACATTTTCTTTGACTGCACAAGATGTTGCGATGAAACTGTTATTAAAGGACATCGGG - 1322
 1323 - CGTGAGAAACGCAGTAATCATACAATTATTTGTTGGACAACATCGTCGATTACGTCATTTTC - 1382
 1383 - GTGTGGCTCGATTCCCTGGAATCTGCCGAGACCGTCGTCGGGTTAACGCCCATAGAGGCTC - 1442
 1443 - CATGAGCGCCGCTCACTTATTGATTTATGGCGCATAAACGCATTTTCATGAACCATTTA - 1502
 1503 - GCTCAATCTGTGATTTGAACTCTACTATTTTAAGGTGAAGAAATGTACCGTTTCATGCA - 1562
 1563 - CAATGCAATAAATATTGAAATTTTACCGCGCTCG - 1597

Figure 3. Représentation de la séquence entière d'as-epicut1 formée de 1597 pb dans le clone 31B1A, obtenue par l'assemblage des clones 4-5 (voir Fig.1-2). La région codante, située dans le fragment (1 - 956 pb), est formée de 6 régions répétitives avec un codon stop dans le site 957pb. Une région non codante se trouve dans la région (960 - 1597 pb). Un signal de polyadénylation se trouve dans le site 1178 - 1183 pb.

NH2 — SAAFAIALAA DAKFLF

0. --KRNNAYGD	EPVPA A E G YR	A PR P E P APV E	QAPAP I E Q AA	EAPAAVESSG Y
0. RKKRNNAYGD	E P I A P A A V A	-- E P A P A P V E	M A P A P V E Q A A	EAPAPVESSG Y
0. RKKRNNAYGD	EPVPA A G G Y A	A A E P A P A P V E	QAPAP I E Q AA	EAPAAVESSG Y
0. RKKRNNAYGD	EPVPA S G G Y A	A A Q P A P A P V E	QAPAP I E Q AA	EAPAAVESSG Y
0. RKKRNNAYGD	EPVPA S G G Y A	A A Q P A P A P V E	QAPAP I E Q AA	EAPAAVESS A Y
0. RKKRNNAYGD	EPVPA S G G Y A	A A Q P A P A P V E	QAPAP I E Q AA	EAPAAVESSG Y — COOH

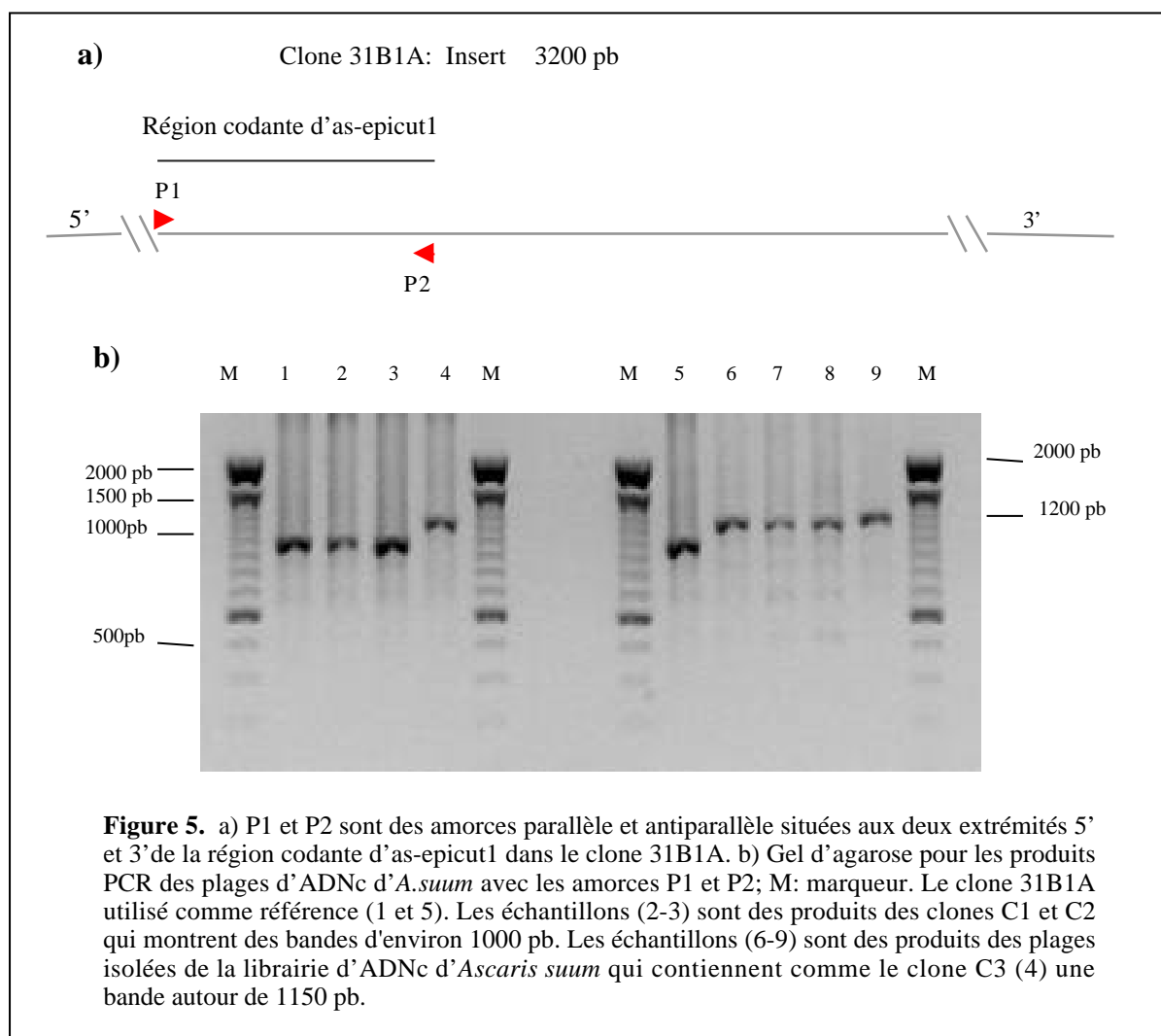
Figure 4. Démonstration des 6 régions répétitives dans la protéine prédite AS-EPICUT1 du clone 31B1A. Chaque région répétitive est formée de ~ 51 aa. La séquence peptidique commence avec une petite séquence de 16 aa riche en alanines. La première région répétitive manque 2 acides aminés à son extrémité NH2. Ainsi que la deuxième région manque 2 acides aminés à l'intérieur. Les deux premières régions représentent plusieurs variations en comparaison avec les 4 dernières régions répétitives. Les variations sont marquées en gras.

Les deux premières régions répétitives sont incomplètes. Il manque deux acides aminés à l'extrémité 5' de la première région répétitive, et à l'intérieur de la deuxième région. De faibles variations entre les 6 régions répétitives sont présentes, mais ces régions restent très semblables entre elles. Les régions répétitives sont riches en alanines (28%), en prolines (16%) et en acides glutamiques (10%) et chaque région contient 3 tyrosines. Ce résultat complet et confirme les données précédentes de Bisoffi et Betschart (1996a).

Isolation de clones supplémentaires d'ADNc contenant as-epicut1

Vu qu'apparemment la séquence as-epicut1 dans le clone 31B1A est incomplète et ne contient pas le codon d'initiation, d'autres clones d'as-epicut1 ont été isolés à partir de la même librairie, afin de trouver un clone qui contient la séquence complète d'as-epicut1. Plusieurs plages ont été isolées par hybridation avec la sonde F-biot et purifiées par utilisation de la sonde P3-biot. Ensuite, ces plages ont été soumises à une vérification par PCR avec les amorces (P1 et P2, voir Figure 5a) et/ou (P3 et P4). Les produits de PCR de plusieurs plages ont montré des bandes nettes avec les amorces (P1 et P2) sur un gel d'agarose (Figure 5). Par contre, avec les amorces (P3 et P4), le résultat de la PCR n'est pas clair à cause de la polymérisation entre les différents fragments amplifiés (résultats pas démontrés).

Trois plages ont été choisies pour analyse (Figure 5b; lignes 2-4), parmi lesquelles deux plages démontrent par PCR une bande d'environ 1000 pb identique au clone 31B1A et la troisième plage démontre un produit PCR plus long, environ 1150 pb. Les trois plages choisies, amplifiées dans *E.coli* XL1-Blue et excisées en plasmides pBlue-script (pBs), ont été nommées C1, C2 et C3. Ces trois clones ont été séquencés et leurs séquences ont été comparées par alignement avec as-epicut1 du clone 31B1A. Les résultats montrent que tous les trois inserts analysés contiennent les informations de la cuticuline as-epicut1. D'autres plages supplémentaires isolées de la même librairie montrent comme le clone C3, par PCR avec les amorces (P1 et P2), une taille plus longue que la région codante d'as-epicut1 dans le clone 31B1A (Figure 5b; lignes 6-9). Ces plages pourraient aussi contenir des séquences d'as-epicut1.



Par comparaison avec le clone 31B1A, les trois clones analysés C1, C2, et C3 montrent les différences suivantes:

1. La séquence as-epicut1 dans le clone C1 formé de 1052 nucléotides (Figure 6a) est différente de celle du clone 31B1A (Figure 6b) à l'extrémité 5' par les 11 premiers nucléotides, dont la séquence 5'-CTGTCGTTCTG dans le clone C1 remplace la séquence 5'-GCAGCGCCGCT. L'extrémité 3' se termine par une région non codante courte de 92 pb. L'insert dans le clone C1 est constitué d'une région codante d'as-epicut1 formée de 6 régions répétitives autour de 154 pb chacune. La région codante dans les deux clones est située dans la région 1-959 pb avec un codon méthionine dans le site 282-284 pb et un codon stop dans le site 957-959 pb. Les deux clones sont identiques dans la région de 12-364 pb avec un nombre important des

variations dans la région de 365- 865 pb. La région entre 866-1026 pb qui contient une partie de la région codante et une partie de la région non codante est identique. L'insert dans le clone C1 est formé seulement d'as-epicut1, par contre le clone 31B1A contient l'ADNc de deux gènes.

2. Le clone C2 formé de 2329 pb (Figure 7a) est différent du clone 31B1A (Figure 7b) par les 11 premiers nucléotides à l'extrémité 5' (5'-GCAGCGCCGCT), qui sont remplacés par 8 nucléotides (5'-CTGTTCTG) dans le clone C2. L'insert dans ce clone est autour de 2329 pb dont l'extrémité 5' contient la région as-epicut1 dans le fragment 1-1135 pb (Figure 7a) avec un codon méthionine dans le site 279-282 pb et un codon stop dans le site 954-956 pb. La région (9-1023 pb) dans le clone C2 ne montre pas des variations importantes par comparaison avec le clone 31B1A (Figure 7b), et seulement deux variations nucléotidiques d'as-epicut1 sont présentes entre les clones 31B1A et C2. Pour cette raison, on peut considérer que les deux clones 31B1A et C2 contiennent des messagers d'as-epicut1 issus du même gène. Les clones 31B1A et C2 contiennent le même nombre de régions répétitives d'as-epicut1 et les protéines prédites sont identiques. Le clone C2 est prolongé avec une région non codante dans le sens 3' de 179 pb (site 957- 1135 pb), puis il comprend une compression dans le site 1136- 1145 pb indiquant la présence probable d'une boucle. La séquence est suivie dans le sens 3' d'un fragment de 1183 pb (site 1146-2329 pb). La comparaison par Blast de cette dernière séquence montre qu'elle est identique à un ARNt mitochondrial d'*A.suum* (ref|NC-001327.1| *Ascaris suum* mitochondrion, complete genome ;emb|X54253.1|MTAS, *Ascaris suum* complete mitochondrial genome).

3. L'insert dans le clone C3 formé de 1297 pb (Figure 8a) est différent de 31B1A par l'absence des 11 premiers nucléotides à l'extrémité 5'. La région codante d'as-epicut1 dans le clone C3 est plus longue que celle des autres clones et elle commence par un C en remplaçant un T dans 31B1A. Cette région contient 6 régions répétitives dans le clone 31B1A (dans le site 1-959 pb) mais elle contient 7 régions répétitives dans le clone C3 (dans le site 1-1101 pb), avec un codon méthionine en position 270 pb et un codon stop dans le site 1099 pb. Les deux clones C3 et 31B1A sont identiques dans les régions A'' et C''. Certaines variations sont présentes dans les séquences situées dans les régions B''. Le clone 31B1A contient les informations de

deux gènes, la séquence *as-epicut1* suivie par une séquence du filament intermédiaire (FI) dans l'extrémité 3'. Le clone C3 contient seulement les informations d'un seul gène, l'*as-epicut1* (Figure 8b).

L'alignement des régions non codantes des 4 clones d'ADNc analysés (Figure 9) montre une partie du côté 5' identique dans tous les clones analysés, suivie par une autre partie identique dans les clones C1, C2 et C3. Puis les régions suivantes sont variables.

L'alignement entre les séquences peptidiques des protéines prédites AS-EPICUT1 des 4 clones ne montre pas de différences remarquables (Figure 10). La plupart des différences dans la séquence nucléotidique d'*as-epicut1* du clone C1 ne provoquent pas de changements dans la séquence des acides aminés. Seuls 4 acides aminés (parmi plus de 20 différences dans la séquence nucléotidique) sont remplacés par d'autres. Le même cas est observé dans le clone C3 qui contient seulement deux différences d'acides aminés. Le clone C2 ne montre aucune différence dans la séquence peptidique en comparaison avec le clone 31B1A. Les différences d'acides aminés se concentrent dans l'extrémité N-terminale des séquences peptidiques déduites des 4 clones d'ADNc, où les premiers acides aminés (au nombre de 3 à 4 aa) sont remplacés ou absents d'un clone à un autre (Figures 10 et 11).

Dans les trois clones 31B1A, C1 et C2, la masse moléculaire de la séquence peptidique entière est autour de 32 kD, tandis que cette valeur est de 36.8 kD dans le clone C3 (Figure 12). Si on tient compte de la première méthionine située par exemple dans le site 282 pb dans le clone 31B1A, cette valeur devient 22.5 kD dans les clones (31B1A, C1 et C2) et 27.5 kD dans le clone C3.

Le résultat global des 4 clones analysés de la librairie d'ADNc d'*A.suum* montre une similarité très importante dans la séquence codante pour la cuticoline. Certaines différences sont remarquables dans le clone C1 où un nombre important des nucléotides est remplacé par d'autres. Par contre la longueur de la région codante d'*as-epicut1* du clone C1 est identique à celle de deux autres clones 31B1A et C2. D'un autre côté le clone C3 montre une région codante d'*as-epicut1* plus longue que celle des autres clones isolés. Cette observation nous laisse suggérer la présence de plusieurs copies du gène *as-epicut1* dans le génome, ou la

présence du phénomène d'épissage différentiel (élimination de certains fragments internes du gène pendant la phase post-transcriptionnaire qui se déroule au niveau du messenger). Ainsi que la présence de deux gènes dans le même insert d'ADNc des clones 31B1A et C2 indique la possibilité d'une transcription polycistronique suivie d'une maturation des messagers comprenant un trans-épissage. Cette possibilité est faible car il semble que les inserts des clones 31B1A et C2 est formé chacun de deux ADNc séparés qui ont été ligés ensemble pendant la préparation de la librairie au niveau du site Not1 (site: 1449-1454 pb du clone 31B1A; et 1156-1161pb du clone C2).

a) Le clone C1

```

1 - CT
3 - GTCGTCTGTTTCGCGATTCGCTTGGCCGCGGACGCCAAATTTCTTTTCAAGAGGAACAAT - 62
  - V V L F A I A L A A D A K F L F K R N N
63 - GCGTATGGTGACGAACCCGTGGCTCCCGCTGAAGGGTACCGAGGCCACGACCCGGAACCA - 122
  - A Y G D E P V A P A E G Y R A P R P E P
123 - GCTCCTGTAGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAACAAGCGGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTA - 182
  - A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A V
183 - GAATCTAGCGGCTATCGCAAGAAGAGGAACAACGCGTACGGTGATGAGCCTATCGCTCCC - 242
  - E S S G Y R K K R N N A Y G D E P I A P
243 - GCTGCAGCAGTTGCAGAACCAGCTCCCGCCCCGTTGAGATGCGCTCCCGGCCAGTCGAA - 302
  - A A A V A E P A P A P V E M A P A P V E
303 - CAAGCTGCTGAAGCTCCTGCACCTGTAGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAAC - 362
  - Q A A E A P A P V E S S G Y R K K R N N
363 - GCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAGCGGCACAGCCTGCACCA - 422
  - A Y G D E P V A P S G G Y A A A Q P A P
423 - GCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTG - 482
  - A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A V
483 - GAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCCCCA - 542
  - E S S G Y R K K R N N A Y G D E P V A P
543 - TCTGGTGGATACGCAGCGGCACAGCCGGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCA - 602
  - S G G Y A A A Q P A P A P V E Q A P A P
603 - ATTGAACAAGCTGCAGAAGCACCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGG - 662
  - I E Q A A E A P A A V E S S G Y R K K R
663 - AATAACGCGTACGGCGACGAACCCGTGGCCCCAGCTGGAGGATACGCAGCGGCACAACCG - 722
  - N N A Y G D E P V A P A G G Y A A A Q P
723 - GCACCGGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCA - 782
  - A P A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A
783 - GCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAGAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTG - 842
  - A V E S S G Y R R K R N N A Y G D E P V
843 - GCTCCATCTGGGGGATACGCAGTGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCG - 902
  - A P S G G Y A V A Q P A P A P V E Q A P
903 - GCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTAGAATCTAGTGGTTATGATTG - 962
  - A P I E Q A A E A P A A V E S S G Y *
963 - TTGTAGAAGTTGCTGTACTGCCAGGATGTCGACGATCCTCATGTTCCATAATGCAATTTT -1022
1023 - TTTTCTGCTTAAACGTATGAGAAAAAAG - 1052

```

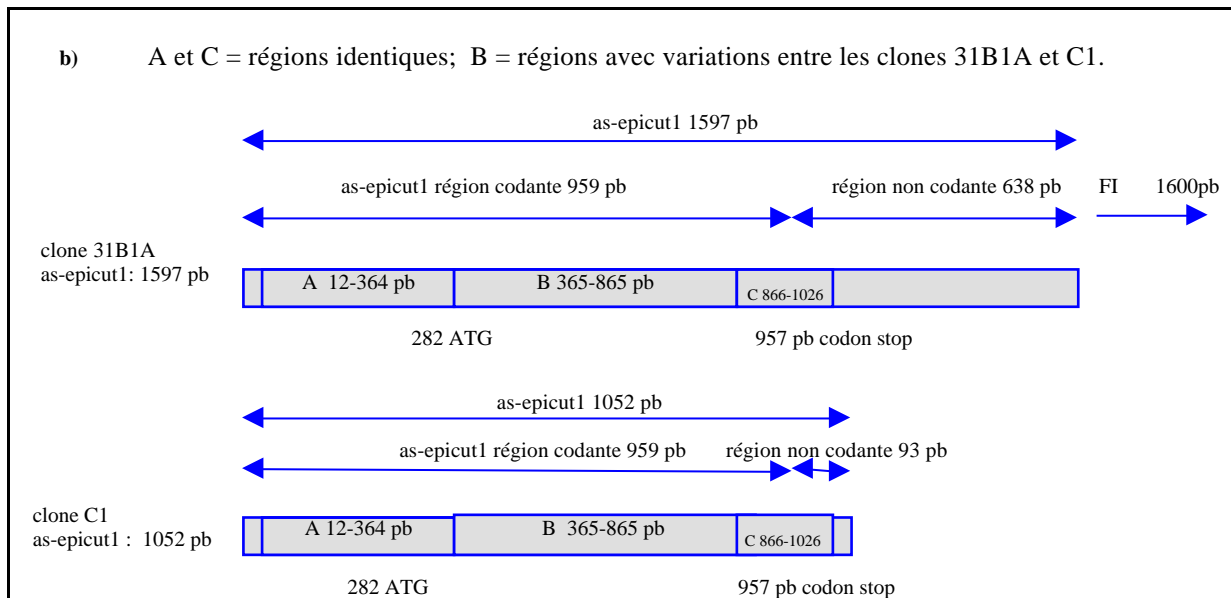


Figure 6. a) Démonstration de la séquence nucléotidique d'as-epicut1 et sa protéine prédite dans le clone C1. b) Comparaison schématisée entre la séquence as-epicut1 dans les clones 31B1A et C1. La région codante d'as-epicut1 dans les deux clones est située dans la région 1-959 pb avec un codon méthionine dans le site 282-284 pb et un codon stop dans le site 957-959 pb. Les deux clones sont identiques dans les régions A et C. Un nombre remarquable des variations ponctuelles dans les régions B a été trouvé.

a) Le clone C2

```

1 - CT
3 - GTTCTGTTCGCGATTGCGTTGGCCGCGGACGCCAAATTTCTTTTCAAGAGGAACAATGCG - 62
  - V L F A I A L A A D A K F L F K R N N A
63 - TATGGTGACGAACCCGTGGCTCCCGCTGAAGGGTACCGAGCGCCACGACCGGAACCCAGCT - 122
  - Y G D E P V A P A E G Y R A P R P E P A
123 - CCTGTAGAACAGGCTCCGCGACCAATTGAACAAGCGGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTAGAA - 182
  - P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A V E
183 - TCTAGCGGTATCGCAAGAAGAGGAACAACGCGTACGGTGATGAGCCTATCGCTCCCGCT - 242
  - S S G Y R K K R N N A Y G D E P I A P A
243 - GCAGCAGTTGCAGAACCAGCTCCCGCCCCGTTGAGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAA - 302
  - A A V A E P A P A P V E M A P A P V E Q
303 - GCTGCTGAAGCTCCTGCACCTGTAGAATCCAGCGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCG - 362
  - A A E A P A P V E S S G Y R K K R N N A
363 - TACGGTGACGAACCCGTGGCCCGCAGCTGGAGGATACGCGCGGCAGAACCGGCACCGGT - 422
  - Y G D E P V A P A G G Y A A A E P A P A
423 - CCTGTAGAACAGGCGCCGCGACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAA - 482
  - P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A V E
483 - TCCAGCGGTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCT - 542
  - S S G Y R K K R N N A Y G D E P V A P S
543 - GGTGGATACGCAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGCGCGCGCACCAATT - 602
  - G G Y A A A Q P A P A P V E Q A P A P I
603 - GAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGTACCGCAAGAAGAGGAAT - 662
  - E Q A A E A P A A V E S S G Y R K K R N
663 - AACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAGCGGCACAGCCTGCA - 722
  - N A Y G D E P V A P S G G Y A A A Q P A
723 - CCAGCTCCTGTAGAACAGGCGCGCGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCA - 782
  - P A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A
783 - GTGGAATCCAGCGGTACCGCAGAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCT - 842
  - V E S S G Y R R K R N N A Y G D E P V A
843 - CCATCTGGGGATACGCAGCGGCACAACCGGCACCGGTCTCTGTGGAACAGGCTCCCGCA - 902
  - P S G G Y A A A Q P A P A P V E Q A P A
903 - CCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCTAGTGGTTATGATTGTTG - 962
  - P I E Q A A E A P A A V E S S G Y *
963 - TAGAAGTTGCTGTACTGCCAGGATGTCGACGATCCTCATGTTCCATAATGCAATTTTTTT - 1022
1023 - TCTGCTTAAACGTATGAGCAAAATGTGCGTAAAATCACATCTCATGGGTTGCAATTTGAA - 1082
1083 - CAGATTTGATACTCCTTTTTTCATGGCCTTAAATGAAACAATGTTTTTCATTA - 1135

```

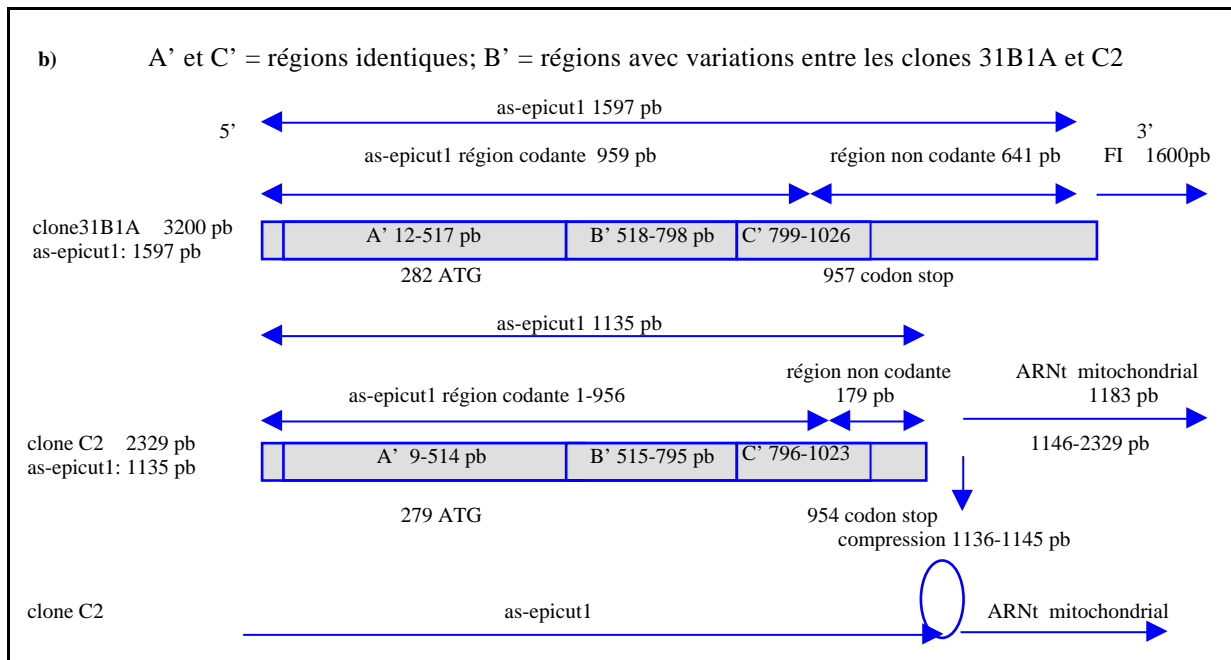


Figure 7. a) Séquence nucléotidique d'as-epicut1 dans le clone C2 et sa protéine prédite. b) Comparaison schématisée entre les inserts dans les clones 31B1A et C2. La région codante d'as-epicut1 dans le clone C2 est située dans le site 1-956 pb avec un codon méthionine dans le site 279 pb et un codon stop dans le site 954 pb. L'insert dans les deux clones contient une autre séquence dans la région 3': un FI dans le clone 31B1A et un ARNt mitochondrial dans le clone C2.

a) Le clone C3

```

1 - CTCGCGATTGCGTTGGCCGCGGACGCCAAATTTCTTTTCAAGAGGAACAATGCGTATGGT - 60
- L A I A L A A D A K F L F K R N N A Y G
61 - GACGAACCCGTGGCTCCCGCTGAAGGGTACCGAGCGCCACGACCGGAACCGAGTCCCTGTA - 120
- D E P V A P A E G Y R A P R P E P A P V
121 - GAACAGGCTCCGGCACCAATTGAACAAGCGGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCTAGC - 180
- E Q A P A P I E Q A A E A P A A V E S S
181 - GGCTATCGCAAGAAGAGGAACAACGCGTACGGTGATGAGCCTATCGCTCCCGCTGCAGCA - 240
- G Y R K K R N N A Y G D E P I A P A A A
241 - GTTGCAAGACCGAGTCCCGCCCGGTTGAGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCT - 300
- V A E P A P A P V E M A P A P V E Q A A
301 - GAAGCTCCTGCACCTGTAGAATCCAGCGGTACCGCAAAAAGAGGAATAACCGTACGGT - 360
- E A P A P V E S S G Y R K K R N N A Y G
361 - GACGAACCCGTGGCCCGCAGCTGGAGGATACGCCGCGGCAGAACCGGCACCGGCTCCTGTA - 420
- D E P V A P A G G Y A A A E P A P A P V
421 - GAACAGGCGCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGC - 480
- E Q A P A P I E Q A A E A P A A V E S S
481 - GGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCGGTGGCTCCATCTGGTGGGA - 540
- G Y R K K R N N A Y G D E P V A P S G G
541 - TACGCAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCAATTGAGCAA - 600
- Y A A A Q P A P A P V E Q A P A P I E Q
601 - GCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGTACCGCAAGAAGAGGAATAACCGCT - 660
- A A E A P A A V E S S G Y R K K R N N A
661 - TACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAGCGGCACAGCCTGCACCAGCT - 720
- Y G D E P V A P S G G Y A A A Q P A P A
721 - CCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGGAA - 780
- P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A V E
781 - TCCAGCGGTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGCGACGAACCGGTGGCCCGCAGCT - 840
- S S G Y R K K R N N A Y G D E P V A P A
841 - GGAGGATACGCAGCGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCAATT - 900
- G G Y A A A Q P A P A P V E Q A P A P I
901 - GAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGTACCGCAGAAAGAGGAAT - 960
- E Q A A E A P A A V E S S G Y R R K R N
961 - AACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCGGGGGATACGCAGCGGCACAACCGGCA - 1020
- N A Y G D E P V A P S G G Y A A A Q P A
1021 - CCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCA - 1080
- P A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A
1081 - GTAGAATCTAGTGGTTATGATTGTTGTAGAAGTTGCTGTACTGCCAGGATGTCGACGAT - 1140
- V E S S G Y *
1141 - CCTCATGTTCCATAATGCAATTTTTTTTCTGCTTAAACGTATGAGAAATGTGCGTAAAT - 1200
1201 - CACATCTCATGGGTTGCAATTGTGAACAGATTGATACTCCTTTTTTTCATGGCCTTAAAT - 1260
1261 - GAAACAATGTTTTAGCGGCGCACCGCGGGCCCGCC - 1297

```

b) A'' et C'' = régions identiques ; B'' = régions qui représentent des variations entre les clones 31B1A et C3

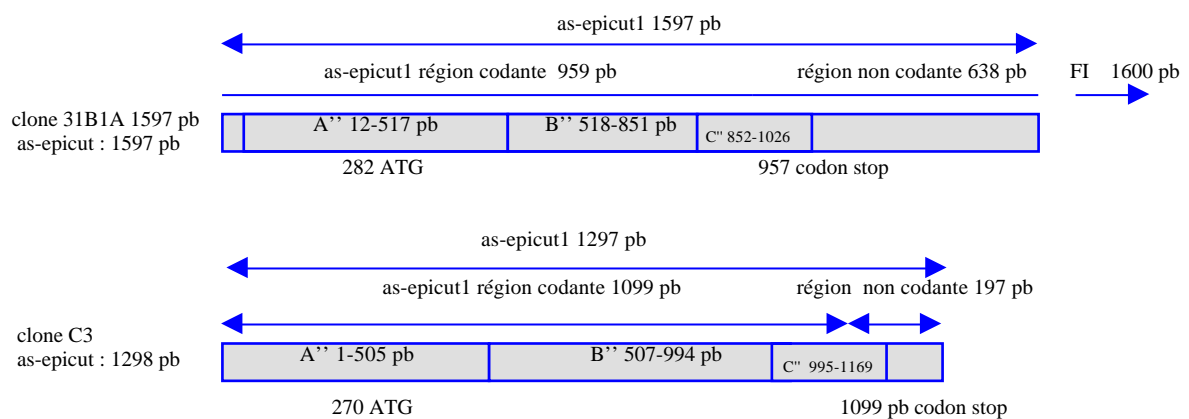


Figure 8. a) Séquence nucléotidique d'as-epicut1 dans le clone C3 et sa protéine prédite. b) Comparaison schématisée entre les séquences d'as-epicut1 dans les clones 31B1A et C3. La région codante d'as-epicut1 manque les premiers 11 nucléotides dans le clone C3 qui commence avec un C en remplaçant un T. Cette région contient 6 régions répétitives dans le clone 31B1A et 7 régions répétitives dans le clone C3. Certaines variations sont présentes dans les régions B''.

- a) Début de la région non codante est identique dans les 4 clones 31B1A, C1, C2 et C3. Cette séquence est située dans les sites suivants :

```

31B1A      960-TTGTTGTAGAAGTTGCTGTACTGCCAGGATGTCGACGATCCTCATGTTCCATAATGCAAT
C1         960-TTGTTGTAGAAGTTGCTGTACTGCCAGGATGTCGACGATCCTCATGTTCCATAATGCAAT
C2         957-TTGTTGTAGAAGTTGCTGTACTGCCAGGATGTCGACGATCCTCATGTTCCATAATGCAAT
C3         1102-TTGTTGTAGAAGTTGCTGTACTGCCAGGATGTCGACGATCCTCATGTTCCATAATGCAAT
          *****
31B1A      TTTTTTT-1026
C1         TTTTTTT-1026
C2         TTTTTTT-1023
C3         TTTTTTT-1168
          *****

```

- b) Une partie de la région non codante est identique dans les 3 clones C1, C2 et C3. Cette séquence est située dans les sites suivants :

```

C1         1028-CTGCTTAAACGTATGAG-----
C2         1024-CTGCTTAAACGTATGAGCAAATGTCGTAATAATCACATCTCATGGGTTGCAATTGTGAAC
C3         1170-CTGCTTAAACGTATGAG-AAATGTGCGTAAATAATCACATCTCATGGGTTGCAATTGTGAAC
          *****

C1         -----
C2         AGATTTGATACTCCTTTTTTCATGGCCTTAAATGAAACAATGTTTT-1129
C3         AGATTTGATACTCCTTTTTTCATGGCCTTAAATGAAACAATGTTTT-1274

```

- c) L'extrémité 3' de la région non codante, au-delà des sites nucléotidiques (a et b), est prolongée avec des séquences variables.

Figure 9. Comparaison des régions non codantes d'as-epicut1 entre les clones 31B1A, C1, C2 et C3.

```

31B1A      SAAFAIALAADAKFLFKRNNAYGDEPVAPAEgyRAPRPEPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAV
C1         VVLFALIALAADAKFLFKRNNAYGDEPVAPAEgyRAPRPEPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAV
C2         -VLFALIALAADAKFLFKRNNAYGDEPVAPAEgyRAPRPEPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAV
C3         --L-AIALAADAKFLFKRNNAYGDEPVAPAEgyRAPRPEPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAV
          :*****

31B1A      ESSGYRKKRNNAYGDEPIAPAAVAEPAPAPVEMAPAPVEQAAEAPAPVESSGYRKKRNN
C1         ESSGYRKKRNNAYGDEPIAPAAVAEPAPAPVEMAPAPVEQAAEAPAPVESSGYRKKRNN
C2         ESSGYRKKRNNAYGDEPIAPAAVAEPAPAPVEMAPAPVEQAAEAPAPVESSGYRKKRNN
C3         ESSGYRKKRNNAYGDEPIAPAAVAEPAPAPVEMAPAPVEQAAEAPAPVESSGYRKKRNN
          *****

31B1A      AYGDEPVAPAGGYAAAEAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGDEPVAP
C1         AYGDEPVAPAGGYAAAQAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGDEPVAP
C2         AYGDEPVAPAGGYAAAEAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGDEPVAP
C3         AYGDEPVAPAGGYAAAEAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGDEPVAP
          *****:*****

31B1A      SGGYAAAQAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGDEPVAPSGGYAAAQ
C1         SGGYAAAQAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGDEPVAPAGGYAAAQ
C2         SGGYAAAQAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGDEPVAPSGGYAAAQ
C3         SGGYAAAQAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGDEPVAPSGGYAAAQ
          *****:*****

31B1A      APAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKRNNAYGDEPVAPSGGYAAAQAPAPVEQAP
C1         APAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKRNNAYGDEPVAPSGGYAVAQAPAPVEQAP
C2         APAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKRNNAYGDEPVAPSGGYAAAQAPAPVEQAP
C3         APAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYRKRNNAYGDEPVAPAGGYAAAQAPAPVEQAP
          *****:*****

31B1A      APIEQAAEAPAAVESSGY-----
C1         APIEQAAEAPAAVESSGY-----
C2         APIEQAAEAPAAVESSGY-----
C3         APIEQAAEAPAAVESSGYRKRNNAYGDEPVAPSGGYAAAQAPAPVEQAPAPIEQAAEA
          *****

31B1A      -----
C2         -----
C1         -----
C3         PAAVESSGY

```

Figure 10. Alignement des séquences peptidiques d'AS-EPICUT1 de différents clones d'ADNc

Figure 11. Table des variations des acides aminés dans les régions répétitives d'AS-EPICUT1 : Comparaison entre le clone 31B1A (référence) et les clones C1, C2 et C3.

Clone	Nb de variations d'acides aminés	Sites nucléotidiques des variations	Codon dans 31B1A / codon modifié	aa dans 31B1A / aa modifié
C1	4	390, 412, 696 et 865 pb	(GCT / <u>T</u> CT); (CGG / C <u>A</u> G); (TCT / <u>G</u> CT); et (GCG / G <u>T</u> G)	A / S, E / Q, S / A, et A / V
C2	–	–	–	–
C3	2	796 et 838	(AGA / <u>A</u> AA); et (TCT / <u>G</u> CT)	K / R , et A / S

Figure 12. Prédiction de la masse moléculaire d'AS-EPICUT1 des différents clones d'ADNc. Nb1 et MM1 sont le nombre des acides aminés et la masse moléculaire de la protéine prédite entière. nb2 et MM2 sont le nombre des acides aminés et la masse moléculaire de la protéine prédite à partir de la première méthionine dans les clones isolés de la librairie d'ADNc d'*A.suum*.

clone	nb1 aa	MM1 en kD	nb2 aa	MM2 en kD
31B1A	318	32	225	22.5
C1	319	32.1	225	22.5
C2	318	32.0	225	22.5
C3	367	36.8	276	27.5

Donc, les données obtenues de la librairie d'ADNc d'*A.suum* pour déterminer et caractériser la séquence complète d'as-epicut1, semblent insuffisantes et incomplètes, et d'autres analyses sur la librairie génomique d'*A.suum* sont nécessaires.

Détection de séquences homologues à as-epicut1 dans d'autres espèces des nématodes.

1) C.elegans

L'hybridation de la librairie ZAP d'ADNc de *C.elegans*, en utilisant l'oligonucléotide P3-biot, a permis l'isolation de plusieurs plages faiblement détectées. Certaines plages ont montré une bande de 150 pb par PCR avec les amorces P3 et P4. Les plages positives ont été purifiées

et excisées en plasmides pBlue-script. Les ADNs des plasmides recombinants excisés ont été extraits, mais malheureusement, le séquençage de ces plages n'a pas réussi.

La comparaison de la séquence entière d'*as-epicut1* avec les données du projet génomique de *C.elegans* n'a pas montré une similarité significative. Par contre, l'utilisation de l'oligonucléotide P3 (5'-AACGCTTACGGTGACGAACCCGT-3' = une partie d'une région répétitive d'*as-epicut1*), a permis l'identification de trois clones de *C.elegans* sur le chromosome IV (K08D12; Y41D4 .CONTIG400 et Y104H12 . CONTIG374). Les deux clones K08D12 et Y41D4 .CONTIG400 sont superposés sur le chromosome IV et le fragment identifié dans ces deux clones est le même. Parmi les clones identifiés, le clone K08D12 a été choisi pour l'analyse. Une identité jusqu'à 77 % a été trouvée en comparaison de K08D12 avec *as-epicut1*.

Le fragment 7625 - 4531 pb dans le clone K08D12 contient 12 régions répétitives dont les 2 dernières se trouvent dans le sens antiparallèle par rapport aux autres (1-10) régions répétitives (Figures 13 et 14). Les régions 11 et 12 sont séparées par une séquence non codante de 652 pb et les régions 10 et 11 par une séquence de 365 pb. Les autres régions répétitives 1-10 se suivent sans interruption, en un seul cadre de lecture.

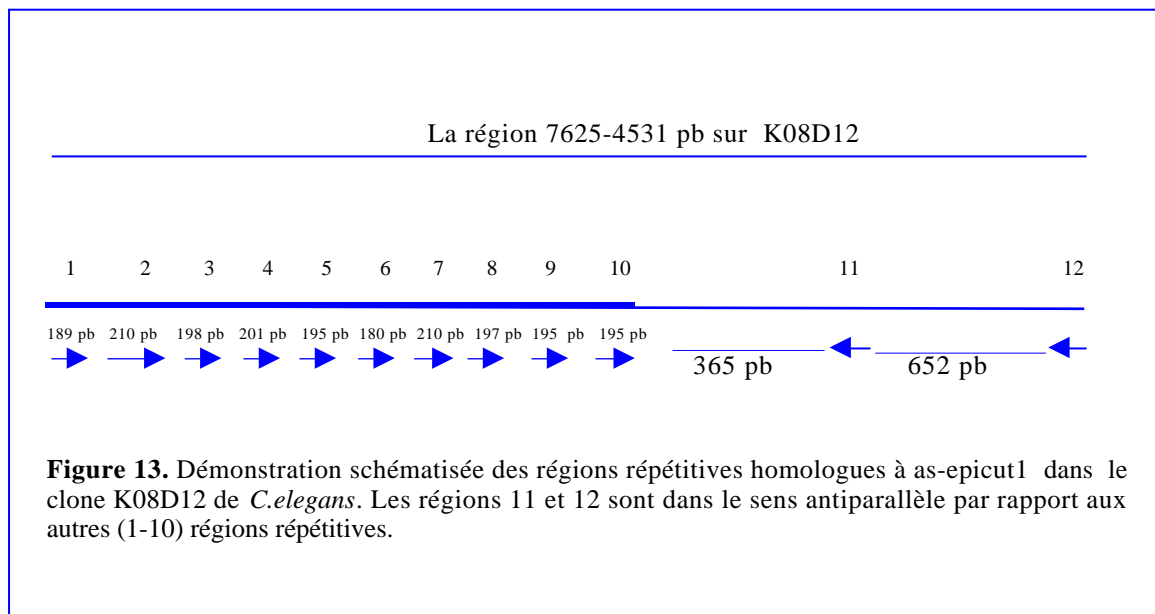


Figure 14. Représentation des positions, des longueurs, et des nombres des aa des régions répétitives 1-12 (homologues à as-epicut1) dans le fragment génomique K08D12 de *C.elegans*.

Région répétitive	Position sur K08D12	nb pb	nb aa	Région répétitive	Position sur K08D12	nb pb	nb aa
région 1	7625 - 7436	189 pb	63 aa	région 7	6446 - 6236	210 pb	70 aa
région 2	7435 - 7225	210 pb	70 aa	région 8	6235 - 6061	174 pb	58 aa
région 3	7224 - 7026	198 pb	66 aa	région 9	6060 - 5865	195 pb	65 aa
région 4	7025 - 6824	201 pb	67 aa	région 10	5864 - 5669	195 pb	65 aa
région 5	6823 - 6628	195 pb	65 aa	région 11	5304 - 5239	66 pb	22 aa
région 6	6627 - 6447	180 pb	60 aa	région 12	4587 - 4531	57 pb	19 aa

Par comparaison avec as-epicut1, la longueur des régions répétitives (1-10) dans le clone K08D12 varie entre 174 pb et 210 pb. Les régions répétitives 11 et 12 sont très courtes et elles semblent limitées à des longueurs correspondant aux régions homologues à as-epicut1 (57 et 66 pb). Dans chaque région répétitive, une partie d'environ 22 aa est identique aux régions répétitives d'AS-EPICUT1 (Figure 15) et cette identité est de 77 % dans la région 2 (Annexe 1).

Ainsi, la longueur de la plus courte région répétitive dans le clone K08D12 (parmi les régions 1 - 10) est supérieure à celle des régions répétitives d'as-epicut1, qui sont formées d'environ 154 pb chacune. L'alignement de la séquence peptidique dans le sens antiparallèle, des régions répétitives (1 - 10) de K08D12 avec la séquence AS-EPICUT1 du clone C3, révèle une identité élevée (Figure 15). De petites séquences formées essentiellement d'alanines et de prolines sont absentes dans AS-EPICUT1 et présentes dans les régions répétitives (1 - 10) du clone K08D12. L'élimination de ces séquences rend les deux séquences AS-EPICUT1 et la séquence peptidique homologue de K08D12 très semblables (Figure 15).

L'analyse de la structure primaire du peptide du fragment 7625 - 5669 pb dans le clone K08D12 montre un profil d'hydrophobicité similaire à AS-EPICUT1 dans les clones étudiés chez *A.suum* (Figure16). La distribution des acides aminés en acides et basiques de la séquence peptidiques (fragment 7625 - 5669 pb) du clone K08D12 et d'AS-EPICUT1 est aussi similaire. La différence remarquable entre AS-EPICUT1 et la séquence homologue dans K08D12 réside principalement dans la fréquence élevée des alanines 36.8 % et des prolines 20.5 % dans les régions répétitives (1 - 10) de K08D12, alors que ces résidus constituent respectivement 28 % et 15.7 % de la séquence peptidique d'AS-EPICUT1 (Figure15).

```

C3      -----
K1-10  LVVKNRAYGDEQVTPAPAASAPADAPVEQAPVAVPAPAPAAAPADCGSAAPAPAAAPA
      1
      ▲

C3      -----
K1-10  ATDSGYRSKRNAYGDEQVTPAPAAAAEAPADAPVEQAPVAVPAPAPAAAPADCGSAAPA
      2
      ▲

C3      -----
K1-10  AAAAPAAAAPAAATDSGYRSKRNAYGDEQVTPAPAAAPADAPVEQAPVAVPAPAPAAAPA
      3
      ▲

C*      -----
K1-10  PDCGSAAPAPAAAPAAATDSGYRSKRN-SYGDEQVTPAPAAAPADAPVEQAPVAVPA
      . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
      . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
      ▲ 4

C3      -----
K1-10  PAPIEQ-----AAEAPAAVE---SSGYRKKRNAYGDEPIAPAAVA-EPAPAPVEM
      PAPVAAPDVECGSAAPAPAAAPAAATDSGYRSKRN-SYGDEQVTPAPAAAPADAPVEQ
      ***:      * * * * * .      . * * * * * : * * * * * : * * . * * * * *
      ▲ 5

C3      -----
K1-10  A---PAPVEQAEEA-----PAPVES-----SGYRKKRNAYGDEPVAPAGGYAAAEP
      APVAVPAPAPAAAPADCGSAAPAPAAAPAAATDSGYRSKRN-AYGDEQVTPAPAAAAEAP
      *      * * . * * *      * * * . :      * * * . * * * * * * : * * . * * *
      ▲ 6

C3      -----
K1-10  APAPVEQA---PAPIEQAAEAP-----AAVESSGYRKKRNAYGDEPVAPSGGYAAAQ
      ADAPVEQAPVAVPAPAPTAAPADCGSAAPAAATDSGYRSKRN-AYGDEQVTPAPAAAAEAP
      * * * * * *      * * * * * *      . * . * * * * * * * * * * * * : * : . * *
      ▲ 7

C3      -----
K1-10  PAPAPVEQA---PAPIEQAAEAP-----PAAVE-----SSGYRKKRNAYGDEP
      PADAPVEQAPVAVPAPAPAAAPADCGSAAPAPAAAPAAAPAAATDSGYRSKRN-AYGDEQ
      ** * * * * *      * * * * * *      * * * .      . * * * * * * * * * *
      ▲ 8

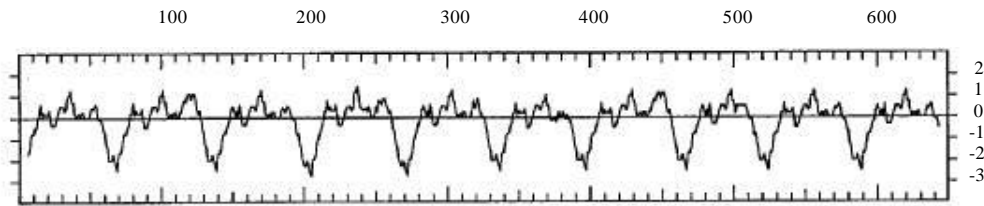
C3      -----
K1-10  VAPSGGYAAAQPAPAPVEQA---PAPIEQAAEAPAA---VESSGYRKKRNAYGDEPV
      VTPAP-AAAPADAPVEQAPVAVPAPAPAAAPAPAPAAAPAAATDSGYRSKRN-AYGDEQV
      * : * :      * * . * * * * * * *      * * * * * * * *      . * * * * * * * * * * * *
      ▲ 9

C3      -----
K1-10  APAGGYAAAQPAPAPVEQA---PAPIEQAAEAP-----AAVESSGYRKRKRNNA
      TPAPAAAAEAPADAPVEQAPVAVPAPAPAAAPADCGSAAPAPAAAPAAATDSGYRSKRN-A
      : * * . * * * * * * * * * * * *      * * * * * *      . * . * * * * * * *
      ▲ 10

C3      -----
K1-10  YGDEPVAPSGGYAAAQPAPAPVEQAPAPIEQAAEAPAAVESSGYZ-----
      YGDEQVTPAP-AAAPADAPVEQAPVAVPAPAPAAAPADCGSAAPAPAAAPAAATDSGY
      * * * * * * : * :      * * . * * * * * * * * : . * * . * * . . *

```

Figure 15. Alignement des séquences des acides aminés des régions répétitives (1-10) du fragment K08D12 de *C.elegans* et d'AS-EPICUT1 du clone C3 d'*A.suum*. Les flèches indiquent le début de chaque région répétitive du fragment K08D12. Les substitutions conservatrices, comme ont été définies par Dayhoff (1972), sont indiquées par (:). Dayhoff M.O., Eck R.V., and Park C.M. (1972) A model of evolutionary change in proteins. In: Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5 (Dayhoff M.O., ed.), pp. 89-99, Natl. Biomed. Res. Found. (USA).

a) *C.elegans*: 648 aa

b) AS-EPICUT1 276 aa

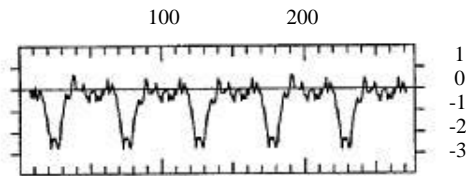


Figure 16 Profil d'hydrophobicité de la séquence peptidique formée des régions répétitives (1 - 10) du clone K08D12 de *C.elegans* (a), et de la protéine prédite AS-EPICUT1 du clone C3 d'*A.suum* (b)

2) *B.pahangi*, *B.malayi* et *O.volvulus*

Plusieurs tentatives d'isoler des séquences codant pour la cuticuline dans *Brugia pahangi* ont été réalisés sur les bibliothèques dans uniZAP d'ADNc de trois différents stades du cycle (L3 précoce avant infection, L3 après l'infection pendant la mue et stade adulte). Ces bibliothèques ont été criblées par hybridation avec la sonde P3-biot localisée dans chaque région répétitive d'as-epicut1. Un faible nombre de plages a été détecté dans le stade précoce L3 et le nombre des plages devient plus important dans le stade L3 post-infection. Le nombre le plus élevé et les plages les plus fortement marquées ont été détectées dans le stade adulte. Ces plages restent à analyser.

Notre comparaison par le programme Blast montre une identité de 66 à 77 % entre les régions répétitive d'as-epicut1 et le clone d'ADNc de *B.malayi* formé de 462 pb, représentant un ARNm du neuvième jour de la mue du stade L3 (Clone SW3D9CA547). L'analyse de ce clone montre qu'il est formé de régions répétitives (voir annexe 3). Les séquences peptidiques

correspondant aux sites 53 - 145 pb et 147 - 248 pb peuvent être alignées avec les régions répétitives homologues d'AS-EPICUT1. L'identité dans certaines régions est de 77 %, par exemple :

```

1) A.suum : 333 SSGYRKKRNNAYGDEPVAPAGGYAAAEPPAPA 425
                SSGYRKKRNNAYGDE V P G PAPA
2) B.malayi: 53 SSGYRKKRNNAYGDESVPPTAGLTLMPAPA 145

1) A.suum : 432 EQAPAPIEQ--AAEAPAAVESSGYRKKRNNAYGD 527
                +QAPA Q AA PA VESSGYRKKRNNAYGD
2) B.malayi: 147 KQAPAQAGQPYAAIVPAPVESSGYRKKRNNAYGD 248

```

Les chiffres au niveau 1) indiquent le site de comparaison dans la séquence nucléotidique d'as-epicut1 dans le clone 31B1A et les chiffres au niveau 2) indiquent le site nucléotidique dans le clone SW3D9CA547

Une identité de 62 % a été révélée entre as-epicut1 et le clone ADNc d'*Onchocerca volvulus* (SWOv3MCAM03C04; SL96MLW-OvmL3; clone onch 28), formé de 443 pb. Ces données nous permettent de commencer une étude sur les gènes de cuticulines chez d'autres nématodes.

Comparaison d'acides aminés entre les différentes protéines prédites du résidu insoluble de la cuticule de différents nématodes (Figure 17)

Les pourcentages d'acides aminés d'AS-CUT-1 d'*A.lumbricoides* (Timinouni et Bazzicalupo, 1997), de CECUT-2 (Lassandro et al., 1994), de CECUT-1 (Sebastiano et al., 1991), et de CUT-1 de *M.artiellia* (De Giorgi et al., 1997), ont été calculés en se basant sur les données publiées. Une comparaison de composition entre les différentes protéines mentionnées et l'AS-EPICUT1 a été établie (Figure 17).

Une similarité importante a été trouvée dans la composition en acides aminés de CUT-1 entre toutes les espèces étudiées. Les résidus alanines et prolines sont présents à une fréquence moyenne dans les protéines CUT-1. Par contre, ces deux acides aminés constituent les composants essentiels dans les protéines CUT-2 et AS-EPICUT1.

D'une façon surprenante, les pourcentages de ces résidus (alanine et proline) dans les deux protéines CUT-2 et AS-EPICUT1 sont les mêmes (28 % et 15 %). Le résidu glutamine est présent à une valeur presque identique (4.4 % -5.7 %) dans toutes les protéines mentionnées: AS-EPICUT1, CUT-1 et CUT-2. La protéine AS-EPICUT1 constitue la protéine la plus riche en tyrosine (5.3 %) et en acide glutamique (10.7 %). A l'exception de CUT-2 qui possède le

taux le plus élevé de glycine (21.6 %), toutes les autres protéines possèdent un pourcentage moyen de glycine, compris entre 6.5 et 7.5 %.

Figure 17. Composition en acides aminés de différentes protéines du résidu insoluble : AS-EPICUT1 d'*A.suum*, CECUT-2 de *C.elegans*, ASCUT-1 d'*A.suum*, CECUT-1 de *C.elegans* et CUT-1 de *Meloidogyne artiellia*.

Residu	<i>A.suum</i> AS-EPICUT1 dans le clone 31B1A (319 aa) n (%)	<i>C.elegans</i> CECUT-2 (231 aa) n (%)	<i>A.suum</i> ASCUT-1 (385 aa) n (%)	<i>C.elegans</i> CECUT-1 (423 aa) n (%)	<i>M.artiellia</i> CUT-1 (433 aa) n (%)
Ala	28.2	28.1	7.8	11.8	10.4
Cys	-	2.6	3.9	3	3.7
Asp	2.2	-	6.0	4.49	4.2
Glu	10.7	1.3	5.5	6.14	5.8
Phe	0.9	3.9	5.2	3.78	5.5
Gly	6.6	21.6	7.5	7.2	6.5
His	-	0.4	1.8	1.9	3.5
Ile	2.2	1.7	6.2	5.2	5.3
Lys	3.4	1.3	3.4	3.3	3.2
Leu	0.6	4.8	6.5	5.9	6.2
Met	0.3	0.4	1.8	1.4	1.2
Asn	3.8	0.4	3.1	3.3	3.9
Pro	15.7	15.2	5.7	6.4	6.7
Gln	4.4	4.8	5.7	4.96	5.5
Arg	4.4	0.9	6.0	4.5	5.5
Ser	5	3.5	6.0	6.85	5.1
Thr	-	1.7	6.5	7.5	5.8
Val	6	3.0	8.1	9	8.8
Trp	-	-	0.3	0.5	0.5
Tyr	5.3	4.3	3.1	2.6	2.8

DISCUSSION

La surface des nématodes est formée d'une structure tri-lamellaire nommée l'épicuticule (Lee et Atkinson, 1976; De Grisse, 1977; Peixoto et De Souza, 1994 et 1995). Cette structure constitue la zone corticale externe et possède une dimension équivalente à l'épicuticule externe de la cuticule des arthropodes (Neville, 1975). Bisoffi et Betschart (1996a) ont isolé une séquence de cuticuline ascut (renommé as-epicut1) dans le clone 31B1A. Le produit d'as-epicut1 a été immunolocalisé dans l'épicuticule d'*A.suum*, avec pour la première fois la détection d'épitopes dans la surface supérieure de la cuticule. Le séquençage d'as-epicut1 n'a pas été complété à cause de la présence de régions répétitives, mais en se basant sur les

fragments d'as-epicut1 déjà séquencés du clone 31B1A (1215 pb), Bisoffi et Betschart ont suggéré la présence de 6 régions répétitives dans la région codante.

Nous avons pu séquencer complètement l'insert du clone 31B1A avec le système EXOIII/Mung Bean nuclease (MBN). Nous avons aussi pu séquencer l'insert du clone 5 (produit du clone 31B1A après le traitement avec le système MBN, figure 2) sans que l'exonucléase intervienne dans la partie codante. La région as-epicut1 dans le clone 31B1A est formée de 1597 pb et la région non séquencée par Bisoffi et Betschart (1996a) de 305 pb a été trouvée dans le site 373 - 677 pb. Comme prévu, notre analyse du clone 31B1A montre que la région codante d'as-epicut1 est formée de 6 régions répétitives. La comparaison d'as-epicut1 dans les banques de données n'a pas révélé une homologie importante avec d'autres fragments génétiques. Seuls les fragments d'as-epicut1 déjà séquencés et envoyés aux banques de données se sont révélés identiques (EMBL: X92101). Ainsi, cette étape de notre travail confirme et complète les études de Bisoffi et Betschart (1996).

D'après l'analyse du clone 31B1A, il semble qu'as-epicut1 est incomplet dans ce clone à cause de l'absence du codon d'initiation à l'extrémité 5'. Pour cette raison, il fallait poursuivre notre recherche afin de compléter la séquence codante d'as-epicut1 et trouver le fragment 5' qui manque. Bien que l'analyse des clones supplémentaires d'ADNc (C1, C2, et C3) isolés de la même librairie n'aie pas complété as-epicut1, des différences importantes ont été trouvées entre ces différents clones. Ces différences forment les bases pour étudier l'organisation structurale du ou des gène(s) as-epicut1 dans le génome. Certaines différences nous laissent aussi proposer des théories concernant le mode de transcription et les mécanismes qui peuvent conduire à la maturation des messagers.

Le nombre important de variations d'as-epicut1 entre le clone C1 et le clone 31B1A (utilisé toujours comme référence dans notre analyse des clones C1, C2, et C3) indique que ces clones pourraient avoir été produits à partir de gènes différents. Le clone C2 représente des variations faibles dans la région codante et les variations sont concentrées aux extrémités 5' et 3'. La découverte la plus importante est représentée par la présence d'autres messagers qu'as-epicut1 dans les clones C2 et 31B1A: la séquence d'un filament intermédiaire dans le clone 31B1A et la séquence d'un ARNt mitochondrial dans le clone C2. La présence de deux gènes dans le même messenger indique que la région as-epicut1 se trouve dans des opérons sur le

génomique. Dans ce cas, il semble que les fragments d'ADNc des clones C2 et 31B1A seraient issus des transcrits polycistroniques en phase de maturation. Il semble aussi que la séquence *as-epicut1* dans ces ADNc a été déjà trans-épissée du côté 5', parce que cette extrémité commence directement avec une région codante, mais l'extrémité 3' suivie par les autres séquences (FI et ARN mitochondrial) n'a pas été encore clivée et polyadénylée. Pour soutenir notre hypothèse et en cherchant dans les rapports publiés, nous avons trouvé que le trans-épissage et l'organisation génétique en opérons sont très connus chez les nématodes en général (Nilsen, 1993). Les exemples de trans-épissage ont été trouvés largement chez *C.elegans* car 25 % des gènes sont organisés en opérons sur le génome, et d'environ 70 % des messagers matures sont produits par trans-épissage (Zorio, 1994; Krause, 1987; Bektesh, 1988; Ross, 1995). Le trans-épissage se déroule aussi chez les autres nématodes et il a été décrit chez *A.lumbricoides*, où la plupart des messagers sont trans-épissés (Maroney, 1995). Notre supposition que les inserts des clones 31B1A et C2 seraient issus d'opérons peut être valable. Cette hypothèse reste à être confirmée car la librairie d'ADNc a été préparée dans le site Not1 et nous avons trouvé ce site dans les inserts des clones 31B1A et C2, et ceci entre les deux séquences de chaque insert (site: 1449-1454 pb du clone 31B1A; et 1156-1161pb du clone C2). Ainsi, la présence du site Not1 rend la possibilité d'une transcription polycistronique faible, car il semble dans ce cas que chaque insert des clones 31B1A et C2 est formé de deux ADNc séparés et qui ont été ligués ensemble pendant la préparation de la librairie au niveau du site Not1.

D'autres hypothèses ont été aussi proposées à partir de l'analyse du clone C3 dans lequel, contrairement aux clones 31B1A, C1, et C2 qui contiennent 6 régions répétitives, la région codante d'*as-epicut1* est formée de 7 régions répétitives. Pour expliquer le nombre variable de régions répétitives d'un clone à un autre deux hypothèses peuvent être présentées. La première suggère que le gène *as-epicut1* serait présent en plusieurs copies dans le génome et que chaque copie contiendrait un nombre différent de régions répétitives. La deuxième hypothèse indique qu'*as-epicut1* n'existerait qu'en une seule copie dans le génome avec un nombre élevé (égal ou supérieur à 7) de régions répétitives et que ce nombre diminuerait dans les messagers pendant la phase de maturation post-transcriptionnelle. La diminution du nombre de régions répétitives dans les messagers serait variable d'un transcrit à un autre, ce qui

conduirait à produire des messagers matures avec des tailles différentes. De cette façon, les messagers matures pourraient avoir un nombre de régions répétitives variable qui pourrait être 7 (comme le clone 2.1), 6 (comme les clones 31B1A, C1, et C2) ou un autre nombre. Le mécanisme qui pourrait conduire à de tels changements post-transcriptionnels pourrait être l'épissage différentiel et l'élimination de fragments contenant des régions répétitives.

Ces deux théories semblent logiques, parce que les phénomènes de copies multiples et d'épissage différentiel sont très répandus chez les nématodes, surtout chez *C.elegans*. Même au niveau de composants cuticulaires, les collagènes, deux gènes identiques successifs (*col-12* et *col-13*) ont été trouvés sur le même chromosome chez *C.elegans* (Park, 1990). Le même résultat a été trouvé chez le nématode parasitaire *Ostertagia circumcincta*, dans lequel deux gènes de collagènes homologues aux *col-12* et *col-13* ont été identifiés et nommés *colost-1* et *colost-2* (Johnstone et al, 1996). Le mécanisme d'épissage différentiel est aussi bien répandu dans la phase de maturation post-transcriptionnelle chez les nématodes. Parmi les exemples les plus récents, le cas des sous-unités du canal conducteur de chlorure qui sont produites par épissage différentiel chez *C.elegans*, *Haemonchus contortus* et peut-être aussi chez *A.suum* (Jagannathan, 1999).

Afin de vérifier l'absence du début de la région codante d'as-epicut1 dans tous les clones étudiés, nous avons comparé la masse moléculaire d'AS-EPICUT1 déduite à partir des différents clones d'ADNc (Table 12) avec les résultats des études immunologiques précédentes (Bisoffi et Betschart, 1996; Marti et Betschart, 1991). La masse moléculaire des protéines prédites de tous les clones isolés ne dépasse pas 37 kD (Figure12). Si la traduction du messager commence à partir de la première méthionine par exemple dans le site 282 pb dans le clone 31B1A, la protéine prédite d'as-epicut1 serait d'environ 22.5 kD dans les clones à 6 régions répétitives, ou elle serait d'environ 28 kD dans le clone C3. D'un autre côté, si on tient compte de la région codante entière d'as-epicut1 dans le clone 31B1A, la protéine prédite serait formée de 318 aa avec une masse moléculaire de 32 kD dans la plupart des clones et de 37 kD dans le clone C3. En revanche la réaction d'un sérum préparé contre la cuticuline d'*A.suum*, testé sur un extrait de l'hypoderme, montre une bande d'environ 67 kD (données non publiées de Marti, 1991). Un autre résultat de western-blot avec des anticorps anti-

cuticuline d'*A.suum* montre une bande 40 kD sur un extrait de l'hypoderme des nématodes adultes d'*A.suum* (Bisoffi et Betschart, 1996a). Donc, avec ou sans tenir compte de la première méthionine d'AS-EPICUT1 dans les clones analysés, la masse moléculaire de la protéine prédite ne correspond pas aux données immunologiques précédentes et elle reste inférieure à la valeur réelle.

Notre recherche dans les banques des données nous laisse supposer que le gène *as-epicut1* présente des différences importantes d'une espèce de nématodes à une autre. L'utilisation d'une seule région répétitive, a permis l'identification de séquences de *C.elegans* avec une identité remarquable dans certaines régions. Ces séquences se trouvent sur le chromosome IV de *C.elegans* et elles ont été identifiées dans les clones K08D12; Y41D4 .CONTIG400; et Y104H12 . CONTIG374. Ces fragments sont formés, comme *as-epicut1*, de régions répétitives, parmi lesquels le clone K08D12 contient des régions avec une identité jusqu'à 77 % en comparaison avec *as-epicut1*. Donc, il est possible que cette région génomique soit responsable de la synthèse d'une protéine équivalente à AS-EPICUT. Une homologie entre *as-epicut1* et un fragment d'ADNc de *B.malayi* (le clone SW3D9CA547 d'ADNc de *B.malayi*) a été trouvée. Ce fragment d'ADNc semble aussi être une partie d'un messenger homologue à *as-epicut1*.

D'après les analyses de ces clones qui pourraient contenir des fragments homologues à *as-epicut1*, on constate que la séquence peptidique répétée (SSGYRKKRNNAYGDE) constituée de 15 aa est conservée entre les trois espèces de nématodes *A.suum*, *C.elegans*, et *B.malayi*. D'autres acides aminés d'*as-epicut1*, hors de la séquence (SSGYRKKRNNAYGDE), sont aussi conservés d'une espèce à une autre, mais d'une façon moins régulière. Dans cette séquence peptidique, parmi les acides aminés soulignés, certains sont remplacés par d'autres ou absents dans *C.elegans*. Par contre, cette séquence est 100 % identique avec les régions équivalentes dans le clone identifié chez *B.malayi* (Annexe 3). En se basant sur la recherche d'homologues dans les banques de données et sur le mode de vie de différentes espèces, il semble logique qu'*A.suum* possède une structure de surface qui ressemble mieux à celle de *B.malayi* qu'à celle de *C.elegans*.

Notre identification de fragments homologues à as-epicut1 chez des autres espèces confirme l'étude immunologique de Bisoffi et Betschart (1996a). Cette précédente étude a démontré par des réactions croisées avec des anticorps anticuticuline d'*A.suum*, la présence de mêmes épitopes dans la zone corticale et dans l'hypoderme de *B.pahangi* en stade adulte. Une autre étude de Betschart et al. (1990), avec des anticorps dirigés contre la cuticuline d'*A.suum*, montre la présence de réactions croisées entre des structures épicuticulaires de plusieurs filaires parasites. Les anticorps anticuticuline d'*A.suum* réagissent avec les couches électro-denses de la zone corticale d'*A.viteae* et de *B.pahangi* au stade adulte. Une réaction faible a aussi été trouvée dans la zone corticale d'*O.volvulus*, au stade adulte (Betschart et al., 1990).

Donc, les données immunologiques montrent la possibilité d'épitopes conservés dans la cuticuline chez différentes espèces des nématodes. Par conséquent ces données supportent notre résultat concernant les fragments homologues à as-epicut1 chez *C.elegans*, *B.malayi* et *O.volvulus* trouvés dans les banques de données. La combinaison de données immunologiques (Bisoffi et Betschart, 1996a; Betschart et al., 1990) et génétiques (trouvées dans les banques des données), nous laisse supposer que la région répétitive conservée (SSGYRKKRNNAYGDE) contient les épitopes conservés chez les différentes espèces. Il est connu qu'une région conservée remplit souvent une fonction elle aussi conservée chez les différentes espèces. Pour cette raison nous essayons d'analyser cette région à travers sa composition en acides aminés.

Il est remarquable que la séquence (SSGYRKKRNNAYGDE) contient deux tyrosines (Y). Les tyrosines peuvent intervenir dans la formation de liaisons covalentes inter- et intramoléculaires. Ces liaisons sont connues comme des liaisons très fortes et résistantes aux différents agents chimiques et aux forces physiques. Le rôle de la tyrosine dans les molécules de la cuticuline a été décrit largement comme un élément essentiel dans la formation de liaisons croisées di-, tri et iso-tri-tyrosines, inter- et intramoléculaires. Les liaisons tyrosines jouent un rôle majeur dans la construction du résidu insoluble de la cuticule des insectes d'où Anderson (1964) a isolé des molécules de dityrosines. Chez les nématodes, l'importance des liaisons di-tyrosines dans la formation du résidu insoluble de la cuticule a été mise en évidence par plusieurs chercheurs. Fujimoto et al. (1981) ont isolé des di-, tri- et des isotri-tyrosines de la cuticule d'*Ascaris*. Fetterer et Rhoads (1990) ont démontré que le résidu insoluble résistant au

mercapto-éthanol de la cuticule d'*H.contortus* au stade larvaire infectieux contient des di- et des isotri-tyrosines. Lassandro et al. (1994) ont démontré le rôle essentiel des liaisons di-tyrosines dans la formation de CUT-1 chez *C.elegans* et dans la polymérisation des protéines. Donc, la présence de deux tyrosines dans la séquence peptidique conservée entre les trois espèces *A.suum*, *B.pahangi* et *C.elegans*, suggère que cette région joue un rôle important dans la formation du complexe insoluble de la cuticuline.

Les études biochimiques classiques ont montré que le résidu insoluble de la cuticule d'*A.lumbricoides* est très riche en prolines, ~ 30 %, alanines, ~ 16 %, glycines, ~ 15 %, acides glutamiques, ~ 10 %, et tyrosines, ~ 7 % (Fujimoto et Kanaya, 1973). Parmi toutes les protéines supposées constituer le résidu insoluble de la cuticule, la composition en acides aminés d'AS-EPICUT1 ressemble le mieux aux critères de base (Figure17). Le taux d'acide glutamique dans AS-EPICUT1 (10.7 %) est équivalent à la valeur classique de la cuticuline. De même, le taux de tyrosine dans AS-EPICUT1 (5,3 %) est plus proche de la valeur classique que celui des autres protéines. Il est évident que la protéine CUT-1 qui est pauvre en prolines et alanines, ne correspond pas aux données classiques de Fujimoto. En revanche CUT-2 et AS-EPICUT1 possèdent les mêmes taux en proline (15 %) et en alanine (28 %), mais ces valeurs ne correspondent pas exactement aux valeurs de base. Les taux de glycine sont aussi différents dans AS-EPICUT1 (6.6 %) et CUT-2 (21.6 %), mais ils représentent une valeur moyenne d'environ 15 %, équivalente à celle trouvée par Fujimoto. En général, le résidu insoluble peut être constitué de plusieurs protéines et il semble que l'analyse individuelle de chaque protéine n'est pas suffisante pour l'identifier comme composant du résidu insoluble. En comparaison avec les anciennes données, l'ensemble de nos analyses montre que les protéines identifiées jusqu'à présent ne représentent pas l'ensemble des constituants protéiques du résidu insoluble. Bien que les deux protéines CUT-2 et spécialement AS-EPICUT1 possèdent des caractéristiques satisfaisantes pour la cuticuline, les valeurs individuelles ou moyennes de leurs compositions en acides aminés ne sont pas équivalentes exactement aux valeurs de base.

La présence de régions répétitives dans les protéines du résidu insoluble est une caractéristique remarquable. La séquence cut-2 de *C.elegans* est formée de 13 régions répétitives courtes

hydrophobes (Lassandro et al., 1994). La séquence as-epicut1 dans le clone 31B1A, est constituée de 6 régions répétitives formées chacune d'une partie centrale légèrement hydrophobe flanquée par deux parties hydrophiles. Par comparaison avec le clone 31B1A, le même nombre de régions répétitives a été trouvé dans deux autres clones contenant as-epicut1 (C1 et C2), mais nous avons trouvé 7 régions répétitives dans le clone C3. Ce qui démontre que le nombre des régions répétitives d'as-epicut1 n'est pas limité à 6.

Il semble que le nombre des régions répétitives peut être différent d'une protéine à une autre dans le résidu insoluble de la cuticule (comme CUT-2 et AS-EPICUT1), entre les protéines homologues d'une espèce à une autre (comme le fragment K08D12 et AS-EPICUT1), et au sein de la même protéine (comme le cas d'AS-EPICUT1 qui peut contenir 6 ou 7 régions répétitives). Cette hypothèse doit être vérifiée ultérieurement par l'utilisation d'anticorps pour tester les précurseurs dans les différentes espèces et pour vérifier que les clones identifiés chez *C.elegans* et *B. malayi* contenant des régions répétitives sont homologues à as-epicut1. Donc il semble de ce qui précède que le résidu insoluble de la cuticule peut être constitué de plusieurs protéines différentes et que la présence de régions répétitives est une caractéristique remarquable de ces protéines.

Annexe1**Comparaison des séquences des aa entre AS-EPICUT1 du clone C3 d'*A.suum* et le clone K08D12 de *C.elegans***

AS-EPICUT1: 120 SSGYRKKR--NNAYGDEPVAPSGG 141 SSGYRKKR N YGDE AP GG	AS-EPICUT1: 121 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 139 SGYR KRN+ YGDE V P+
C.elegans: 5239 SSGYRKKRASQNGYGDE--APVGG 5304	C.elegans: 6822 SGYRSKRNS-YGDEQVTPA 6769
AS-EPICUT1: 69 SSGYRKKR--NNAYGDEPVAPSGG 90 SSGYRKKR N YGDE AP GG	AS-EPICUT1: 174 YRRKRNNAYGDEPVAPS 190 YR KRN AYGDE V P+
C.elegans: 5239 SSGYRKKRASQNGYGDE--APVGG 5304	C.elegans: 6231 YRSKRN-AYGDEQVTPA 6184
AS-EPICUT1: 73 RKKR--NNAYGDEPVAPSGG 90 RK+R +N+YGDE V P+GG	AS-EPICUT1: 174 YRRKRNNAYGDEPVAPS 190 YR KRN AYGDE V P+
C.elegans: 4531 RKRADNSYGDEAVTPAGG 4587	C.elegans: 6060 YRSKRN-AYGDEQVTPA 6013
AS-EPICUT1: 124 RKKR--NNAYGDEPVAPSGG 141 RK+R +N+YGDE V P+GG	AS-EPICUT1: 174 YRRKRNNAYGDEPVAPS 190 YR KRN AYGDE V P+
C.elegans: 4531 RKRADNSYGDEAVTPAGG 4587	C.elegans: 5865 YRSKRN-AYGDEQVTPA 5818
AS-EPICUT1: 175 RRRKRNNAYGDEPVAPSGG 192 +R+ +N+YGDE V P+GG	AS-EPICUT1: 174 YRRKRNNAYGDEPVAPS 190 YR KRN AYGDE V P+
C.elegans: 4534 RRRADNSYGDEAVTPAGG 4587	C.elegans: 6621 YRSKRN-AYGDEQVTPA 6574
AS-EPICUT1: 174 YRRKR--NNAYGDEPVAPSGG 192 YR+KR N YGDE AP GG	AS-EPICUT1: 174 YRRKRNNAYGDEPVAPS 190 YR KRN AYGDE V P+
C.elegans: 5248 YRKRASQNGYGDE--APVGG 5304	C.elegans: 7215 YRSKRN-AYGDEQVTPA 7168
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 174 YRRKRNNAYGDEPVAPS 190 YR KRN AYGDE V P+
C.elegans: 7221 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 7168	C.elegans: 7425 YRSKRN-AYGDEQVTPA 7378
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 174 YRRKRNNAYGDEPVAPS 190 YR KRN+ YGDE V P+
C.elegans: 6627 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 6574	C.elegans: 7017 YRSKRNS-YGDEQVTPA 6970
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 174 YRRKRNNAYGDEPVAPS 190 YR KRN+ YGDE V P+
C.elegans: 6447 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 6394	C.elegans: 6816 YRSKRNS-YGDEQVTPA 6769
AS-EPICUT1: 121 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 139 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 19 SGYRKKRNNAYGD 31 SGYR KRN AYGD
C.elegans: 6627 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 6574	C.elegans: 7431 SGYRSKRN-AYGD 7396
AS-EPICUT1: 121 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 139 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 19 SGYRKKRNNAYGD 31 SGYR KRN AYGD
C.elegans: 6237 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 6184	C.elegans: 7221 SGYRSKRN-AYGD 7186
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 19 SGYRKKRNNAYGD 31 SGYR KRN AYGD
C.elegans: 7431 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 7378	C.elegans: 6627 SGYRSKRN-AYGD 6592
AS-EPICUT1: 121 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 139 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 19 SGYRKKRNNAYGD 31 SGYR KRN AYGD
C.elegans: 7221 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 7168	C.elegans: 6447 SGYRSKRN-AYGD 6412
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 19 SGYRKKRNNAYGD 31 SGYR KRN AYGD
C.elegans: 6237 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 6184	C.elegans: 6237 SGYRSKRN-AYGD 6202
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 19 SGYRKKRNNAYGD 31 SGYR KRN AYGD
C.elegans: 6066 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 6013	C.elegans: 6066 SGYRSKRN-AYGD 6031
AS-EPICUT1: 121 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 139 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 19 SGYRKKRNNAYGD 31 SGYR KRN+ YGD
C.elegans: 7431 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 7378	C.elegans: 7023 SGYRSKRNS-YGD 6988
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN AYGDE V P+	AS-EPICUT1: 19 SGYRKKRNNAYGD 31 SGYR KRN+ YGD
C.elegans: 5871 SGYRSKRN-AYGDEQVTPA 5818	C.elegans: 6822 SGYRSKRNS-YGD 6787
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN+ YGDE V P+	AS-EPICUT1: 76 RNNAYGDEPVAPS 88 + NAYGDE V P+
C.elegans: 7023 SGYRSKRNS-YGDEQVTPA 6970	C.elegans: 7611 KRNAYGDEQVTPA 7573
AS-EPICUT1: 70 SGYRKKRNNAYGDEPVAPS 88 SGYR KRN+ YGDE V P+	AS-EPICUT1: 127 RNNAYGDEPVAPS 139 + NAYGDE V P+
C.elegans: 6822 SGYRSKRNS-YGDEQVTPA 6769	C.elegans: 7611 KRNAYGDEQVTPA 7573

Bibliographie

- Andersen S. O. (1964) The cross-links in resilin identified as dityrosine and trityrosine. *Biochemica and Biophysica Acta* 93, 213-215
- Bektesh S., Van Doren K., and Hirsh D. (1988) Presence of the *Caenorhabditis elegans* spliced leader on different mRNAs and in different genera of nematodes. *Genes and Development* 2, 1277-1283
- Betschart B., Marti S., and Glaser M. (1990) Antibodies against the cuticlin of *Ascaris suum* cross-react with epicuticular structures of filarial parasites. *Acta Tropica* 47, 331-338
- Bisoffi M., and Betschart B. (1996a) Repetitive peptide motifs in the cuticlin of *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80, 55-64
- Bisoffi M., and Betschart B. (1996b) *Ascaris suum*: molecular cloning of an intermediate filament. *Tropical Medicine and International Health* 1, 640-645
- Cox G. N., Straprans S. and Edgar R. S. (1981) The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. II. Stage-specific changes in Ultrastructure and Protein Composition during Postembryonic Development. *Developmental Biology* 86, 456-470
- De Giorgi C., De Luca F., Di Vito M., and Lamberti F. (1997) Modulation of expression at the level of splicing of cut-1 RNA in the infective second-stage juvenile of the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Molecular and General Genetics* 253, 589-598
- De Grisse A. T. (1977) "De ultrastructuur van het zenuwstelsel in de kop van 22 soorten planten parasitaire nematoden, behorende tot 19 genera (Nematoda: Tylenchida)." Rijksuniversiteit, Ghent, Belgium.

- Favre R., Hermann R., Cermola M., Hohenberg, H., Muller M., and Bazzicalupo P. (1995) Immuno-gold-labelling of CUT-1, CUT-2 and cuticlin epitopes in *Caenorhabditis elegans*, and *Heterorhabditis sp* processed by high pressure freezing and freeze-substitution. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 27, 341-347
- Favre R., Cermola M., Nunes C. P., Hermann R., Müller M., and Bazzicalupo P. (1998) Immuno-Cross-Reactivity of CUT-1 and cuticlin epitopes between *Ascaris lumbricooides*, *Caenorhabditis elegans*, and *Heterorhabditis*. *Journal of Structural Biology* 123, 1-7
- Fetterer R. H., and Roads M. L. (1990) tyrosine derived cross-linking amino acids in the sheath of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of Parasitology*. 76, 619-624
- Fujimoto D., and Kanaya S. (1973) Cuticlin: A noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 157, 1-6
- Fujimoto D., Horiuchi K., and Hirama M. (1981) Isotryrosine, a new crosslinking amino acid isolated from *Ascaris* cuticle collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 99, 617-623
- Jagannathan S., Laughton D. L., Critten C. L., Skinner, T. M. Horoszok L., and Wolstenholme A. J. (1999) Ligand-gated chloride channel subunits encoded by the *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum* orthologues of the *Caenorhabditis elegans* gbr-2 (avr-14) gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 103, 129-140
- Johnstone I. L., Schafi Y., Majeed A., and Barry D. (1996) Cuticular collagen genes from the parasitic nematode *Ostertagia circumcincta*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80, 103-112

- Krause M., and Hirsh D. (1987) A *trans* -spliced leader sequence on actin mRNA in *C.elegans*. *Cell* 49, 753-761
- Lassandro F., Sebastiano M., Zei F., and Bazzicalupo P. (1994) The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 65, 147-159
- Lee D. L., and Atkinson H. J. (1976) "Physiology of nematodes." Macmillan, New York.
- Lewis E., Hunter S. J., Tetley L., Nunes C. P., Bazzicalupo P., and Devaney E. (1999) cut-1-like genes are present in the filarial nematodes, *Brugia pahangi* and *Brugia malayi*, and , as in other nematodes, code for components of the cuticle. *Molecular and Biochemical Parasitology* 101, 173-183
- Maizels R. M., Blaxter M., and Selkirk M. E. (1993) Forms and functions of nematode surfaces. *Experimental Parasitology* 77, 380-384
- Marti S. (1991) Biochemische und immunologische charakterisierung von cuticlin, einem strukturprotein aus der kutikula von *Ascaris suum*. Thesis, Basel.
- Maroney P. A., Denker J. A., Darzynkiewicz E., Laneve R. and Nilsen. T. W. (1995) Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are *trans* -spliced: a role for spliced leader addition in translational efficiency. *RNA* 1, 714-723
- Nelsen T. W. (1993) Trans-splicing of nematode pre-messenger RNA. *Annual Review of Microbiology* 47, 413-440
- Neville A. C. (1975) "Biology of Arthropod Cuticle." Springer-Verlag, Berlin and New York

- Parise G., and Bazzicalupo P., (1997) Assembly of nematode cuticle: role of hydrophobic interactions in CUT-2 cross-linking. *Biochemica and Biophysica Acta* 1337, 295-301
- Park Y. S. and Kramer J. M. (1990) Tandemly duplicated *Caenorhabditis elegans* collagen genes differ in their modes of splicing. *Journal of Molecular Biology* 211, 395-406.
- Peixoto C.A., and De Souza W. (1995) Freeze -facture and deep-etch view of the cuticle of adult forms of *Caenorhabditis elegans*. *Tissue Cell* 27, 561-568
- Peixoto C.A., and De Souza W. (1994) Freeze -facture characterization of the cuticle of adult and dauer forms of *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology Research* 80, 53-57
- Politz S. M., and Philipp. M. (1992) *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes a focus on the cuticle. *Parasitology Today* 8, 6-12
- Ristoratore F., Cermola M., Nola, M., Bazzicalupo P., and Favre R. (1994) Ultrastructural immuno-localization of CUT-1 and CUT-2 antigenic sites in the cuticles of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 26(3), 437-443
- Ross L. H., Freedman J. H., and Rubin C. S. (1995) Structure and expression of novel spliced leader RNA genes in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 22066-22075
- Sebastiano M., Lassandro F., and Bazzicalupo P. (1991) cut-1 a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a Dauer-specific noncollagenous component of the cuticle. *Developmental Biology* 146, 001-0012
- Timinouni M., and Bazzicalupo P. (1997) cut-1-like genes of *Ascaris lumbricoides*. *Gene* 193, 81-87

Zorio D. A. R., Cheng N. N., Blumenthal T. and Spieth J. (1994) Operons as a common form of chromosomal organization in *C.elegans*. *Nature* 372, 270-272

Chapitre IV

Détermination des fragments génomiques codants pour la cuticuline d'*Ascaris suum*

INTRODUCTION

Les composants cuticulaires structuraux des nématodes sont synthétisés dans l'hypoderme et transportés dans la cuticule. Ces composants forment par des ponts inter- et intramoléculaires un complexe de plusieurs couches extracellulaires (Bird et Bird, 1991). Les collagènes qui forment environ 80 % des composants cuticulaires, ont été largement étudiés. Par contre, les études du résidu insoluble de la cuticule ont été développées seulement dans les dernières années, et ceci grâce à l'évolution des techniques de biologie moléculaire.

Trois séquences responsables de la production de trois protéines différentes ont été déterminés et analysés. Parmi elles, deux séquences ont été identifiées chez *Caenorhabditis elegans*, cecut-1 (Sebastiano et al, 1991), et cecut-2 (Lassandro et al 1994) et la troisième séquence, as-epicut1, a été identifiée chez *Ascaris suum* (Bisoffi et Betschart, 1996). Des gènes homologues à cecut-1 ont été identifiés dans plusieurs espèces des nématodes parasites comme *Meloidogyne artiellia* (De Giorgi et al, 1996), *Ascaris lumbricoides* (Timinouni et Bazzicalupo, 1997), *Brugia pahangi* et *Brugia malayi* (Lewis et al, 1999). L'alignement des séquences des acides aminés de CUT-1 de différentes espèces étudiées montre que ces protéines sont très semblables (Lewis et al, 1999). Les études immunologiques concernant les protéines prédites démontrent que CECUT-1, CECUT-2 et AS-EPICUT1 sont des composants de la cuticule. Les protéines CUT-1 montrent par des réactions croisées, la présence d'épitopes communs entre différentes espèces. Les protéines CUT-1 et CUT-2 ont été immunolocalisées surtout dans les zones corticales et médianes de la cuticule et dans l'hypoderme (Sebastiano et al, 1991; Ristatore et al, 1994; Favre et al, 1998). Seule la zone corticale externe des larves L1 de *C.elegans* a démontré des épitopes de CECUT-1 et de CECUT-2 (Ristatore et al, 1994). Par contre, la protéine AS-EPICUT1 a été immunolocalisée dans l'épicuticule d'*A.suum* au stade adulte ainsi que dans l'hypoderme à une densité faible (Bisoffi et Betschart, 1996).

Plusieurs clones représentent le gène as-epicut1 isolés d'une librairie d'ADNc d'*A.suum* ont été analysés (voir Chapitre III). L'étude de ces clones montre que la région codante d'as-epicut1 est formée de régions répétitives et que le nombre de ces régions est variable d'un

clone à un autre. Ces régions répétitives se révèlent identiques entre elles dans le même clone et dans tous les clones analysés. Malgré la présence de variations ponctuelles dans leurs séquences nucléotidiques, la plupart de ces variations ne se manifestent pas au niveau des acides aminés. À côté de ces variations dans les régions répétitives, d'autres variations remarquables se trouvent dans les extrémités 5' et 3'. L'analyse des protéines prédites AS-EPICUT1 montrent la dominance de certains acides aminés, alanine, proline, et acide glutamique, et chaque région répétitive contient 3 tyrosines. La structure primaire d'AS-EPICUT1 démontre que chaque région répétitive ressemble à un élément transmembranaire avec deux extrémités hydrophiles et une partie centrale hydrophobe. La comparaison de structure primaire entre AS-EPICUT1 et CECUT-2, montre certaines caractéristiques communes. Ces deux protéines sont formées de régions répétitives et possèdent les mêmes pourcentages en alanine et en proline. D'un autre côté, les séquences de CUT-1 et AS-EPICUT1 se révèlent différentes et elles n'ont aucune caractéristique commune (Chapitre précédent).

L'étude des clones d'ADNc indique que le messenger d'as-epicut1 est incomplet et que la partie 5' qui contient le codon d'initiation manque dans tous les clones analysés. Dû au nombre variable de régions répétitives dans as-epicut1 d'un clone à un autre, les théories de copies multiples du gène as-epicut1 dans le génome et d'épissage différentiel "alternative splicing" ont été proposées. Les différentes variations dans les extrémités des messagers et la présence dans le même clone d'autres messagers qu'AS-EPICUT1, indiquent que la région génomique codante pour AS-EPICUT1 pourrait être une région polycistronique (Chapitre III, non publié). Si cette théorie est correcte, les messagers polycistroniques passeraient par des phases de maturation post-transcriptionnelles qui aboutiraient à la formation de messagers monocistroniques par trans-épissage "trans-splicing" (Spieth et al, 1993; Matthews et al, 1994; LeBowitz et al, 1993). Cette dernière hypothèse devient faible en présence d'un site Not1 entre les deux messagers qui forment l'insert de l'ADNc du clone 31B1A, ainsi que entre les deux messagers du l'insert du clone C2 (voir chapitre III).

Afin de clarifier les différences trouvées entre les messagers, et afin de trouver le codon d'initiation dans la partie 5' qui manque dans tous les clones d'ADNc analysés, une étude de l'ADN génomique était indispensable. Dans ce chapitre une étude génétique complémentaire a

été réalisée sur une librairie d'ADNg et sur un extrait d'ADN génomique d'*A.suum* (au stade adulte).

MATERIEL ET METHODES

La librairie Lambda EMBL3A et les nématodes A.suum.

La librairie Lambda EMBL3A construite avec des fragments génomiques *d'A.suum* (dans le site EcoR1) a été reçue du Prof. F. Müller (Université de Fribourg, Suisse). Les vers adultes d'*A.suum* ont été reçus d'un abattoir local (Val-de-Travers) et du Prof. F. Müller.

Criblage de la librairie d'ADN génomique

Des oligonucléotides biotinylés à l'extrémité 5' (MWG-Biotech GmbH, Allemagne) ont été utilisés dans le criblage de la librairie Lambda EMBL3A (Table1). Ces oligonucléotides ont été choisis à partir des séquences d'as-epicut1 dans les clones d'ADNg (voir chapitre III).

Table 1 Oligonucléotides marqués à la biotine dans l'extrémité 5' utilisés comme sondes dans le criblage de la librairie d'ADN génomique d'*A.suum*.

Sondes biotinylées	Séquences des sondes biotinylées	Position sur la référence le clone 31B1A	Sens/antisens
D-biot	5'-biot-AGCGCCGCTTTCGCGATTGCGT-3'	3-24	sens
P3-biot	5'-biot-AACGCTTACGGTGACGAACCCGT-3'	666-688	sens
F-biot	5'-biot-ATAACCACTAGATTCTACTGCTGC-3'	933-956	antisens

1. La séquence de la sonde P3-biot est formée de 23 nucléotides qui se retrouvent dans chaque région répétitive d'as-epicut1. Cette sonde est identique à l'amorce P3 non modifiée.
2. La séquence de la sonde D-biot est formée de 22 nucléotides et elle se trouve à l'extrémité 5' de la région codante d'as-epicut1.
3. La séquence de la sonde F-biot est formée de 24 nucléotides et elle se trouve à l'extrémité 3' antisens de la région codante d'as-epicut1.

La technique d'hybridation avec les oligonucléotides marqués à la biotine, a été suivie comme décrit dans le protocole du kit (Tropix Detection of Biotin-Labeled DNA with CDP-Star or CSPD Chemiluminescent Substrate, Cat. N° SL100SB, U.S.A.).

Un volume de 600 µl d'*E.coli*, (XL1Blue MRA pour les plages de la librairie EMBL3A ou *E.coli* XL1Blue MRF' pour les plages ZapII), à DO 0.6 (600) infestées avec 50,000 pfu de la librairie d'ADNg ou des phages recombinants a été étalé sur des boîtes de LB-agar sans antibiotiques. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit, et les plages résultant de la lyse bactérienne pendant l'amplification des phages ont été transférées sur des membranes de nylon chargées positivement (MS1 Micron Separations INC, MagnaGraph de Life Systems Design, Suisse). Ensuite, l'ADN a été dénaturé sur les membranes avec NaCl (1.5 M) / NaOH (0.2 M), neutralisé avec Tris-HCl (0.4 M), pH 7.6 / 2 × SSC, puis les membranes ont été rincées avec du 2 × SSC. Après une incubation à 80°C pendant 2 heures pour fixer l'ADN, les membranes ont été préhybridées et hybridées comme décrit dans le protocole Tropix, et soumises à la détection chimioluminescente par une déphosphorylation avec la phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine (Avidex-AP). La décomposition de CSPD provoque l'émission d'une lumière constante et prolongée avec un maximum à 461 nm sur la membrane du nylon. Après la déphosphorylation enzymatique, la membrane a été exposée à un film (BioMax, Kodak, BML n°5568 de Polylabo SA, Suisse).

Réactions PCR.

Dans les réactions PCR nous avons utilisé la polymérase Bio Taq (Quiagen, Suisse) et des amorces de MWG-BIOTECH GmbH (Allemagne). Des réactions de PCR ont été effectuées pour contrôler et détecter le gène *as-epicut1* dans les plages isolées de la librairie génomique Lambda EMBL3A. D'autres réactions de PCR ont été effectuées pour amplifier le gène *as-epicut1* à partir de l'ADN génomique. Dans ces réactions de PCR, des amorces (Tables 2a et 2b) avec les caractéristiques suivantes ont été utilisées:

1. Les séquences des amorces P1 et P2 se trouvent respectivement aux extrémités 5' (sens) et 3' (antisens) de la région codante d'*as-epicut1* dans les clones isolés de la librairie d'ADNc (voir chapitre I). La PCR du clone d'ADNc 31B1A, avec ces amorces, produit un fragment de 979

pb qui contient la région codante d'as-epicut1 (sans les 7 premiers nucléotides) et une courte séquence de 25 nucléotides de la région 3' non codante.

2. Les séquences des amorces P3 et P4 se trouvent aux extrémités 5' (sens) et 3' (antisens) de chaque région répétitive de la région codante d'as-epicut1 des clones d'ADNc (voir chapitre III). Ces amorces ont été choisies d'une région répétitive interne d'as-epicut1. Le produit de PCR du clone 31B1A, avec ces amorces, est formé d'un nombre variable de régions répétitives. Le plus court fragment est de 135 pb et le plus longue est de 894 pb.
3. Les amorces deb3.1.1rev et unicutf ont été choisies à partir des séquences des clones G1 et G2. La séquence de deb3.1.1rev se trouve à l'extrémité 5' (sens) des clones G1 et G2. L'amorce unicutf est complémentaire à l'extrémité 3' d'as-epicut1 dans les clones G1 et G2. Ces amorces servent à amplifier des fragments contenant le(s) gène(s) as-epicut1, y compris la région 5' non codante, directement à partir d'un extrait d'ADN génomique.

Table 2a Oligonucléotides sans modifications utilisés dans les PCR pour détecter la présence du gène as-epicut1 dans les plages isolées de la librairie d'ADNg. Les amorces T3 et T7 s'hybrident sur le plasmide pBs en flanquant les deux extrémités de l'insert.

Amorces	Séquences des oligonucléotides sans modifications	nb des nucléotides	Position sur la référence : le clone 31B1A	Sens/antisens
P1	5'-CGCTTTCGCGATTGCGTT -3'.	18	8-25	sens
P2	5'-GGCAGTACAGCAACTTCTA -3'.	19	966-984	antisens
P3	5'- AACGCTTACGGTGACGAACCCGT-3	23	666-688	sens
P4	5'-CGCTGGATTCCACTGCTGCT-3'	20	779-798	antisens
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'	17	-	sens
T7	5'-AATACGACTCACTATAG-3'	17	-	antisens

Table 2b Oligonucléotides sans modifications utilisés dans les PCR pour amplifier des fragments génomiques contenant as-epicut.

Amorces	Séquences des oligonucléotides sans modifications	nb des nucléotides	Site de fixation G1 / G2	Sens/antisens
deb3.1.1rev	5'-TACTCGACACTGAAATTTTCTC-3'	23	1-23 / 1-23	sens
unicutf	5'-CTACAACAATCAATAACCACT-3'	21	1646-1666 / 1952-1972	antisens

Extraction d'ADN des phages et d'ADN génomique.

Les extraits d'ADN phagiques et l'extrait d'ADN génomique des tissus intestinaux d'*A.suum*, ont été préparés avec un tampon d'extraction contenant: NaCl (100 mM), Tris-HCl (100 mM) à pH 8.5, EDTA (50 mM) à pH 7.4, 1% SDS, 1% β -mercaptoéthanol, et de la protéinase K (100 μ g/ml). L'échantillon d'extraction a été incubé à 65°C pendant 5 minutes pour l'ADN phagique et 30 minutes pour l'ADN génomique. L'ADN phagique et l'ADN génomique ont été extraits 1 fois avec du phénol / chloroforme et 1 fois avec du chloroforme, ensuite l'ADN a été précipité avec de l'éthanol et resuspendu dans du tampon TE (10 mM), pH 8.

Insertion d'un fragment génomique dans l'ADN phagique λ ZapII et encapsidation.

500 ng d'ADN du fragment à insérer ont été récupérés du gel d'agarose par excision, et l'ADN a été purifié avec un kit (Macherey-Nagel). Ce fragment a été utilisé dans une réaction d'insertion dans l'ADN phagique λ ZapII en présence de 1 μ l de l'ADN phagique à 1 μ g/ μ l, 1 μ l d'ATP à 10 mM et 2 μ l de ligase T4 à 1U/ μ l (Stratagene, Amsterdam). La réaction de ligation a été incubée une nuit à 14°C. Le produit d'insertion a été encapsidé dans une capsule protéique phagique (Packaging reaction avec le kit Gigapack III, Gold packaging extract ; Stratagene, Amsterdam). Après 90 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction d'encapsidation a été stoppée avec 500 μ l du tampon SM et vortexée en présence de 20 μ l de chloroforme.

Des *E.coli* XL1-Blue MRF' (DO, 0.5 ; 600) ont été infectées avec le produit de l'encapsidation, étalées sur des boîtes LB-ampicilline en présence de IPTG / Xgal et incubées à 37°C pendant une nuit. Les plages de couleur blanche, obtenues sur les boîtes de culture, indiquent la présence de zones de lyse bactérienne par le phage recombinant.

Excision in vivo des phages λ ZAPII en plasmides pBlue-script.

Les phages recombinants ont été amplifiés dans *E.coli* XL1-Blue MRF' et convertis en plasmides pBlue-script par une excision in vivo en présence du phage Exassist helper (Stratagene, Amsterdam). Les plasmides excisés ont été amplifiés dans *E.coli* SOLR

(Stratagene, Amsterdam) et les extraits d'ADN (mini- ou maxiprèp) ont été utilisés pour le séquençage.

Séquençage.

Les amorces modifiées à l'extrémité 5' avec IRD 800 (MWG-BIOTECH GmbH, Allemagne) utilisées pour le séquençage sont décrites dans la Table 3.

1) Les séquences des amorces M13 universel et M13 reverse marquées à IRD 800 se trouvent sur le plasmide pBs de deux côtés de l'insert. Ces amorces ont été utilisées pour le séquençage des extrémités des inserts génomiques des clones G1, G2 et G3.

2) Les amorces internes marquées à IRD 800 ont été utilisées pour séquencer les inserts des clones G1 et G2. Les amorces revprim1, uniprim1, revcutf et unicutf ont été choisies à partir des séquences internes des inserts des clones G1 et G2. L'utilisation des amorces uniprim1 et uniprim2 choisies seulement sur le clone G1 a permis le séquençage complet de ce clone. L'insert du clone G3 a été séquençé avec les mêmes amorces utilisées pour le séquençage du clone G2.

Table 3 Oligonucléotides marqués à l'IRD800 à l'extrémité 5' utilisés pour le séquençage des clones G1, G2 et G3.

Amorces	Séquences des oligonucléotides marqués à l'IRD800	nb des nucléotide:	Site de fixation G1 / G2	Sens/antisens
M13 universel	IRD800-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	17	sur le plasmide pBs	antisens
M13 reverse	IRD800-AACAGCTATGACCATG-3'	16	Sur le plasmide pBs	sens
revprim1	IRD800-AAGCGATGAAGCTGAATATG-3'	20	798-817 / 798-817	sens
uniprim1	IRD800-TGACACTGGCAGATAGCAGA-3'	20	2774-2793 / ---	antisens
uniprim2	IRD800-CCAGTTAATAACGCGAAGGAA-3'	21	1844-1864 / ---	antisens
revcutf	IRD800-CTAGTGGTTATTGATTGT-3'	18	1644-1661 / 1950-1967	sens
unicutf	IRD800-CTACAACAATCAATAACCACT-3'	21	1646-1666 / 1952-1972	antisens

La méthode de terminaison de la chaîne a été utilisée pour les réactions du séquençage avec le kit (Labstation Thermo Sequenase Labelled primer cycle sequencing with 7-deaza-dGTP; RPN 2437 ; Amersham, Suisse). L'appareil LI-COR 4200 (MWG-BIOTECH, AG) a été utilisé

pour la séparation des produits de réaction du séquençage. Les séquences d'ADN ont été analysées et comparées par alignement en utilisant le programme d'ordinateur Clustal X 1.64.

RESULTATS

*Criblage de la librairie génomique λ EMBL3 d'*A.suum*.*

Par hybridation avec les 3 sondes biotinylées D-biot, F-biot et P3-biot et à partir d'une boîte nommée A, infectée avec la librairie génomique d'*A.suum*, plusieurs plages ont été détectées. Parmi ces plages, certaines ont été reconnues seulement par une ou deux sondes. Par contre d'autres plages ont été détectées avec toutes les sondes utilisées (Table 4). Les plages isolées ont été soumises à trois cycles de purification avec la sonde P3-biot.

Table 4 Plages isolées de la boîte A infectée avec la librairie génomique d'*A.suum*, reconnues par les différentes sondes D-biot, P3-biot et F-biot.

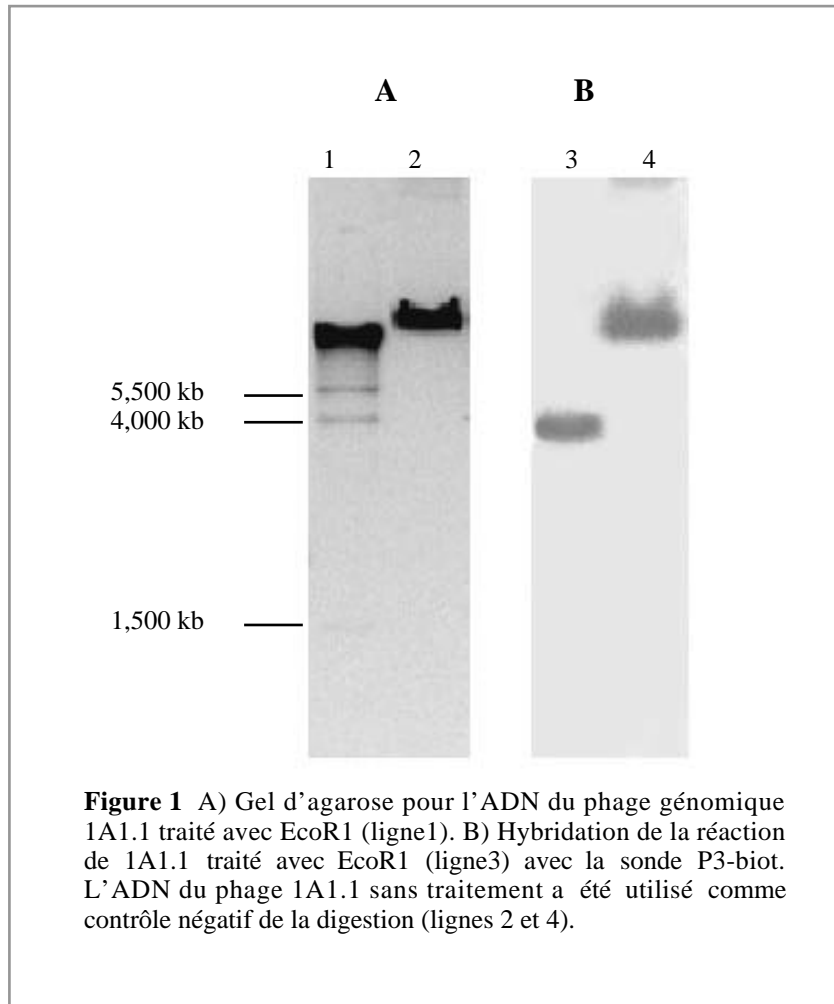
	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A
D-biot	-	+	-	-	+	+	-	+
P3-biot	+++	+	+	+	+	+	+	-
F-biot	+++	+	-	-	+	-	-	+

*Identification des fragments d'ADN de la librairie génomique contenant le gène *as-epicut1*.*

Les phages purifiés ont été soumis à une vérification par PCR avec les amorces (P1 et P2) et/ou (P3 et P4). Tous les produits de PCR des phages isolés n'ont pas donné des bandes claires (résultats non démontrés). Parmi les phages amplifiés dans *E.coli* XL1-Blue MRA, un seul phage 1A (renommé 1A.1.1 après la purification), reconnu par les deux sondes F-biot et P3-biot, a donné par hybridation un signal intense. Ce phage a été choisi pour une analyse détaillée.

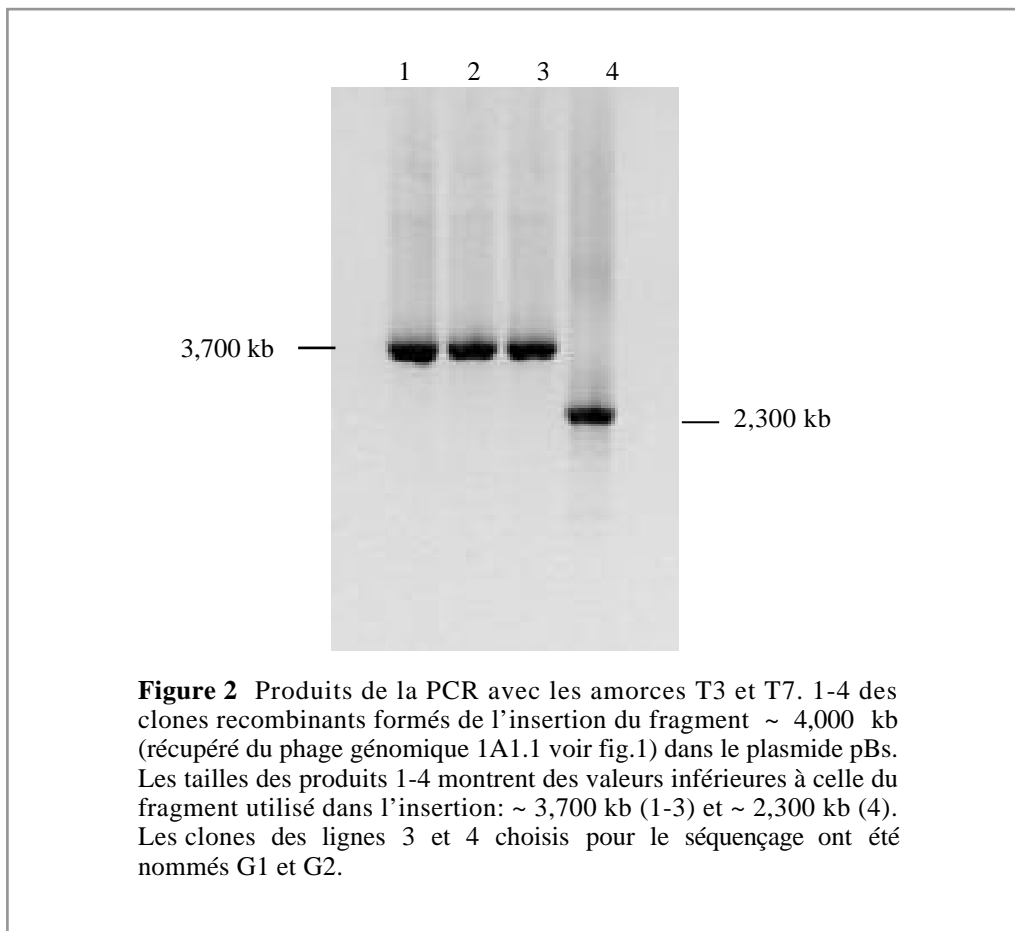
Le produit de la réaction de digestion du phage 1A1.1 avec EcoR1 montre sur un gel d'agarose 3 bandes d'environ 5,500, 4,000, et 1,500 kb (Figure 1A), dont la somme indique que l'insert correspond à 11,000 kb (valeur approximative). En utilisant la sonde P3-biot, l'hybridation de

la réaction du phage 1A1.1 digéré avec EcoR1, montre que le gène *as-epicut1* est localisé dans le fragment de 4,000 kb (Figure 1B).



La bande 4,000 kb a été excisée du gel, purifiée et insérée dans le phage ZapII-EcoR1. L'induction avec l'IPTG/Xgal montre que le rendement d'insertion du fragment 4000 pb dans le phage est d'environ 70 %. A partir d'une boîte de culture, le produit d'insertion (le phage ZapII avec le fragment génomique de 4,000 kb) a été transféré sur une membrane de nylon. L'hybridation de cette membrane en utilisant la sonde F-biot a révélé un nombre important des plages positives. Quatre plages positives ont été isolées, purifiées et excisées en plasmides pBlue-script. Les plasmides de 3 clones excisés montrent un insert d'environ 3600 et le quatrième clone un insert d'environ 2000 pb (Figure 2). Bien que les clones isolés montrent

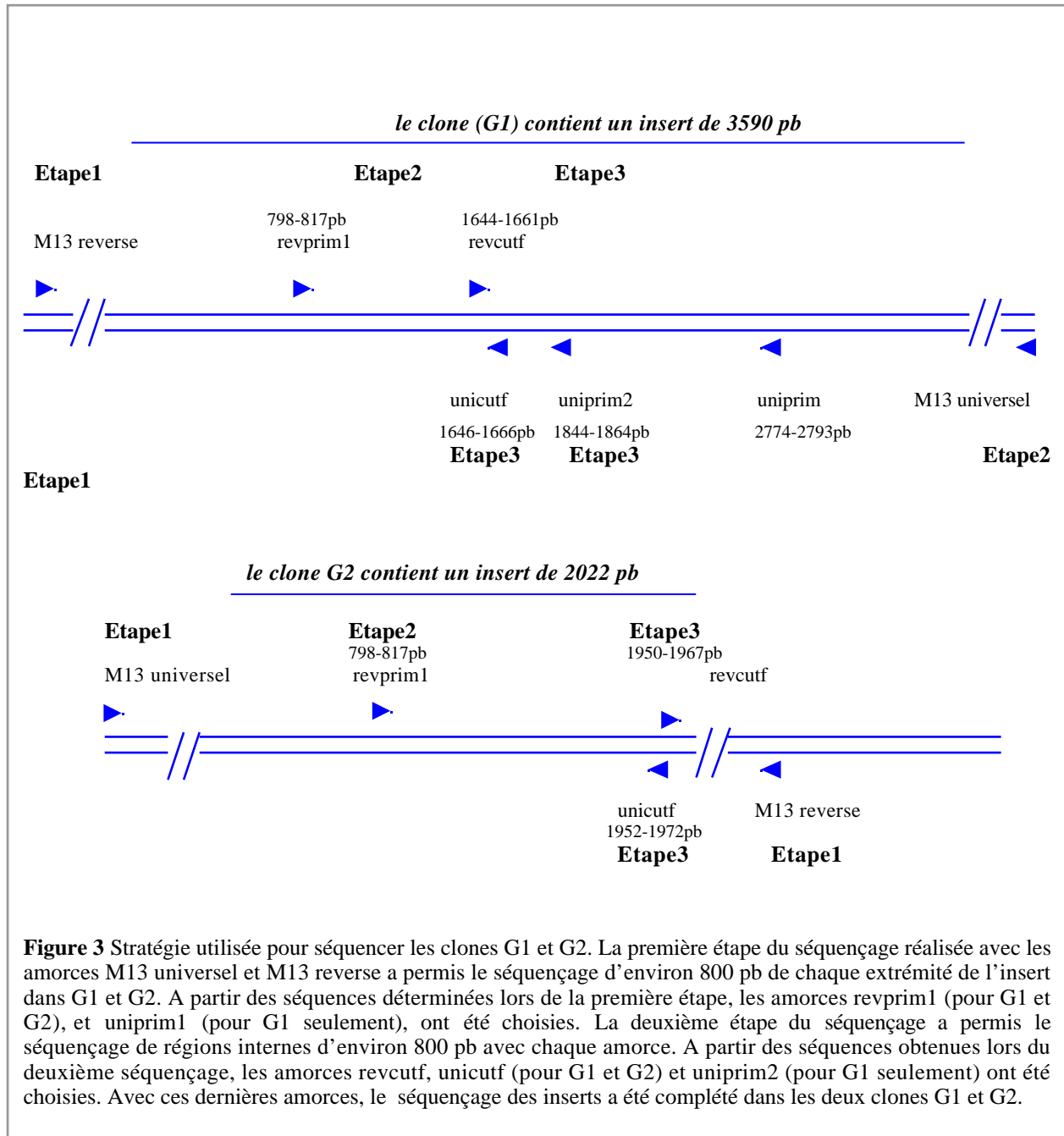
des inserts avec des tailles inférieures à celle du fragment inséré au départ (4000 pb), deux clones ont été choisis pour continuer l'analyse. Un clone, parmi les trois premiers clones de 3600 pb, nommé G1, ainsi que le quatrième clone de 2000 pb, nommé G2, ont été séquencés.



L'analyse des fragments contenant as-epicut1 issus de la librairie génomique.

Le séquençage des clones recombinants G1 et G2 a été réalisé avec des amorces marquées à IRD800 aux extrémités 5'. Les réactions de séquençage ont été suivies étape par étape à partir des deux extrémités des inserts avec des amorces appartenant aux plasmides pBs, puis avec des amorces choisies de régions internes des inserts (Figure 3). La première étape du séquençage, réalisée avec les amorces M13 universel et M13 reverse, a permis le séquençage de 800 pb de chaque extrémité de l'insert dans les clones G1 et G2. A partir des séquences déterminées dans cette première étape, les amorces revprim1 et uniprim1 ont été choisies. La deuxième étape du séquençage, réalisée avec revprim1 (pour le séquençage des clones G1 et

G2) et uniprim1 (pour le séquençage de G1 seulement), a permis le séquençage d'une région interne de 800 pb avec chaque amorce. Les amorces revcutf et unicutf ont finalement été choisies pour la dernière étape. Comme l'amorce uniprim1, l'oligonucléotide uniprim2 a été choisi uniquement sur le clone G1 parce qu'il n'a pas de site de fixation sur le clone G2. Avec ces trois dernières amorces, le séquençage de deux inserts a été complété et les diverses séquences ont été assemblées.



Clone G1 (Figure 4): Les séquences assemblées montrent que l'insert dans le clone G1 est formé de 3590 pb avec une séquence codante d'as-epicut1 dans la région de 707-1654 pb. La partie de la séquence codante d'as-epicut1 qui se trouve dans la région 897-1654 pb se révèle identique aux régions répétitives des clones d'ADNc. Cette partie de la région codante est prolongée au niveau de l'extrémité 5' par une région non répétitive de 191 nucléotides (707-896 pb). Cette région commence avec le codon méthionine ATG dans le site 707 pb. Ce qui est remarquable c'est que la région 5' non répétitive se termine par un accepteur d'épissage "splicing acceptor" TTTTCAG dans le site 890-896 pb.

Ainsi, la région codante d'as-epicut1 dans le clone génomique G1 est formée de 948 nucléotides avec un codon Met dans le site 707 et un codon stop dans le site 1655.

Par traduction en acides aminés, l'insert de ce clone montre un seul exon de 316 aa d'une masse moléculaire de 33 kD. La séquence des acides aminés d'AS-EPICUT1 commence avec la région non répétitive de 65 aa suivie par 5 régions répétitives d'environ 51 aa chacune. Ces 5 régions représentent la même structure qu'AS-EPICUT1 dans les clones d'ADNc analysés qui contiennent entre 6 et 7 régions répétitives. Le reste de l'insert du clone G1 (hors de la région as-epicut1) n'a pas révélé d'homologies dans les banques des données.

La séquence en acides aminés d'as-epicut1 dans le clone G1 est riche en alanine (23 %), proline (14 %), acide glutamique (9.5 %) et en tyrosine (6 %). Chaque région répétitive contient 3 tyrosines comme le cas dans les clones d'ADNc (voir chapitre III), alors que la région NH2 non répétitive, formée de 65 aa, contient 5 tyrosines.

Si les messagers passent par des modifications post-traductionnelles avec un trans-épissage dans le site 890-896 pb, la protéine AS-EPICUT1 déduite des messagers trans-épissés serait formée de 256 aa avec une masse moléculaire d'environ 25 kD. Si la traduction des messagers trans-épissés commence par la première Met dans le site 1133 pb, la protéine prédite serait formée de 174 aa avec une masse moléculaire d'environ 17 kD (Table 5).

Table 5 Prédiction de la masse moléculaire d'AS-EPICUT1 à partir des fragments génomiques. Nb et MM sont le nombre des acides aminés et la masse moléculaire de la protéine prédite, respectivement. nb1 et MM1 du messenger entier non trans-épissé; nb2 et MM2 du messenger trans-épissé; nb3 et MM3 du messenger trans-épissé où la traduction commence à partir de la première méthionine interne.

clone	nb1 aa	MM1 en kD	nb2 aa	MM2 en kD	nb3 aa	MM3 en kD
G1	316	33	256	25	147	17
G2	419	43	353	35	276	27
G3	470	48.4	404	40	327	33

Clone G2 (Figure 5): ce clone contient un insert de 2022 nucléotides. L'insert montre une séquence du côté 5' de 1553 pb, dans la région 1-1553 pb, identique à celle du clone G1. La région de 1858-2022 pb formée de 164 pb est identique à la région 1554-1717 pb du clone G1. La région intermédiaire du clone G2 de 1554-1857 pb, formée de 303 pb représente certaines variations en comparaison avec l'as-epicut1 du clone G1.

Il est très important de noter que l'insert du clone G2 peut coder pour deux protéines différentes dans les deux sens et avec un décalage de la phase de lecture:

1) La première protéine est l'AS-EPICUT1 (Figure 5). La séquence codant pour AS-EPICUT1 du clone G2 est formée de 1254 pb et est située dans la région 707-1960. Cette séquence possède les mêmes caractéristiques que celle du clone G1, mais elle contient 7 régions répétitives au lieu de 5. La protéine prédite de cette région est formée de 419 aa avec une masse moléculaire de 43 kD. La séquence d'acides aminés commence avec une région non répétitive de 65 aa suivie par 7 régions répétitives, et chaque région répétitive est formée d'environ 51 acides aminés. Les pourcentages d'acides aminés d'AS-EPICUT1 dans les clones G1 et G2 sont identiques (alanine 24%, proline 14.6%, acide glutamique 9.5% et tyrosine 6%).

Dans le cas des messagers trans-épissés, l'AS-EPICUT1 du clone G2 serait formée de 353 aa avec une masse moléculaire autour de 35 kD. Si la traduction des messagers trans-épissés

commence par la première Met dans le site 1133 pb, la protéine prédite serait formée de 276 aa avec une masse moléculaire de 27 kD (Table 5).

2) La deuxième protéine potentielle est codée par la région 893-2008 pb. Le cadre de lecture des messagers responsables de cette protéine est différent, car antiparallèle à celui d'as-epicut1. Le codon d'initiation se trouve dans le site 15 pb équivalent au site 2008 dans le sens parallèle et le codon de terminaison se trouve dans le site 1128 équivalent au site 893 dans le sens parallèle (Figure 6). Nous n'avons pas trouvé de séquences similaires dans les banques des données. Cette protéine est formée de 371 aa avec une masse moléculaire de 43.380 kD. La structure primaire de la séquence peptidique comprend 6 régions répétitives. La composition en acides aminés est différente de celle d'AS-EPICUT1, elle est riche en arginine (13.2%), cystéine (11.6%), serine (11.3%), et phénylalanine (10%) avec un pourcentage de tyrosine de (2.2 %).

Les inserts des clones G1 et G2 qui sont les produits du même fragment de 4000 pb du départ (sousclones de la plaque 1A.1.1) représentent des tailles différentes. D'après la comparaison de deux inserts, on constate que la région qui manque dans l'un se trouve dans l'autre. Il est possible que pendant le traitement enzymatique et les étapes suivantes, certaines régions du fragment de 4000 pb aient été éliminées (Figure 7). La région B de 305 pb pourrait avoir été éliminée du clone G1 ce qui rend la taille de l'insert à 3590 pb. La région 3' non codante, de 1874 pb, pourrait avoir été éliminée du clone G2 et ce qui rend la taille de l'insert à 2022 pb (voir Figure 7).

clone G1

1 - T
2 - ACTCGACTGAAATTTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATTTTTTCATGGATTAGTT - 61
62 - CTTAGGTTAGGTTAGGATAATGGATATGGATCAAAACAATTTCCCGTAAGGCAACATTA - 121
122 - ATTAAAGTCTTAAACTATTTGTATAAATTTGTTCAATCAACATAAATTCATATTTGAG - 181
182 - GTTCGAGAACCAATCATTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTTG - 241
242 - TTTTTATTAGTTTTTTTTTTCATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCTGTTATTTTCAG - 301
302 - CATCTAAAATATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAATACTCTTCTATTAAATTTACAA - 361
362 - ATTCATAGGTGTAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTATGATTTTCTTATCAACT - 421
422 - TCATATCTTCGATGCTTTTTTTTTGTGGGAAAGAAGCTATTTGACGCTTACCGAAAAAAA - 481
482 - TTTTTGATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCCGCTAAACTTTAGAGTGGATTA - 541
542 - AAAGATGCGAACAATTTATGAGCTCAATTTGTCAGTACAAAAGAAATTTCTTATTAAAGA - 601
602 - CCGACCACCTATGATGCTTGCACCTGCGAGCGGCTTTTAGCATATTGCAGTTAGTTTG - 661
662 - CATACCGCTTCTAAAGCAAACTGCAATCTCTGAGAAGAAATTCATGTTGTTATGCAAGG - 721
M C Y A R
722 - TTTTCAGTTACATCTAAGTAAGTTAGGAGCTGCTCATGAAAGAACACATTTCAAAGCCGAGG - 781
- F Q L H L S K L G A A H E R T H S K P R
782 - AGATTCTATCGGATTAAGCGATGAAGCTGAATATGTATAATAGTTATTTCCCTAAAAAA - 841
- R F Y R I K A M K L N M Y N S Y F P K K
842 - TACCACCAACTTCATATATCTCTTCTAGTTGCGATCGATTTCCCTTCCATTTTCAGTTTTC - 901
- Y H Q L H I S F L V A I D F L P F S V F
902 - AAGAGGAACAATGCGTATGTTGACGAACCCGTTGCTCCCGCTGAAGGGTACCGAGCGCCA - 961
- K R N N A Y G D E P V A P A E G Y R A P
962 - CGACCGGAACAGCTCCTGTAGAACAGGCTCCGGCCCAATTTGAACAAGCGGCAGAAAGCT - 1021
- R P E P A P V E Q A P A P I E Q A A E A
1022 - CCAGCAGCAGTAGAATCTAGCGGCTATCGAAGAAGAGGAACAACCGTACGGTGATGAG - 1081
- P A A V E S S G Y R K K R N N A Y G D E
1082 - CCTATCGCTCCCGCTGCGAGGTTGCGAGAACCAGCTCCCGCCCGCTTGGATGGCTCCC - 1141
- P I A P A A G V A E P A P A P V E M A P
1142 - GCGCCAGTCAACAAGCTGCTGAAGCACCTGCACCTGTAGAATCCAGCGGTACCGCAAA - 1201
- A P V E Q A A E A P A P V E S S G Y R K
1202 - AAGAGGAATAACGCGTACGCGACGAACCCGTTGCCCCAGCTGGAGGATACGCCGCGCA - 1261
- K R N N A Y G D E P V A P A G G Y A A A
1262 - GAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGCAACCAATTTGAGCAAGCTGCGAAGCT - 1321
- E P A P A P V E Q A P A P I E Q A A E A
1322 - CCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACCGCTACGGTGACGAA - 1381
- P A A V E S S G Y R K K R N N A Y G D E
1382 - CCCGTGGCTCCATCTGTTGGATACGACGCGCACAGCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAG - 1441
- P V A P S G G Y A A A Q P A P A P V E Q
1442 - GCGCCGCAACCAATTTGAGCAAGCTGCGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTAC - 1501
- A P A P I E Q A A E A P A A V E S S G Y
1502 - CGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTTGCCCCATCTGTTGGATACGCA - 1561
- R K K R N N A Y G D E P V A P S G Y A
1562 - GCGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCCCAATTTGAGCAAGCTGCA - 1621
- A A Q P A P A P V E Q A P A P I E Q A A
1622 - GAAGCTCCAGCAGCAGTAGAATCTAGTTGTTATGATTTGTTGAGAAGTTGCTGTACTGC - 1681
- E A P A A V E S S G Y *
1682 - CAGGATGTCGACGATCCTCATGTTCCATATGCAATTTTTTTTTCTGCTTAAACGTATG - 1741
1742 - AGAAATGTGCGTAAAATCACATCTCATGGGTTGCAATTTGGAACAGATTTGATACTCCTT - 1801
1802 - TTTTCATGGCCTTAAATGAAACAATGTTTTCTATTATATACGTTCTTTCGCGTTATTAAAC - 1861
1862 - TGGATTTTCTTCTGAACAGCTTGGCTTATTAAAGGAGTCAATTAATGACGATAGTGAGTAC - 1921
1922 - CTAATTTTGCAAAATCTATACCTCTCAAGAGAAAATATGACCAAGTGCACGCAAAATAC - 1981
1982 - TTACAATTTTTCTATAGATCATATGATACAAATATATGTGAGATCACTGCCTCTAATTTT - 2041
2042 - GTCGAAAAATGAATAAATGTTTTCGAAAATGTGGAGAAAAATGTGCTAGAAAATTTTCTG - 2101
2102 - TCGATACGAAAAGACCCAGCATATGTGCCAGATATACAGAAAAAAGAAAAATATACC - 2161
2162 - TAAGTAGTATTCTTCTATCGCACAAATTAATTAAGCTGTGTTTCGAGGTACGGGAATTTTCT - 2221
2222 - TGAATGTTGCTTTGGTGACATGAAAAGGAAGCAGAAATTAAGTGTCTTTGTTTTCTGTCGC - 2281
2282 - AAATAAATACTGTATGTGGAAAGCCGATGAGGTGAGTTTTCGTCGAGAAAATCAACGAT - 2341
2342 - TCCATCGACTATTGTAACATTTACCATATCGTTATTGAGTTAAAATCGCCGTTGACGCT - 2401
2402 - GCAAAATTTTATGTAATAACTCTACTCTCACAACTTTTTATGCAACGATTTTATGTAAGTT - 2461
2462 - TCTGTACGATGATCGCCATTACTCGATTTATTCTGATCTAACGTTGTCTATATAGTCAT - 2521
2522 - GAGAAGAAAATCGCTTATTTAGTCACGAAAAAACTCTGTCAGGAAGGAACCATCATAGA - 2581
2582 - ATGCACTAGCGAAGGAAGACTTCGAGATCATGAAGCCACTGGAAAACCATGCCCAAAGAG - 2641
2642 - TTGCCATGATATCAGGTTGTGCTTCTCGTTGAAAAGGTGCCAACAGAAAATGGCATGTTA - 2701
2702 - AGAAGATTGCTCTTATTATTGCAACGACCTGACCTCCTGCACAATGTCTCTCCTAGGAAA - 2761
2762 - AAAAATCGTTTTCTGCTATCTGCCAGTGTCAAATAGAACCAGGTGGCACAAGGACATGCA - 2821
2822 - AATGTTTTTTTTTCCITTTGAAGGTTTATTACTCTTTTCAAATTAATGGATCGGTATTCT - 2881
2882 - GGTCTGTGAGATCATCTGTTTTATAGACTATCAGCCAATTCGGTCTTCTCAGGCTAAA - 2941
2942 - AGCAGTACCCTGATGGCCACTCGGATGCTCTCATATATAGAACAGGTGCGATCCCAATAC - 3001
3002 - AGTGTCTTTTTTTCAGAGCAAGTTTGGAGAGGCGCAAAAGAGTGAATAGTTGAAATAAAC - 3061
3062 - TTCATATGGTATCTCTGGATAGTTAAAACGCTTCCAAGAGATTTTTCCATTCACATTCCT - 3121
3122 - AATCATGCAACCTTTTCCAAAAGTAGCGCTTCCATCACACCAATCTATGGCAGACTTAA - 3181
3182 - GAATAGGAGGGTACAGCTCATGGACAATGCTCAATGAGTAAACATATGCAAAATAAATTA - 3241
3242 - CCCGTAAAGTCACTCTAATTTACGCACAATCTTATAAATTAACCATAAATAACCGTGT - 3301
3302 - TGCAAAATCCCTCAGCAATAAATTTGTTACATGTGGGCTTCTAATTAATTTTTTCAAAAT - 3361
3362 - GCACTACTTTATGGATAACACACTGAAGTCGCCTTACAAGCGATGACCTATGCAATCGTGG - 3421
3422 - TGTTTTATTATCGAAGCTTGTGTCAGCATCAGAGGCTATTCCAATTTGGCTGCTATC - 3481
3482 - AGTTTCAGCGGCTGGATGCAAAATAGCGTATGTTGAAAAGGCTATTTTCATGCAAGTACC - 3541
3542 - TCTGCAGGTTGAGTTTTGTTGTTGAGATAGAAGGCGAAAAAACGATG - 3590

Figure 4 Le clone G1 contient un insert de 3590 pb. Le premier codon d'initiation d'as-epicut1 est situé dans le site 707 pb et le codon de terminaison est dans le site 1655 pb. Les sites soulignés représentent les sites qui peuvent être accepteurs d'épissage avec une probabilité d'épissage plus élevée que les autres sites (surtout site 890-896 pb qui représente le consensus d'épissage le plus conservé chez *C.elegans*).

clone G2

1 - T
2 - ACTCGACTGAAATTTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATATTTTTTCATGGATTAGTT - 61
62 - CTTAGGTTAGGGTTAGGATAATGGATATGGATCAAAATTTTTCCCGTAAGGCAACATTA - 121
122 - ATTAAGTTCTTAACTATTTGTATAAATTTGTTTCATCAACATAAATCAATAATTTGAG - 181
182 - GTTCGAGAACCAATCATTTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTTG - 241
242 - TTTTTATTAGTTTTTTTTTTCATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCCTGTTATTTTCAG - 301
302 - CATCTAAAAATAATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAAATACTTCTATTAAATTTACAA - 361
362 - ATTGATAGGTGTAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTAGTATTTCTTATCAACT - 421
422 - TCATATCTTCGATGCTTTTTTTTGTGGAAAGAAGCTATTGTACGTTACCGAAAAAAA - 481
482 - TTTTGTATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCCGCTAAACTTTAGAGTGGATTA - 541
542 - AAAGATGCGAACAATTTTATGAGCTCAATTTGTCAGTACAAAAGAATTTCTTATTAAGA - 601
602 - CCGACCACCTATGATGCTTGCACCTCTGCAGCGGTCTTTTAGCATATTGCAGTTTAGTTTG - 661
662 - CATACCGCTTCTAAAGCAAACTGCAATCTCTGAGAAGAAATTCATGTGTTATGCAAGG - 721
M C Y A R
722 - TTTTCAGTTACATCTAAGTAAGTTAGGAGCTGCTCATGAAAGAACACATTCAAAGCCGAGG - 781
- F Q L H L S K L G A A H E R T H S K P R
782 - AGATTCTATCGGATTAAGCGATGAAGCTGAATATGTATAATAGTTATTTCCCTAAAAAA - 841
- R F Y R I K A M K L N M Y N S Y F P K K
842 - TACCACCAACTTCATATATCCTTCTAGTTGCGATCGATTTCCCTTCCATTTTCAGTTTTC - 901
- Y H Q L H I S F L V A I D F L P F S V F
902 - AAGAGGAACAATGCGTATGGTGACGAACCCGTTGGCTCCCGCTGAAGGTTACCGAGCGCCA - 961
- K R N N A Y G D E P V A P A E G Y R A P
962 - CGACCGAACCAGCTCCTGTAGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAACAAGCGGCAGAAGCT - 1021
- R P E P A P V E Q A P A P I E Q A A E A
1022 - CCAGCAGCAGTAGAATCTAGCGGCTATCGCAAGAAGAGGAACAACCGCTACGGTATGAG - 1081
- P A A V E S S G Y R K K R N N A Y G D E
1082 - CCTATCGCTCCCGCTGCGAGGTTGCGAACCAGCTCCCGCCCCGTTGAGATGGCTCCC - 1141
- P I A P A A G V A E P A P A P V E M A P
1142 - GCGCCAGTCAACAAGCTGCTGAAGCACCTGCACCTGTAGAATCCAGCGGCTACCGCAAA - 1201
- A P V E Q A A E A P A P V E S S G Y R K
1202 - AAGAGGAATAACCGGTACCGCGACGAACCCGTTGGCCCGAGCTGGAGGATACGCGCGGCA - 1261
- K R N N A Y G D E P V A P A G G Y A A A
1262 - GAACCGGACCCGGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCATTGAGCAAGCTGCAGAAGCT - 1321
- E P A P A P V E Q A P A P I E Q A A E A
1322 - CCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAGAGGAATAACGCCTACGGTGACGAA - 1381
- P A A V E S S G Y R K K R N N A Y G D E
1382 - CCCGTGGTCCATCTGGTGGATACCGCAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAG - 1441
- P V A P S G G Y A A A Q P A P A P V E Q
1442 - GCGCCGGCACCATTGAGCAAGCTGCGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTAC - 1501
- A P A P I E Q A A E A P A A V E S S G Y
1502 - CGCAAAAAGAGGAATAACCGGTACGGTGACGAACCCGTTGGCCCATCTGGTGGATACGCA - 1561
- R K K R N N A Y G D E P V A P S G G Y A
1562 - GCGGCACAGCCGGCACCACTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCACCAATTGAACAAGCTGCA - 1621
- A A Q P A P A P V E Q A P A P I E Q A A
1622 - GAAGCACCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACCGGTACGGC - 1681
- E A P A A V E S S G Y R K K R N N A Y G
1682 - GACGAACCCGTTGGCCAGCTGGAGGATACGAGCGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTGA - 1741
- D E P V A P A G G Y A A A Q P A P A P V
1742 - GAACAGGCGCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCGGCAGCAGTGAATCCAGC - 1801
- E Q A P A P I E Q A A E A P A A V E S S
1802 - GGCTACCGCAGAAAGAGGAATAACCGGTACGGTGACGAACCCGTTGGCTCCATCTGGGGGA - 1861
- G Y R R K R N N A Y G D E P V A P S G G
1862 - TACGACGCGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAA - 1921
- Y A A A Q P A P A P V E Q A P A P I E Q
1922 - GCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCTAGTGGTTAT**TGAT**TGTTGTAGAAGTTGCTG - 1981
- A A E A P A A V E S S G Y *
1982 - TACTGCCAGGATGTCAGCATCTCATGTTCCATAATGCAA - 2022

Figure 5 Le clone G2 contient un insert de 2022 pb. La région codante d'as-epicut1 est située dans la région 707-1960 pb avec un codon d'initiation dans le site 707 pb et un codon de terminaison dans le site 1961 pb. le site 890-896 pb représente le consensus de l'accepteur d'épissage le plus conservé chez *C.elegans*.

```

1 - TT
3 - GCATTATGGAAACATGAGGATCGTCGACATCCTGGCAGTACAGCAACTTCTACAACAATCA - 62
      M R I V D I L A V Q Q L L Q Q S
63 - ATAACCACTAGATTCTACTGCTGCTGGAGCTTCTGCAGCTTGCTCAATTGGTGC CGGAGC - 122
      I T T R F Y C C W S F C S L L N W C R S
123 - CTGTCCACAGGACCGGTGCGCGTTGTGCGCTGCGTATCCCCAGATGGAGCCACGGG - 182
      C R C V S S S W G H G F V A V R V I P L
363 - TTTGCGGTAGCCGCTGGATTCCACTGCTGCTGGTGTCTCTGCAGCTTGTTC AATTGGTGC - 422
      F A V A A G F H C C W C F C S L F N W C
423 - CGGCGCTGTTCTACAGGAGCTGGTGC CGGCTGTGCGCTGCATCCACCAGATGGGGC - 482
      R R L F Y R S W C R L C R C V S T R W G
483 - CACGGTTCGTACCGTACCGCTTATTCTCTTTTGGCGTAGCCGCTGGATTCCACTGC - 542
      C R C V S S S W G H G F V A V R V I P L
363 - TTTGCGGTAGCCGCTGGATTCCACTGCTGCTGGTGTCTCTGCAGCTTGTTC AATTGGTGC - 422
      F A V A A G F H C C W C F C S L F N W C
423 - CGGCGCTGTTCTACAGGAGCTGGTGC CGGCTGTGCGCTGCATCCACCAGATGGGGC - 482
      R R L F Y R S W C R L C R C V S T R W G
483 - CACGGTTCGTACCGTACCGCTTATTCTCTTTTGGCGTAGCCGCTGGATTCCACTGC - 542
      H G F V T V R V I P L F A V A A G F H C
543 - TGCTGGAGCTTCTGCAGCTTGCTCAATTGGTGC CGGCGCTGTTCTACAGGAGCTGGTGC - 602
      C W S F C S L L N W C R R L F Y R S W C
603 - AGGCTGTGCGCTGCATCCACCAGATGGAGCCACGGGTTCTGCACCGTAGGCCTTATT - 662
      R L C R C V S T R W S H G F V T V G V I
663 - CCTCTTTTGGCGTAGCCGCTGGATTCCACTGCTGCTGGAGCTTCTGCAGCTTGTTC AAT - 722
      P L F A V A A G F H C C W S F C S L L N
723 - TGGTGC CGGCGCTGTTCTACAGGAGCCGCTGCGGTTCTGCCCGCGCTATCCTCCAGC - 782
      W C R R L F Y R S R C R F C R G V S S S
783 - TGGGCCACGGGTTCTGCGCGTACCGCTTATTCTCTTTTGGCGTAGCCGCTGGATT - 842
      W G H G F V A V R V I P L F A V A A G F
843 - TACAGGTG CAGGTGCTTACAGCAGCTTGTTCGACTGGCGCGGGAGCCATCTCAACGGGGC - 902
      Y R C R C F S S L F D W R G S H L N G G
903 - GGGAGCTGGTTCGCAACTCCTGCAGCGGGAGCGATAGGCTCATCACCGTACGCGTTGTT - 962
      G S W F C N S C S G S D R L I T V R V V
963 - CCTCTTCTGCGATAGCCGCTAGATTCTACTGCTGCTGGAGCTTCTGCCGCTTGTTC AAT - 1022
      P L L A I A A R F Y C C W S F C R L F N
1023 - TGGTGC CGGAGCCTGTTCTACAGGAGCTGGTTCGGTTCGGTGCCTGCTACCCCTCAGC - 1082
      W C R S L F Y R S W F R S W R S V P F S
1083 - GGGAGCCACGGGTTCTGCACCATACGCATTGTTCTCTTGA AAACTGAAAATGGAAGGAA - 1142
      G S H G F V T I R I V P L E N *
1143 - ATCGATCGCAACTAGAAAGGATATATGAAGTTGGTGGTATTTTTTAGGGAAATAACTATT - 1202
1203 - ATACATATTCAGCTTCATCGCTTTAATCCGATAGAATCTCCTCGGCTTTGAATGTGTTCT - 1262
1263 - TTCATGAGCAGCTCCTAACTTACTTAGATGTAACCTGAAACCTTGCAATAACACATGAATTT - 1322
1323 - CTTCTCAGAGATTGCAGTTTTGCTTTAGAAGCGGTATGCAAACTAACTGCAATATGCT - 1382
1383 - AAAAGACCGCTGCAGAGTCAAGCATCATAGGTGGTGGTCTTAAATAGAAAATCTTTTT - 1442
1443 - GTACTGACAAAATTGAGCTCATAAAATGTTGCGATCTTTTAACTCCACTCTAAAGTTTAGG - 1502
1503 - CGAACTCTCTCATATTTGCTGACGTATATCCATCAAAAATTTTTTTCGGTAAGACGTACA - 1562
1563 - ATAGCTTCTTTCCACAAAAAAAAGCATCGAAGATATGAAGTTGAT AAGAAATACTAAAA - 1622
1623 - ATGTCAAAAACAAAACATGAAATATTACACCTATGCAATTTGTA AAAATTAATAGAAGAGT - 1682
1683 - ATTTTCTCCTGAAACAGTGAACATATTTTTAGATGCTGAAATAACAGGACCGATAT - 1742
1743 - AACGTAGTAAGAGTGCATGAAAAAAAATAATAAAACAACCGTTTAGTTGAAGCGTA - 1802
1803 - TCAAAGAGTCAAATGAGAACAATGATTGGTTCGAACTCAAATTTATGAATTTATGT - 1862
1863 - TTGATGAACAATTTATACAAATAGTTTAAAGAACTTAAATTAATGTTGCCCTACGGGAAA - 1922
1923 - TTGTTGATCCATATCCATTATCCTAACCCTAACCTAAGAACTAATCCATGAAAAATATT - 1982
1983 - GGATACGCTAGCCGCTCGAGAAAAATTTAGTGTGAGTA - 2022

```

Figure 6 Démonstration dans le clone G2 de la protéine inconnue, encodée dans le sens antiparallèle, avec un cadre de lecture différent de celui d'AS-EPICUT1. La position 1 est équivalente à la position 2022 pb dans le sens parallèle. Le codon d'initiation se trouve dans le site 15 équivalent au site 2008 dans le sens parallèle et le codon de terminaison se trouve dans le site 1128 équivalent au site 893 dans le sens parallèle.

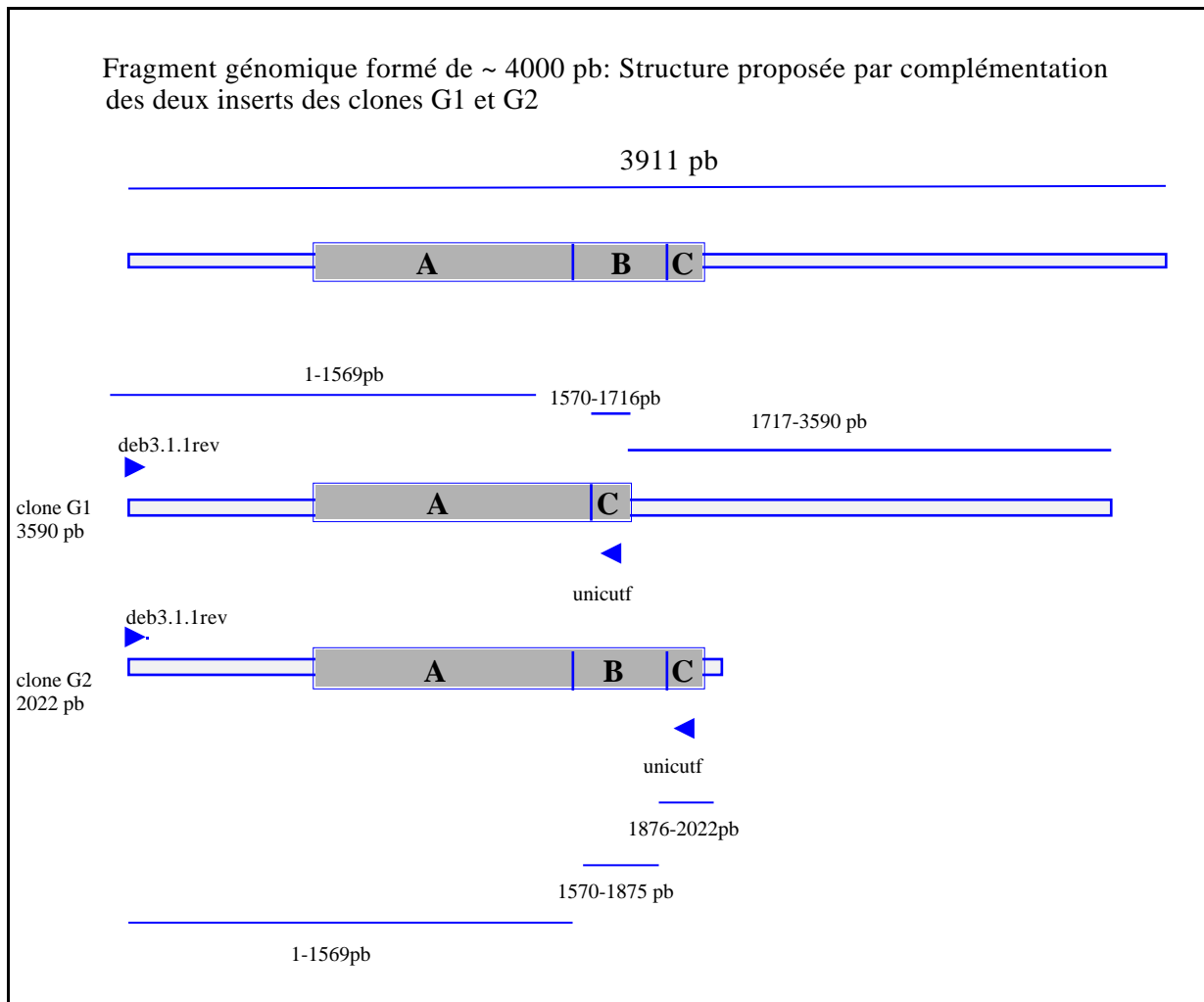


Figure 7 Comparaison schématisée des inserts des clones G1 et G2. Les clones G1 et G2 sont des fragments de l'ADN de la plage 1A.1.1. Cette figure démontre la possibilité de la formation des clones G1 et G2 à partir du même fragment d'ADN génomique. L'élimination du fragment B conduit à la formation de l'insert du clone G1, et l'élimination du fragment 3' conduit à la formation de l'insert du clone G2. Les segments A, B, et C sont des séquences codantes d'*as-epicut1*. Deb3.1.1.rev et unicutf sont des oligonucléotides utilisés dans les réactions PCR pour isoler le gène *as-epicut1* à partir de l'ADN génomique. Les positions de ces amorces sont indiquées par des petites flèches sur les inserts de deux clones.

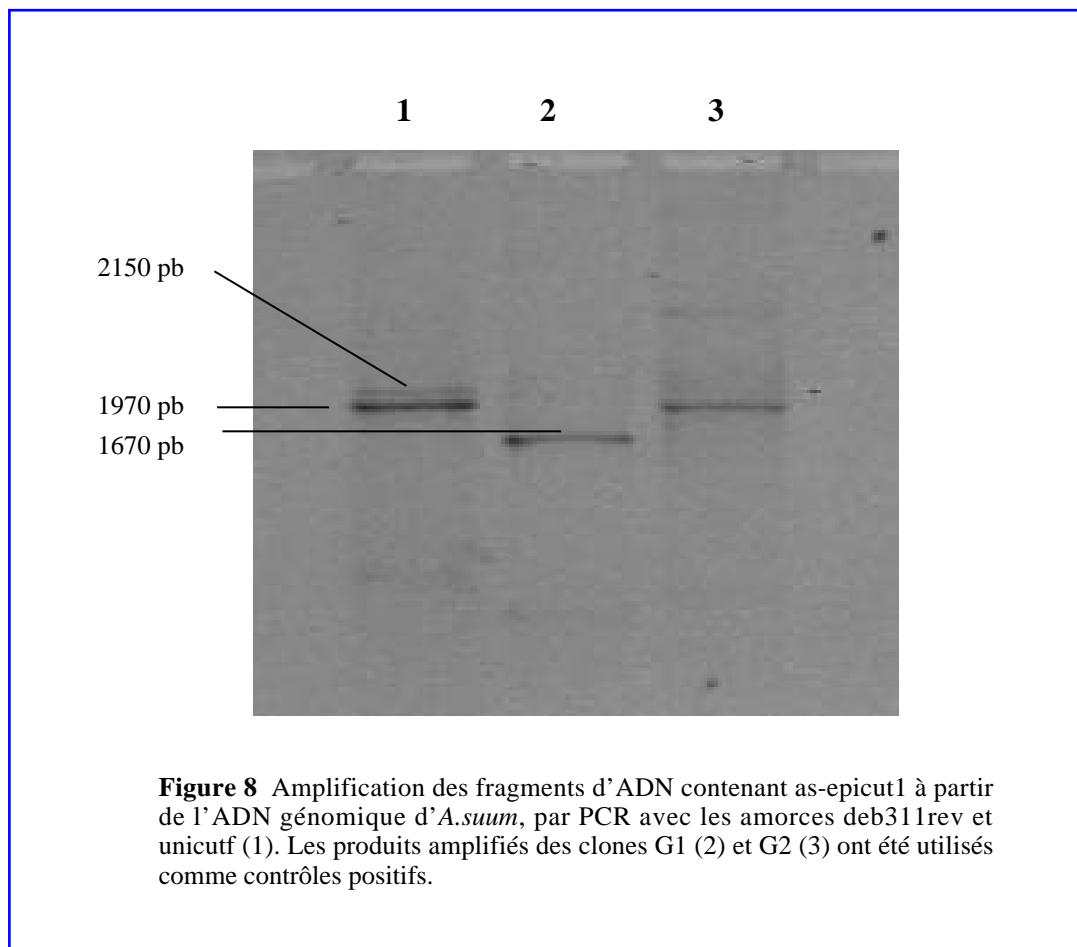
*L'identification de la structure d'*as-epicut1* sur le génome.*

Pour déterminer la longueur exacte de la région codante d'*as-epicut1* sur l'ADN génomique, et pour identifier la structure du gène dans le génome, une étude a été réalisée sur un extrait d'ADN génomique d'*A.suum* au stade adulte.

Les amorces deb3.1.1.rev et unicutf (Table 2b; voir matériel et méthodes) permettent, par PCR, l'amplification d'un fragment génomique contenant la région codante entière d'*as-epicut1* y

compris la séquence non codante de l'extrémité 5' (Figure 7). Le produit d'amplification de l'ADN génomique a montré sur un gel d'agarose deux bandes bien visibles d'environ 2150 et 1970 pb (Figure 8, ligne 1). Une troisième bande très faible d'environ 1350 pb qui n'est visible sur le gel que difficilement (n'est pas visible sur la figure) est aussi présente.

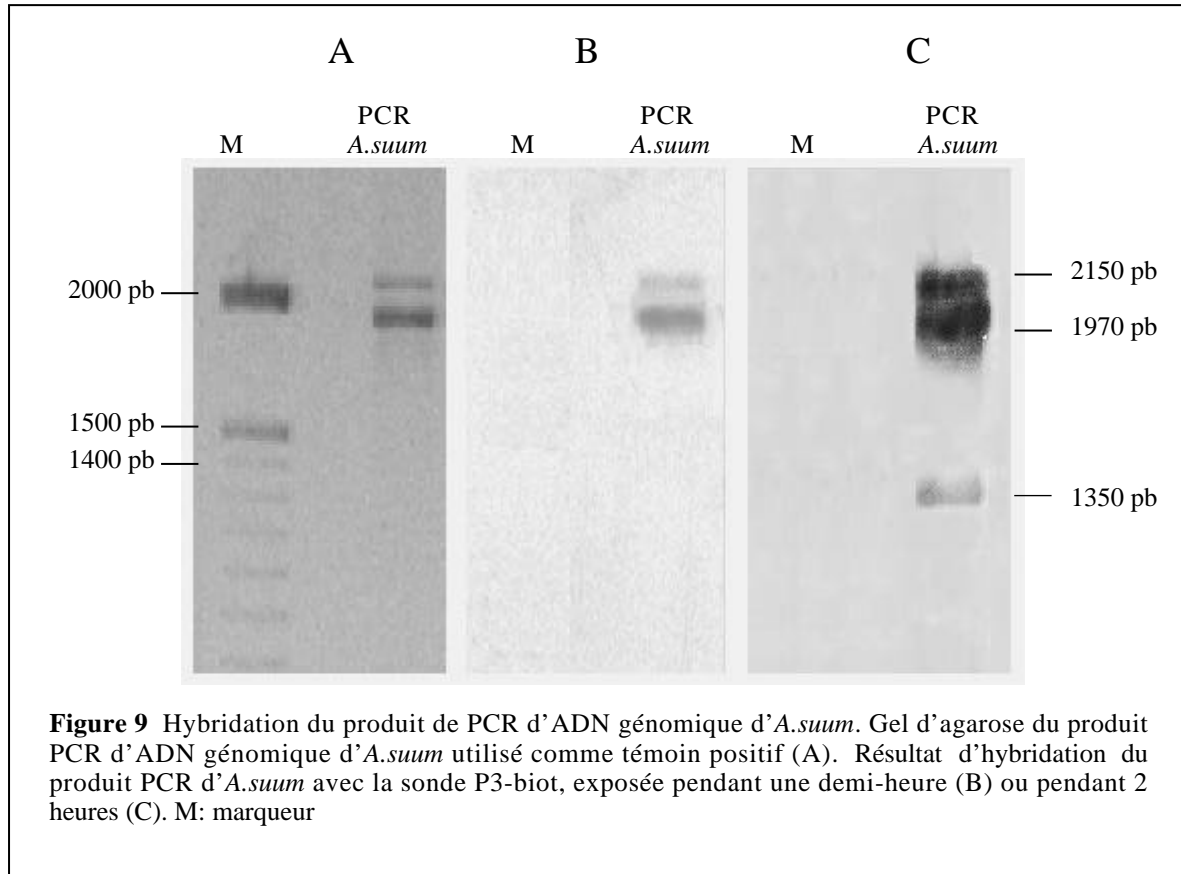
Les produits de PCR des clones G1 et G2 qui montrent les bandes autour de 1970 pb et de 1670 pb, respectivement, ont été utilisés comme contrôles positifs sur le gel (Figure 8, lignes 2 et 3).



L'hybridation avec la sonde P3-biot a permis, après une demi-heure d'exposition à un film, de détecter les deux bandes de 2150 et 1970 pb amplifiées de l'ADN génomique. La troisième bande de 1350 pb a aussi été détectée, mais après une exposition de deux heures (Figure 9).

Le génome d'*Ascaris suum* contient un fragment d'as-epicut d'une taille de 1970 pb identique à celui du clone G2. La bande de 1670 pb, correspondante à celle du clone G1, n'a pas été

trouvée dans le produit de la PCR génomique. Les deux fragments de 2150 et 1350 pb amplifiés de l'ADN génomique suggèrent la présence d'autres gènes d'*as-epicut1* avec un nombre des régions répétitives plus grand ou plus petit que celui du clone G2.



Afin de vérifier de la séquence des trois fragments génomiques amplifiés (2150, 1970, et 1350 pb), ces fragments ont été excisés du gel d'agarose, purifiés et insérés dans le plasmide pBs. Seulement l'insertion de la bande de 2150 pb a réussi. Un clone nommé G3 a été isolé de la boîte de culture inoculée avec des bactéries transformées avec le plasmide pBs qui contient la bande de 2150 pb. L'insert dans ce clone a été séquencé étape par étape en commençant avec les amorces du plasmide pBs, M13 universel et M13 reverse. Les autres étapes du séquençage ont été réalisées avec les amorces internes qui ont été déjà utilisées pour le séquençage du clone G2 (Figure 3). L'assemblage des séquences a permis la détermination de la séquence entière de l'insert du clone G3 (Figures 10 et 11). L'insert est constitué de 2130 pb et il contient une région non codante dans la région de 1-708 pb suivie d'une région codante d'*as-epicut1* de 1410 pb dans la région de 709- 2118 pb, avec un codon Met dans le site 709-711 pb et un

codon stop dans le site 2119-2121 pb. L'insert se termine dans le sens 3' avec 9 nucléotides dans le site 2122-2130 pb (Figure 10).

Clone G3

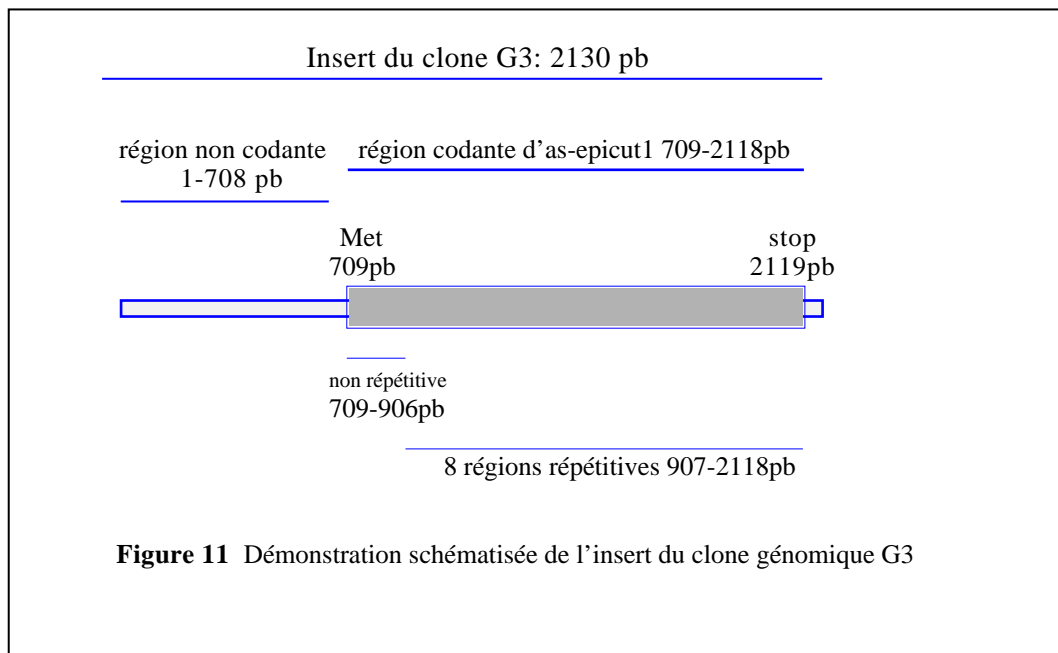
```

1 - TACTCGACACTGAAATTTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATATTTTTCATGGATTAGT - 60
61 - TCTTAGGTTAGGGTTAGGATAATGGATACGGATCAAACAATTTCCCGTAAGGCAACATT - 120
121 - AATTAAAGTTCTTAAACTATTTGTATAAATTGTTTCATCAAACATAAATCAATAATTTGA - 180
181 - GGTGGGAGAACC AATCATTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTT - 240
241 - GTTTTTATTAGTTTTTTTTTTTTCATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCTCTGTTATTT - 300
301 - CAGCATCTAAAATAATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAAATCTCTTCTATTAAATTTA - 360
361 - CAAATTCATAGGTGAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTTAGTATTTCTTATCA - 420
421 - ACTTCATATCTTCGATGCTTTTTTTTGTGGGAAAGAGCTATTGTACGCTTACCAGAAAA - 480
481 - AAAATTTTGTATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCCGCTAAACTTTAGAGTGG - 540
541 - TTAAGAAGTGCAGCAAAATTTTATGAGCTCAATTTGTCAAGTACAAAAGAAATTTCTTATA - 600
601 - AGACCGACCACCTATGATGCTTGCCTCTGCAGCGGCTTTTAGCATATTCAGTATTAGT - 660
661 - TTGCATACCCGCTTCTAAAGCAAAACTGCAATCTCTGAGAAGAAATTCATGTTTATGCA - 720
                                     M C Y A
721 - AGGTTTCAGTTACATCTAAGTACAGTTTACGAGGCTGCTCATGAAAGAGCACATTCAAAGC - 780
      R F Q L H L S T V Q E L L M K E H I Q S
781 - CGAGGAGATTCCTATCGGATTAAGCGATGAAGCTGAATATGTATAATAGTTATTTCCCT - 840
      R G D S Y R I K A M K L N M Y N S Y F P
841 - AAAAAATACCACCAACTTCATATATCCITTCFAGTTGCGATCGATTTCCITCCATTTTCA - 900
      K K Y H Q L H I S F L V A I D F L P F S
901 - GTTTTCAAGAGGAACAATGCGTATGGTGACGAACCCGTTGGCTCCCGCTGAAGGGTACC - 960
      V F K R N N A Y G D E P V A P A E G Y R
961 - GCGCCAGCACCGAACCAGCTCCTGTAGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAACAAGCGGCA - 1020
      A P A P E P A P V E Q A P A P I E Q A A
1021 - GAAGCTCCAGCAGCAGTAGAATCTAGCGGCTATCGCAAGAAGGGGAACAACCGGTACGGT - 1080
      E A P A A V E S S G Y R K K G N N A Y G
1081 - GATGAGCCTATCGCTCCCCTGCAGGAGTTGCAGAACCAGCTCCCGCCCCGTTGAGATG - 1140
      D E P I A P A A G V A E P A P A P V E M
1141 - GCTCCCAGCCAGTTCGAACAAGCTGCTGAAGCACCTGCACCTGTAGAATCCAGCGGCTAC - 1200
      A P A P V E Q A A E A P A P V E S S G Y
1201 - CGCAAAAAGAGGAATAACCGCTACGGCGACGAACCCGTTGGCTCCATCTGGTGGATACGCA - 1260
      R K K R N N A Y G D E P V A P S G G Y A
1261 - GCGCAGCAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGCGCGGACCAATTGAGCAAGCTGCA - 1320
      A A Q P A P A P V E Q A P A P I E Q A A
1321 - GAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACCGGTACGGT - 1380
      E A P A A V E S S G Y R K K R N N A Y G
1381 - GACGAACCCGTGGCCCCATCTGGTGGATACGACGCGCACAGCCGACAGCTCCTGTGA - 1440
      D E P V A P S G G Y A A A Q P A P A P V
1441 - GAACAGCGCGGACCAATTGAACAAGCTGCAGAAGCACCAGCAGTGAATCCAGC - 1500
      E Q A P A P I E Q A A E A P A A V E S S
1501 - GGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACCGCTACGGTGACGAACCCGTTGGCCCCATCTGGTGG - 1560
      G Y R K K R N N A Y G D E P V A P S G G
1561 - TACGACGCGCACAGCCGACAGCTCCTGTAGAACAGGCGCGGACCAATTGAGCAA - 1620
      Y A A A Q P A P A P V E Q A P A P I E Q
1621 - GCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCG - 1680
      A A E A P A A V E S S G Y R K K R N N A
1681 - TACGGTGACGAACCCGTGGCCCCATCTGGTGGGTACGACGCGCACAGCCGACAGCT - 1740
      Y G D E P V A P S G G Y A A A Q P A P A
1741 - CCTGTAGAACAGGCGCGGACCAATTGAACAAGCTGCAGAAGCACCAGCAGCAGTGGAA - 1800
      P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A V E
1801 - TCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACCGCTACGGCGACGAACCCGTTGGCCCCAGT - 1860
      S S G Y R K K R N N A Y G D E P V A P A
1861 - GGAGGATACGACGCGCACAAACCGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGCTCCGGCACCAATT - 1920
      G G Y A A A Q P A P A P V E Q A P A P I
1921 - GAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAGAAAGAGGAAT - 1980
      E Q A A E A P A A V E S S G Y R R K R N
1981 - AACGCGTACGGTGACGAACCCGTTGGCTCCATCTGGGGGATACGACGCGGACAAACCGG - 2040
      N A Y G D E P V A P S G G Y A A A Q P A
2041 - CCGCTCCTGTGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCA - 2100
      P A P V E Q A P A P I E Q A A E A P A A
2101 - GTAGAATCTAGTGGTTATTGATTTGTTGTAG - 2130
      V E S S G Y *

```

Figure 10 L'insert du clone G3 de 2130 pb. La région codante d'as-epicut1 est formée de 1410 pb et elle contient 8 régions répétitives. Le premier codon Met est situé dans le site 709 pb et le codon stop dans le site 2119 pb.

La région codante commence avec une région 5' non répétitive (709-906 pb) qui se termine par un "splicing acceptor" TTTTCAG dans le site 895-901 pb, comme les cas des clones G1 et G2.



Deux nucléotides C dans les sites 743 et 748 pb de la région non répétitive d'as-epicut1 changent le cadre de lecture par rapport aux clones G1 et G2, mais avec un autre nucléotide C inséré dans le site 792, la phase de lecture d'as-epicut1 revient au même cadre dans les trois séquences (Figure 12). La séquence NH2 non répétitive d'AS-EPICUT1 peut être divisée en trois parties (Figure 13). La première partie A est formée de 11 acides aminés dans la séquence peptidique 1-11 aa (MCYARFQLHLS) identique à celle des clones G1 et G2. La deuxième partie B de 17 acides aminés, produite par des changements dans les cadres de lecture, se trouve dans la région 12-28 aa (TVQELLMKEHIQSRGDS) et remplace celle des clones G1 et G2 formée de 16 acides aminés (KLGAAHERTHSKPRRF). La troisième partie C de 38 acides aminés (YRIKAMKLNMYNSYFPKKYHQLHISSFLVAIDFLPFSVF) produite par la correction du cadre de lecture, se trouve dans la région 29-66 aa, et elle est identique à celle des clones G1 et G2 dans la région 28-65 aa (Figure 13).

La région de 907-2118 pb est formée de 8 régions répétitives. Bien qu'un nombre important de variations soit présent dans la séquence des nucléotides (Figure 12 et Table 6), les séquences des acides aminés des trois clones ne montrent que des variations très faibles (Figure 13). Tous les trois clones ont le même cadre de lecture dans les régions répétitives. Dans ces

régions, la plupart des variations nucléotidiques ne se manifestent pas au niveau des séquences peptidiques.

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

G1	TACTCGACACTGAAATTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATATTTTTCATGGATTAGT	60
G2	TACTCGACACTGAAATTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATATTTTTCATGGATTAGT	60
G3	TACTCGACACTGAAATTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATATTTTTCATGGATTAGT	60

G1	TCTTAGGTTAGGGTTAGGATAATGGATATGGATCAAACAATTTCCCGTAAGGCAACATT	120
G2	TCTTAGGTTAGGGTTAGGATAATGGATATGGATCAAACAATTTCCCGTAAGGCAACATT	120
G3	TCTTAGGTTAGGGTTAGGATAATGGATACGGATCAAACAATTTCCCGTAAGGCAACATT	120

G1	AATTAAGTTCTTAAACTATTTGTATAAATGTTTCATCAAACATAAAATCAATAATTGA	180
G2	AATTAAGTTCTTAAACTATTTGTATAAATGTTTCATCAAACATAAAATCAATAATTGA	180
G3	AATTAAGTTCTTAAACTATTTGTATAAATGTTTCATCAAACATAAAATCAATAATTGA	180

G1	GGTTCGAGAACCAATCATTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTT	240
G2	GGTTCGAGAACCAATCATTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTT	240
G3	GGTTCGAGAACCAATCATTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTT	240

G1	GTTTTATTAGTTTTTTTTTT--CATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCTCTGTTATTT	298
G2	GTTTTATTAGTTTTTTTTTT--CATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCTCTGTTATTT	298
G3	GTTTTATTAGTTTTTTTTTTTTCATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCTCTGTTATTT	300

G1	CAGCATCTAAAAATAATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAAATACTCTTCTAATTAATTTTA	358
G2	CAGCATCTAAAAATAATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAAATACTCTTCTAATTAATTTTA	358
G3	CAGCATCTAAAAATAATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAAATACTCTTCTAATTAATTTTA	360

G1	CAAATGTCATAGGTGTAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTATAGTATTTCTTATCA	418
G2	CAAATGTCATAGGTGTAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTATAGTATTTCTTATCA	418
G3	CAAATGTCATAGGTGTAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTATAGTATTTCTTATCA	420

G1	ACTTCATATCTTCGATGCTTTTTTTGTGGGAAAGAAGCTATTGTACGCTTACCAGAAA	478
G2	ACTTCATATCTTCGATGCTTTTTTTGTGGGAAAGAAGCTATTGTACGCTTACCAGAAA	478
G3	ACTTCATATCTTCGATGCTTTTTTTGTGGGAAAGAAGCTATTGTACGCTTACCAGAAA	480

G1	AAATTTTTGATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCGCCTAAACTTTAGAGTGGA	538
G2	AAATTTTTGATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCGCCTAAACTTTAGAGTGGA	538
G3	AAATTTTTGATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCGCCTAAACTTTAGAGTGGA	540

G1	TTAAAAGATGCGAACAATTTTATGAGCTCAATTTGTCAGTACAAAAGAATTTCTTATTA	598
G2	TTAAAAGATGCGAACAATTTTATGAGCTCAATTTGTCAGTACAAAAGAATTTCTTATTA	598
G3	TTAAAAGATGCGAACAATTTTATGAGCTCAATTTGTCAGTACAAAAGAATTTCTTATTA	600

G1	AGACCGACCACCTATGATGCTTGCACCTGTCAGCGGTCTTTTAGCATATTGCAGTTTAGT	658
G2	AGACCGACCACCTATGATGCTTGCACCTGTCAGCGGTCTTTTAGCATATTGCAGTTTAGT	658
G3	AGACCGACCACCTATGATGCTTGCACCTGTCAGCGGTCTTTTAGCATATTGCAGTTTAGT	660

G1	TTGCATACCGCCTTCTAAAGCAAACCTGCAATCTCTGAGAAGAAATTCATGTGTTATGCA	718
332	TTGCATACCGCCTTCTAAAGCAAACCTGCAATCTCTGAGAAGAAATTCATGTGTTATGCA	718
G3	TTGCATACCGCCTTCTAAAGCAAACCTGCAATCTCTGAGAAGAAATTCATGTGTTATGCA	720

G1	AGGTTTCAGTTACATCTAAGTA-AGTT-AGGAGCTGCTCATGAAAGAACACATTCAAAGC	776
G2	AGGTTTCAGTTACATCTAAGTA-AGTT-AGGAGCTGCTCATGAAAGAACACATTCAAAGC	776
G3	AGGTTTCAGTTACATCTAAGTACAGTTCAGGAGCTGCTCATGAAAGAGCACATTCAAAGC	780

▲ ▲		
G1	CGAGGAGATTC-TATCGGATTAAGCGATGAAGCTGAATATGTATAATAGTTATTTCCCT	835
G2	CGAGGAGATTC-TATCGGATTAAGCGATGAAGCTGAATATGTATAATAGTTATTTCCCT	835
G3	CGAGGAGATTCCTATCGGATTAAGCGATGAAGCTGAATATGTATAATAGTTATTTCCCT	840

▲		
G1	AAAAAATACCACCAACTTCATATATCCTTTCTAGTTGCGATCGAATTCCTTCCATTTTCA	895
G2	AAAAAATACCACCAACTTCATATATCCTTTCTAGTTGCGATCGAATTCCTTCCATTTTCA	895
G3	AAAAAATACCACCAACTTCATATATCCTTTCTAGTTGCGATCGAATTCCTTCCATTTTCA	900

G1	GTTTTCAAGAGGAACAATGCGTATGGTGACGAACCCGTGGCTCCCGCTGAAGGGTACCGA	955
G2	GTTTTCAAGAGGAACAATGCGTATGGTGACGAACCCGTGGCTCCCGCTGAAGGGTACCGA	955
G3	GTTTTCAAGAGGAACAATGCGTATGGTGACGAACCCGTGGCTCCCGCTGAAGGGTACCGA	960

G1	GCGCCACGACCGGAACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCTCCGGCACCAATTGAACAAGCGGCA	1015
G2	GCGCCACGACCGGAACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCTCCGGCACCAATTGAACAAGCGGCA	1015
G3	GCGCCAGCACCAGGAAACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCTCCGGCACCAATTGAACAAGCGGCA	1020

G1	GAAGCTCCAGCAGCAGTAGAATCTAGCGGCTATCGCAAGAAGAGGAACAACGCGTACGGT	1075
G2	GAAGCTCCAGCAGCAGTAGAATCTAGCGGCTATCGCAAGAAGAGGAACAACGCGTACGGT	1075
G3	GAAGCTCCAGCAGCAGTAGAATCTAGCGGCTATCGCAAGAAGAGGGAACAACGCGTACGGT	1080

G1	GATGAGCCTATCGCTCCCGCTGCAGGAGTTGCAGAACCAGCTCCCGCCCCGTTGAGATG	1135
G2	GATGAGCCTATCGCTCCCGCTGCAGGAGTTGCAGAACCAGCTCCCGCCCCGTTGAGATG	1135
G3	GATGAGCCTATCGCTCCCGCTGCAGGAGTTGCAGAACCAGCTCCCGCCCCGTTGAGATG	1140

G1	GCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCACCTGCACCTGTAGAAATCCAGCGGCTAC	1195
G2	GCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCACCTGCACCTGTAGAAATCCAGCGGCTAC	1195
G3	GCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCACCTGCACCTGTAGAAATCCAGCGGCTAC	1200

G1	CGAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGCGACGAACCCGTGGCCCCAGCTGGAGGATACGCC	1255
G2	CGAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGCGACGAACCCGTGGCCCCAGCTGGAGGATACGCC	1255
G3	CGAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGCGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCCA	1260

G1	GCGGCAGAACCCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGGCCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCA	1315
G2	GCGGCAGAACCCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGGCCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCA	1315
G3	GCGGCACAGCTGCACCAAGCTCCTGTAGAACAGGGCCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCA	1320

G1	GAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCCTACGGT	1375
G2	GAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCCTACGGT	1375
G3	GAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCCTACGGT	1380

G1	GACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTA	1435
G2	GACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTA	1435
G3	GACGAACCCGTGGCCCCATCTGGTGGATACGCAGCGGCACAGCGGCACCAGCTCCTGTA	1440

G1	GAACAGGCGCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGC	1495
G2	GAACAGGCGCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGC	1495
G3	GAACAGGCGCCGGCACCAATTGAACAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGC	1500

G1	GGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCCCCATCTGGTGGGA	1555
G2	GGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCCCCATCTGGTGGGA	1555
G3	GGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCCCCATCTGGTGGGA	1560

G1	TACGCAGCGGCACA-----	1569
G2	TACGCAGCGGCACAGCCGGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCCCGGCACCAATTGAACAA	1615
G3	TACGCAGCGGCACAGCCGGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCCCGGCACCAATTGAGCAA	1620

G1	-----	
G2	GCTGCAGAAGCACCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCG	1675
G3	GCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCG	1680

G1	-----	
G2	TACGG-----	1680
G3	TACGGTGACGAACCCGTGGCCCCATCTGGTGGTACGCAGCGGCACAGCCGGCACCAGCT	1740

G1	-----	
G2	-----	
G3	CCTGTAGAACAGGGCCCGGCACCAATTGAACAAGCTGCAGAAGCACCAGCAGCAGTGGAA	1800

G1	-----	
G2	-----CGACGAACCCGTGGCCCCAGCT	1702
G3	TCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGCGACGAACCCGTGGCCCCAGCT	1860

G1	-----	
G2	GGAGGATACGCAGCGGCACAACCCGGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCCCGGCACCAATT	1762
G3	GGAGGATACGCAGCGGCACAACCCGGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGTCCCGGCACCAATT	1920

G1	-----	

```

G2      GAGCAAGCTGCAGAAGCTCCGGCAGCAGTGGAAATCCAGCGGCTACCGCAGAAAGAGGAAT 1822
G3      GAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGGAAATCCAGCGGCTACCGCAGAAAGAGGAAT 1980

G1      -----ACCGGCA 1576
G2      AACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGGGGATACGCAGCGGCACAACCGGCA 1882
G3      AACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGGGGATACGCAGCGGCACAACCGGCA 2040
          *****

G1      CCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCA 1636
G2      CCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCA 1942
G3      CCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCA 2100
          *****

G1      GTAGAATCTAGTGGTTATTGA 1657
G2      GTAGAATCTAGTGGTTATTGA 1963
G3      GTAGAATCTAGTGGTTATTGA 2121
          *****
    
```

Figure 12 Alignement des séquences nucléotidiques des inserts des trois clones génomiques G1, G2 et G3 contenant as-epicut1. Les flèches verticales indiquent les nucléotides C insérés dans le clone G3.

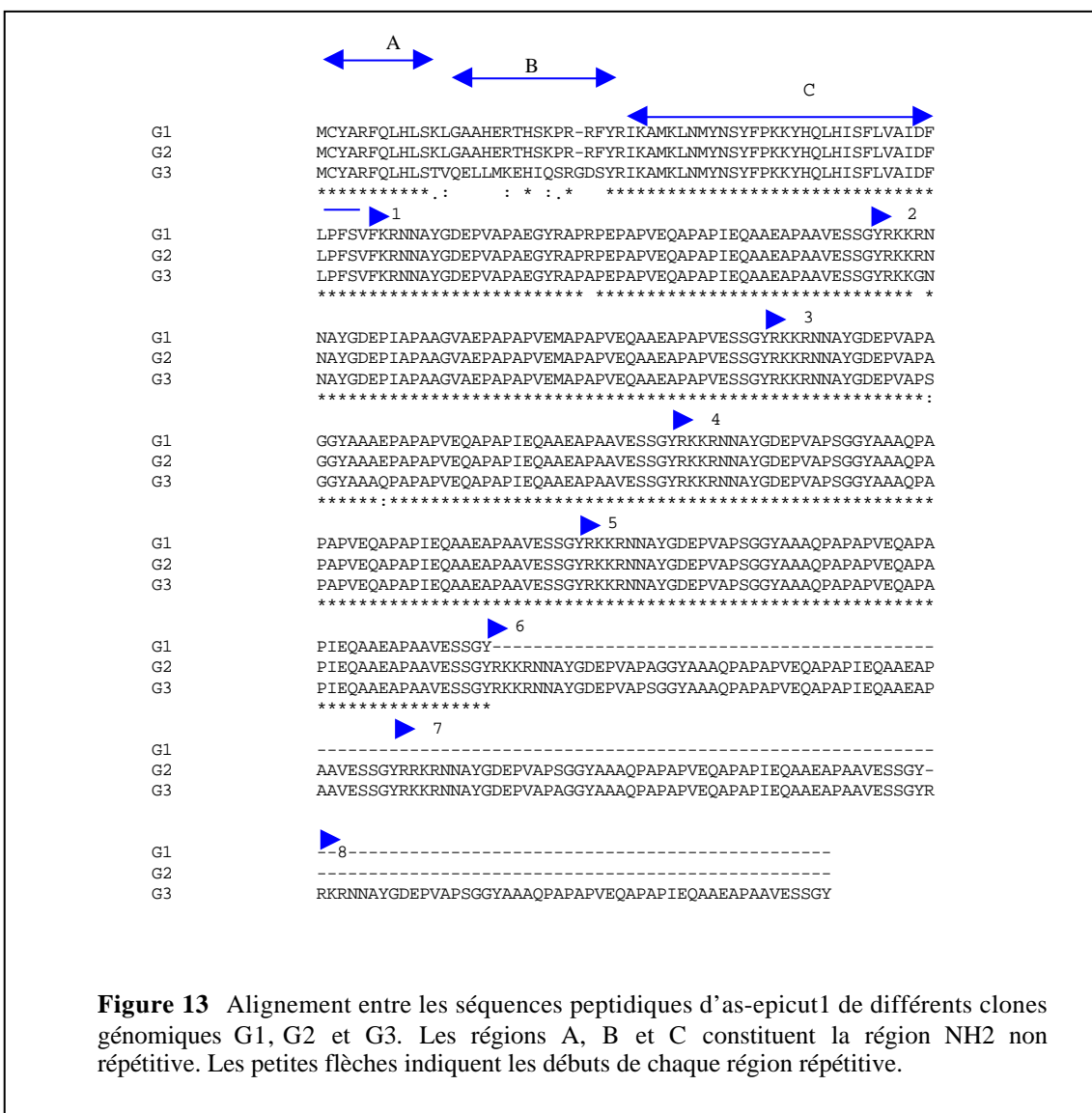


Figure 13 Alignement entre les séquences peptidiques d’as-epicut1 de différents clones génomiques G1, G2 et G3. Les régions A, B et C constituent la région NH2 non répétitive. Les petites flèches indiquent les débuts de chaque région répétitive.

A partir de la région codante entière (709-2118 pb), la protéine prédite d'AS-EPICUT1 du clone G3 est formée de 470 acides aminés avec une masse moléculaire de 48.4 kD. Cette protéine est riche en alanine (24 %), proline (14.3 %), acide glutamique (9.5 %) et tyrosine d'environ (6 %). Dans le cas où la séquence *as-epicut1* dans le clone G3 passe par un trans-épissage pendant la phase post-transcriptionnelle, la séquence d'AS-EPICUT1 serait formée de 415 acides aminés avec une masse moléculaire de 41.5 kD et cette séquence contiendrait seulement les 8 régions répétitives. La protéine résultant des messagers d'*as-epicut1* trans-épissés, est riche en alanine (26.7 %), proline (16 %), acide glutamique (10.4 %) et 3 tyrosine par région répétitive. Dans le cas où le codon d'initiation dans les messagers d'*as-epicut1* trans-épissés serait la première Met dans le site 1138-1140 pb, la protéine prédite serait formée de 327 aa, avec une masse moléculaire autour de 33 kD (Table 5).

Comparaison des séquences as-epicut1 des clones d'ADNc avec les clones génomiques.

Les séquences nucléotidiques d'*as-epicut1* des clones génomiques (G1, G2 et G3) et des clones d'ADNc d'*A.suum* (31B1A, C1, C2 et C3) ont été comparées par alignement (Figure 14). La région *as-epicut1* dans les clones génomiques est caractérisée par une région 5' non répétitive formée de 191 nucléotides dans les régions 707-896 pb des clones (G1 et G2), et 709-901 pb du clone (G3) avec un site d'un accepteur d'épissage (TTTTCAG) dans les sites 890-896 des clones (G1 et G2) et 895-901pb du clone (G3). La région 5' au-delà de l'accepteur d'épissage est remplacée par une autre séquence d'une petite taille nommée X dans les clones ADNc (Figure 15). La séquence X montre une longueur variable d'un clone d'ADNc à un autre. Le bout 3' de la séquence X formé de 33 nucléotides (TCGCGATTGCGTTGGCCGC GGACGCCAAATTTC) est identique dans tous les clones d'ADNc (Figures 15 et 16). Par contre le bout 5' est formé d'un nombre variable des nucléotides qui sont identiques dans certains clones comme C1 (CTGTCGTTCTGT: 12 pb) et C2 (CTGTTCTGT : 9 pb) ou différents dans d'autres comme 31B1A (GCAGCGCCGCTT: 12 pb) et C3 (C : 1 seule pb). La comparaison de la séquence X avec les différents "spliced leaders" de *C.elegans* ne montre pas de similarité (Figure 16).

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

```

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 TACTCGACACTGAAATTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATATTTTCATGGATTAGT 60
G2 TACTCGACACTGAAATTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATATTTTCATGGATTAGT 60
G3 TACTCGACACTGAAATTTTCTCGAGCGGCTAGCGTATCCAATATTTTCATGGATTAGT 60

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 TCTTAGGTTAGGGTTAGGATAATGGATATGGATCAAACAATTTTCCCGTAAGGCAACATT 120
G2 TCTTAGGTTAGGGTTAGGATAATGGATATGGATCAAACAATTTTCCCGTAAGGCAACATT 120
G3 TCTTAGGTTAGGGTTAGGATAATGGATACGGATCAAACAATTTTCCCGTAAGGCAACATT 120

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 AATTAAAGTTCTTAAACTATTTGTATAAATGTTTCATCAAACATAAAATTCATAATTTGA 180
G2 AATTAAAGTTCTTAAACTATTTGTATAAATGTTTCATCAAACATAAAATTCATAATTTGA 180
G3 AATTAAAGTTCTTAAACTATTTGTATAAATGTTTCATCAAACATAAAATTCATAATTTGA 180

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 GGTTCGAGAACCAATCATTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTT 240
G2 GGTTCGAGAACCAATCATTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTT 240
G3 GGTTCGAGAACCAATCATTGTTCTCAATTTGACTCTTTGATACGCTTCAACTAAACGGTT 240

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 GTTTTTATTAGTTTTTTTTTTT--CATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCCTGTTATTT 298
G2 GTTTTTATTAGTTTTTTTTTTT--CATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCCTGTTATTT 298
G3 GTTTTTATTAGTTTTTTTTTTTTCATGCACTCTTACTACGTTATATCGGTCCTGTTATTT 300

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 CAGCATCTAAAAATAATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAAATACTCTTCTATTAATTTTA 358
G2 CAGCATCTAAAAATAATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAAATACTCTTCTATTAATTTTA 358
G3 CAGCATCTAAAAATAATATGTTCACTGTTTCAGGAGAAAAATACTCTTCTATTAATTTTA 260

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 CAAATTCATAGGTGTAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTTAGTATTTCTTATCA 418
G2 CAAATTCATAGGTGTAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTTAGTATTTCTTATCA 418
G3 CAAATTCATAGGTGTAATATTTTCATGTTTTGTTTTGACATTTTTAGTATTTCTTATCA 420

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 ACTTCATATCTTCGATGCTTTTTTTTGTGGGAAAGAAGCTATTGTACGCTTACCAGAAA 478
G2 ACTTCATATCTTCGATGCTTTTTTTTGTGGGAAAGAAGCTATTGTACGCTTACCAGAAA 478
G3 ACTTCATATCTTCGATGCTTTTTTTTGTGGGAAAGAAGCTATTGTACGCTTACCAGAAA 480

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 AAATTTTTGATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCGCCTAAACTTTAGAGTGGA 538
G2 AAATTTTTGATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCGCCTAAACTTTAGAGTGGA 538
G3 AAATTTTTGATGGATATACGTCACGAAATATGAGAGAGTTCGCCTAAACTTTAGAGTGGA 540

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 TTTAAAAGATGCGAACAATTTTATGAGCTCAATTTGTCAGTACAAAAGAATTTCTTATTA 598
G2 TTTAAAAGATGCGAACAATTTTATGAGCTCAATTTGTCAGTACAAAAGAATTTCTTATTA 598
G3 TTTAAAAGATGCGAACAATTTTATGAGCTCAATTTGTCAGTACAAAAGAATTTCTTATTA 600

```



```

31B1A      AGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCTCCTGCACCTGTAGAATCCAGCG 339
C1          AGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCTCCTGCACCTGTAGAATCCAGCG 339
C2          AGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCTCCTGCACCTGTAGAATCCAGCG 336
C3          AGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCTCCTGCACCTGTAGAATCCAGCG 328
G1          AGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCACTGCACCTGTAGAATCCAGCG 1190
G2          AGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCACTGCACCTGTAGAATCCAGCG 1190
G3          AGATGGCTCCCGCGCCAGTCGAACAAGCTGCTGAAGCACTGCACCTGTAGAATCCAGCG 1195
*****

31B1A      GCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCCCCAGCTGGAGGAT 399
C1          GCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGAT 399
C2          GCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCCCCAGCTGGAGGAT 396
C3          GCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCCCCAGCTGGAGGAT 388
G1          GCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGCGACGAACCCGTGGCCCCAGCTGGAGGAT 1250
G2          GCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGCGACGAACCCGTGGCCCCAGCTGGAGGAT 1250
G3          GCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGTACGGCGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGAT 1255
*****

31B1A      ACGCCGCGGCAGAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAG 459
C1          ACGCAGCGGCACAGCCTGCACCAAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAG 459
C2          ACGCCGCGGCAGAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAG 456
C3          ACGCCGCGGCAGAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAG 448
G1          ACGCCGCGGCAGAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAG 1310
G2          ACGCCGCGGCAGAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAG 1310
G3          ACGCAGCGGCACAGCCTGCACCAAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAG 1315
**** *

31B1A      CTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGT 519
C1          CTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGT 519
C2          CTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGT 516
C3          CTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGT 508
G1          CTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGT 1370
G2          CTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGT 1370
G3          CTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCGT 1375
*****

31B1A      ACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTC 579
C1          ACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTC 579
C2          ACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTC 576
C3          ACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTC 568
G1          ACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTC 1430
G2          ACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTC 1430
G3          ACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTC 1435
*****

31B1A      CTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAAT 639
C1          CTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGACAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAAT 639
C2          CTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAAT 636
C3          CTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAAT 628
G1          CTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAAT 1490
G2          CTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAAT 1490
G3          CTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTGACAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAAT 1495
*****

31B1A      CCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTG 699
C1          CCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTG 699
C2          CCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTG 696
C3          CCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTG 688
G1          CCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTG 1550
G2          CCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTG 1550
G3          CCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACGCTTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTG 1555
*****

31B1A      GTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTG 759
C1          GAGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTG 759
C2          GTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTG 756
C3          GTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTG 748
G1          GTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTG 1569
G2          GTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTG 1610
G3          GTGGATACGCAAGCGGCACAGCCTGCACCAGCTCCTGTAGAACAGGGCGCCGGCACC AATTG 1615
*

31B1A      AGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCA----- 807
C1          AGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCA----- 807
C2          AGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCA----- 804
C3          AGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCA----- 796
G1          -----
G2          AACAAGCTGCAGAAGCAACCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATA 1670
G3          AGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATA 1675

```

```

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 -----
G2 ACGCGTACGG----- 1680
G3 ACGCGTACGGTGACGAACCCGTGGCCCCATCTGGTGGGTACGCAGCGGCACAGCCGGCAC 1735

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----
G1 -----
G2 -----
G3 CAGCTCCTGTAGAACAGGGCCCGGCACCAATTGAACAGCTGCAGAAGCACCAGCAGCAG 1795

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 -----AAAAGAGGAATAACCGGTACGGCGACGAACCCGTGGCCC 835
G1 -----
G2 -----CGACGAACCCGTGGCCC 1697
G3 TGGAATCCAGCGGCTACCGCAAAAAGAGGAATAACCGGTACGGCGACGAACCCGTGGCCC 1855

31B1A -----
C1 -----
C2 -----
C3 CAGCTGGAGGATACGCAGCGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCAC 895
G1 -----
G2 CAGCTGGAGGATACGCAGCGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGCGCCGGCAC 1757
G3 CAGCTGGAGGATACGCAGCGGCACAACCGGCACCGGCTCCTGTAGAACAGGCTCCGGCAC 1915

31B1A -----GAAAGA 813
C1 -----GAAAGA 813
C2 -----GAAAGA 810
C3 CAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAGAAAGA 955
G1 -----
G2 CAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCGGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAGAAAGA 1817
G3 CAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAGCAGCAGTGAATCCAGCGGCTACCGCAGAAAGA 1975

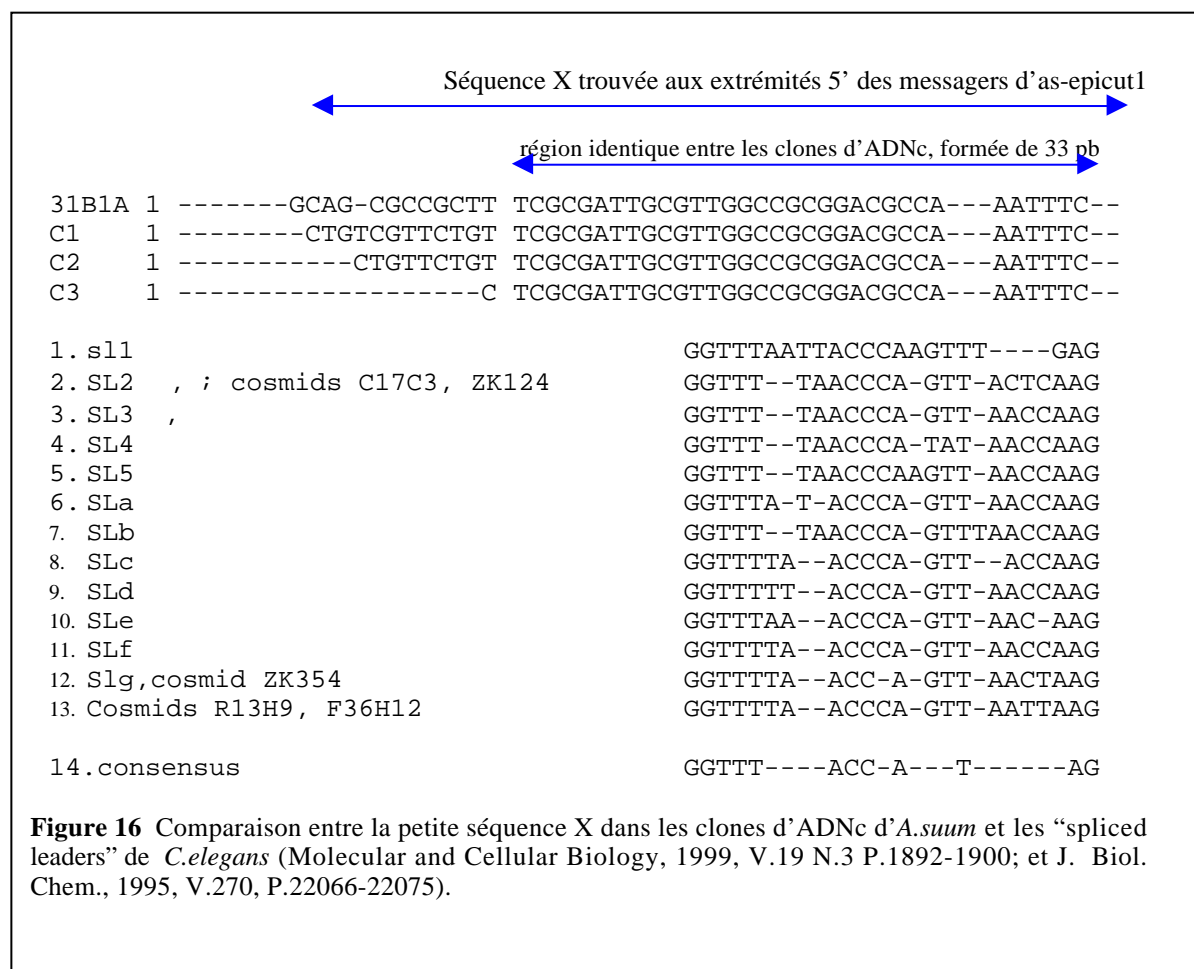
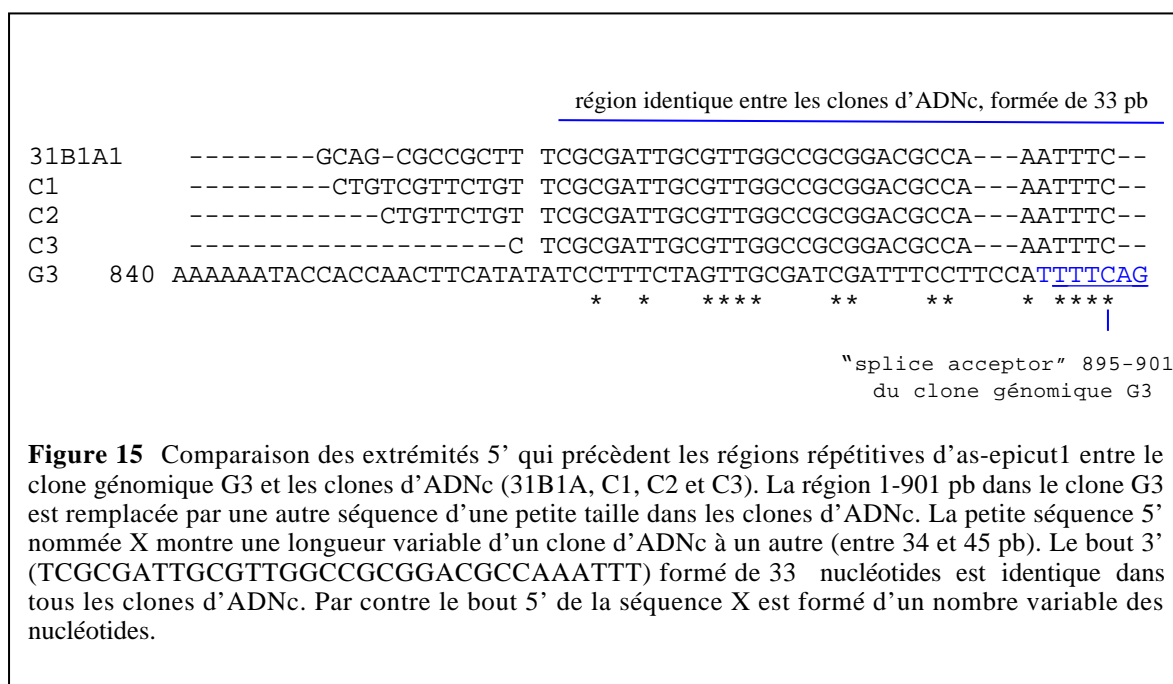
31B1A GGAATAACCGGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGGGGATACGCAGCGGCACAAC 873
C1 GGAATAACCGGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGGGGATACGCAGTGGCACAAC 873
C2 GGAATAACCGGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGGGGATACGCAGCGGCACAAC 870
C3 GGAATAACCGGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGGGGATACGCAGCGGCACAAC 1015
G1 -----AC 1571
G2 GGAATAACCGGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGGGGATACGCAGCGGCACAAC 1877
G3 GGAATAACCGGTACGGTGACGAACCCGTGGCTCCATCTGGGGGATACGCAGCGGCACAAC 2035
**

31B1A CGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAG 933
C1 CGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAG 933
C2 CGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAG 930
C3 CGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAG 1075
G1 CGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAG 1631
G2 CGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAG 1937
G3 CGGCACCGGCTCCTGTGGAACAGGCTCCGGCACCAATTGAGCAAGCTGCAGAAGCTCCAG 2095
*****

31B1A CAGCAGTAGAATCTAGTGGTTATTGA 959
C1 CAGCAGTAGAATCTAGTGGTTATTGA 959
C2 CAGCAGTAGAATCTAGTGGTTATTGA 956
C3 CAGCAGTAGAATCTAGTGGTTATTGA 1101
G1 CAGCAGTAGAATCTAGTGGTTATTGA 1657
G2 CAGCAGTAGAATCTAGTGGTTATTGA 1963
G3 CAGCAGTAGAATCTAGTGGTTATTGA 2121
*****

```

Figure 14. Alignement des séquences codant pour as-epicut1 des clones analysés; clones d'ADNc: 31B1A, C1, C2 et C3; clones d'ADN génomique: G1, G2 et G3. La région as-epicut1 dans les clones génomiques est caractérisée par une région 5' non répétitive formée de 191 nucléotides (de 707-896 pb dans G1 et G2; de 709-901 pb dans G3) avec un accepteur d'épissage (TTTTAG) dans les sites 890-896 des clones (G1 et G2) et 895-901 du clone G3.



DISCUSSION

L'analyse des clones isolés de la librairie d'ADNc d'*A.suum* a révélé des différences au niveau de la taille de la séquence codante pour la cuticuline, le nombre de régions répétitives, et aux niveaux des extrémités 3' et 5'. Toutes ces différences sont accompagnées de variations dans les séquences nucléotidiques entre les différents clones. La plupart des variations nucléotidiques n'affectent pas les séquences des acides aminés. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer ces différences, par exemple la présence de copies de gènes *as-epicut1* multiples dans le génome ou des modifications post-transcriptionnelles pendant la phase de maturation des messagers. Le plus important de ces résultats était l'absence d'un codon d'initiation dans l'extrémité 5' dans tous les clones étudiés.

Pour clarifier ces données, le gène *as-epicut1* a été étudié à partir de l'ADN génomique d'*A.suum*. Les sous-clones G1 et G2 qui possèdent des tailles différentes ont été construits à partir du même fragment de 4000 pb contenant *as-epicut1* récupéré de la librairie génomique. Le séquençage de ces clones a montré l'absence de deux régions répétitives dans la région codante du clone G1 par rapport au clone G2. Par contre, la région 3' non-codante qui est présente dans l'insert du clone G1 est absente dans G2. La complémentation des deux inserts permet de reconstruire la taille du fragment de départ formé de 3911 pb (4000 pb). La perte de certaines régions dans les deux inserts peut être expliquée par des modifications pendant la préparation de ces clones.

Le résultat du séquençage des clones G1, G2, et du clone G3 montre la présence d'une région 5' plus longue que celle trouvée dans tous des clones isolés de la librairie d'ADNc. La découverte de cette région complète les données précédentes obtenues de la librairie d'ADNc d'*A.suum*. Dans cette région 5', la présence d'un codon d'initiation Met dans les trois clones (G1, G2 et G3) remplit les critères généraux d'un gène classique.

L'amplification par PCR de plusieurs bandes de différentes tailles à partir de l'ADN génomique, en utilisant des amorces spécifiques au fragment contenant *as-epicut1*, nous fait

suggérer la présence de multiples gènes d'as-epicut1. La détection de trois bandes positives après hybridation avec la sonde P3-biot renforce cette hypothèse. Il est probable que les bandes de tailles différentes correspondent à des variations dans le nombre de régions répétitives. Le clone G3 possède 8 régions répétitives et la bande 1970 pb correspond probablement à celle du clone G2 qui contient 7 régions répétitives.

Toutes ces données supportent l'idée que le gène as-epicut1 pourrait être présent en plusieurs copies dans le génome et que les messagers isolés de la librairie d'ADNc pourraient être issus de gènes d'as-epicut1 différents. Les études génétiques des collagènes chez les nématodes démontrent que plusieurs gènes codant pour des collagènes cuticulaires sont présents en multiples copies dans le génome. La plupart des études concernant les groupes de gènes des collagènes cuticulaires se sont concentrées sur *C.elegans*. Par exemple une paire des gènes identiques *col-12* et *col-13* se suivent en tandem sur le même chromosome de *C.elegans* (Park et Kramer, 1990). Cette duplication a été trouvée aussi chez le nématode parasitaire *Ostertagia circumcincta*, chez lequel deux gènes des collagènes homologues aux *col-12* et *col-13* ont été identifiés et nommés *colost-1* et *colost-2* (Johnstone et al, 1996). Ainsi, la présence d'autres familles de gènes codant pour des molécules cuticulaires est probable. Les deux séquences homologues à as-epicut1, trouvées dans le génome de *C.elegans* (clones K08D12 et Y104H12), sont des arguments supplémentaires en faveur de la présence des gènes multiples chez les nématodes.

Dû à l'importance de ce point, un travail concernant l'organisation des gènes codant pour la cuticuline de *C.elegans* doit être réalisé pour vérifier les hypothèses proposées.

Les mécanismes de l'épissage différentiel, de trans- et de cis-épissage sont bien mentionnés dans plusieurs études concernant les modifications post-transcriptionnelles des messagers des collagènes cuticulaires. Chez *C.elegans* 25% des gènes sont organisés en opérons. Les transcrits polycistroniques sont convertis en messagers monocistroniques par une coupure accompagnée d'une poly- adenylation à l'extrémité 3', et par un trans-épissage à l'extrémité 5' avec l'addition d'un exon 5' non codant, nommé "spliced leaders ou SLs" (Ross et al, 1995). Les extrémités 5' des messagers dans les opérons contiennent des accepteurs de trans-épissage pour plusieurs spliced leaders (Figure 16). Ces nouveaux SLs de 22-23 nucléotides sont issus

d'ARN spécifiques, dans lesquels ces séquences sont suivies par un donneur d'épissage "splicing donor" conservé, puis par des séquences qui sont essentielles pour les réactions de trans-épissage (Kimberly et Joel, 1999).

Par comparaison entre les clones d'ADNc et les clones génomiques, on constate que l'extrémité 5' formée de 901 pb dans les inserts des clones génomiques, a été remplacée par une autre petite séquence dans les clones d'ADNc. Le fragment de 901 pb, qui n'existe pas dans les transcrits, se termine avec un accepteur d'épissage dans les clones génomiques (Figure 15). Ce fait indique la présence d'un phénomène du trans-épissage à ce niveau. Ce qui est remarquable dans ce cas, c'est que l'épissage ne se déroule pas à proximité du codon d'initiation comme il a été mentionné dans la plupart des cas (Bektesh et al, 1988). Si la traduction des messagers matures trans-épissés commence avec la première Met par exemple dans le site 1138 du clone G3 (Figure 10), la protéine prédite perd les premiers 143 acides aminés. Ce qui rend la protéine prédite du clone G3 à 327 aa au lieu de 470 aa. Il reste à noter que la présence du signal accepteur d'épissage dans les autres fragments génomiques dans les clones G1 et G2 peut conduire aussi à des messagers matures trans-épissés avec des tailles plus courtes que celles du gène du clone G3 sur le génome (Table 5). Dû à l'absence de la partie 5' (au-delà de la région du trans-épissage) dans les messagers des clones d'ADNc (Figure 14), il est très probable que ces messagers sont trans-épissés.

Chez *A.suum*, la présence d'un épissage différentiel a été mise en évidence par plusieurs chercheurs. Par exemple, Huang et al (1999) ont montré que les trois formes des récepteurs de la sérotonine (AS1 exprimé dans le pharynx, AS2 et AS3 exprimés dans les muscles) d'*A.suum*, sont issus d'un même messager et que les différences entre ces isoformes sont produites par épissage différentiel. Ces données rendent la théorie de l'implication de l'épissage différentiel dans la production des messagers d'*as-epicut1* avec un nombre des régions répétitives différent d'un clone à un autre plus valable. Il faut rappeler que cette théorie a été basée sur les résultats d'étude des clones d'ADNc. Les résultats obtenus dans cette étude concernant l'*as-epicut1* directement dans le génome, et surtout le résultat de la PCR à partir de l'ADN génomique qui montre plusieurs bandes sur le gel reconnues par une sonde d'une séquence interne d'*as-epicut1*, indiquent la présence de multiples copies d'*as-epicut1* dans le génome. Cette supposition peut aussi être renforcée par l'analyse de

l'alignement des séquences as-epicut1 entre les divers clones d'ADNc et d'ADN génomique analysés (Figure 14). Cet alignement montre la présence des variations d'un clone à un autre dont le nombre est important entre certains clones mais faible entre certains d'autres. Nos récents résultats rendent l'analyse précédant plus claire et supportent l'idée que le gène as-epicut1 pourrait être présent plusieurs fois dans le génome. Ces données sont complémentaires à l'autre possibilité concernant l'épissage différentiel qui pourrait aussi intervenir dans la phase post-transcriptionnelle en fabriquant des messagers des longueurs différentes, et par conséquent, des protéines avec des masses moléculaires différentes.

Malgré toutes ces clarifications, l'origine de la petite séquence X, qui remplace la région 5' du fragment génomique dans les messagers, reste inconnue. Cette petite séquence n'a pas de similarités avec les "spliced leaders" connus jusqu'aujourd'hui (Ross et al, 1995; Ferguson et Rothman, 1999). Nos résultats démontrent que chez *A.suum* d'autres "spliced leaders" pourraient exister à côté de SL1 (qui est commun à *C.elegans* et *A.suum*).

Le résultat global des trois clones G1, G2 et G3 montre la présence d'un codon Met à une distance de 191 nucléotides de l'extrémité 5' au-delà de la première région répétitive. Ainsi, la séquence codante d'as-epicut1 a été complétée avec un codon d'initiation ou ORF-start. En plus, ces fragments génomiques contiennent une région 5' non codante qui pourrait être le ou une partie du promoteur, ou bien ce fragment 5' peut être l'exon délété par trans-épissage.

Les valeurs de masses moléculaires des protéines prédites de tous les clones génomiques analysés dépendent de plusieurs facteurs comme le trans-épissage, le site du codon d'initiation, la possibilité de copies multiples du gène as-epicut1 avec un nombre variable de régions répétitives, et la possibilité de l'épissage différentiel post-transcriptionnel (Table 5).

La valeur de la masse moléculaire la plus élevée calculée pour AS-EPICUT1 est celle de la protéine prédite du clone G3 qui varie entre 33 et 48 kD, et la plus faible est celle du clone G1 qui varie entre 17 et 33 kD. D'un autre côté, Bisoffi et Betschart (1996) ont déterminé à l'aide d'anticorps anti-cuticuline une masse autour de 40 kD. Par voie immunologique, une autre étude non publiée de Marti et Betschart (1991) a montré une masse de 67 kD dans l'extrait d'hypoderme d'*A.suum*. La comparaison de ces données avec les nôtres indiquent que le résultat de Bisoffi se conforme au calcul de la masse moléculaire d'AS-EPICUT1 (40 kD) d'un

messenger trans-épissé du clone G3, mais pas à partir du premier codon méthionine du messenger trans-épissé qui peut baisser cette valeur à 33 kD. Par contre, par comparaison avec les données de Marti et Betschart (1991), on suppose que la protéine détectée de 67 kD pourrait être le résultat d'une polymérisation de deux molécules de 33 kD. Ces molécules de 33 kD peuvent être produites des messagers trans-épissés à partir d'as-epicut1 du clone G3 dont la traduction commence au premier codon Met.

La polymérisation entre les différents résidus de la cuticule a été démontrée dans plusieurs études. La cuticule de tous les nématodes est formée des ponts entre les protéines des collagènes, et les gènes codant ces protéines ont été étudiés largement chez les nématodes en général (Cox, 1992), chez le nématode libre *C.elegans* (Cox, 1985) et les nématodes parasites (Shamanski et al, 1989; Cox, 1990; Kingston et al, 1989; Kingston et Pettit, 1990). A côté des collagènes, les protéines insolubles de la cuticule montrent une résistance et une rigidité encore plus importantes. La composition et la structure par diffraction de rayon X de ces protéines préparées de la cuticule d'*A.suum*, montrent qu'elles sont différentes des collagènes et sont formées d'un mélange de molécules liées entre elles par des ponts (Fujimoto et Kanaya, 1973). Les études de cuticules préparées de *C.elegans* de différents stades démontrent que les composants insolubles sont plus abondants dans la cuticule des dauers que dans celles des autres stades (Cox et al, 1981). D'après ces études, les cuticulines contribuent à la résistance et à l'imperméabilité de la cuticule, et la "dauer larvae" possède une cuticule plus épaisse et plus forte qui rend la surface plus résistante à la dessiccation et à différents agents chimiques. Plusieurs chercheurs ont étudié les mécanismes biochimiques impliqués dans la formation de cette cuticuline insoluble, et ils suggèrent que les ponts formés de liaisons des dityrosines jouent le rôle essentiel. Des liaisons di- tri- et iso-tri-tyrosines ont été détectées dans la cuticule de différents nématodes comme *Ascaris* (Fujimoto et al, 1981) et *Haemonchus contortus* (Fetterer et Roads, 1990). Nos données nous font suggérer que les protéines synthétisées à partir des différents gènes d'as-epicut1 pourraient avoir des structures primaires avec de tailles différentes. Il est possible que ces différents résidus d'AS-EPICUT1 se lient entre eux par des liaisons di- ou tri-tyrosines pour former le composant insoluble de l'épicuticule. Ces liaisons di- ou tri-tyrosines pourraient expliquer la détection, par western blot avec des anticorps anti-cuticuline, dans des extraits de l'hypoderme des masses

moléculaires différant de 40 et 67 kD (Bisoffi et Betschart, 1996; Marti et Betschart, 1991). Il semble que la présence de 2-3 molécules de tyrosines par région répétitive permet une polymérisation accrue entre des diverses molécules d'AS-EPICUT1. Des molécules d'AS-EPICUT1 démontrent en plus une forte tendance à la polymérisation (Betschart, communication personnelle). Il est aussi possible que les résidus d'AS-EPICUT1 soient liés par l'intermédiaire de tyrosines avec d'autres protéines, par exemple avec des résidus de CUT-2 dans la zone interne de l'épicuticule. Cette théorie se base sur les données de Lassandro et al (1994) qui démontrent que les résidus CUT-2 peuvent former des polymères par des liaisons croisées de dityrosines. Vu que nos résultats démontrent qu'AS-EPICUT1 est plus riche en tyrosine que les autres protéines insolubles de la cuticule connues aujourd'hui comme CUT-1 et CUT-2, il semble que les liaisons croisées de dityrosines sont essentielles dans la structure intramoléculaire d'AS-EPICUT1. Ainsi, les liaisons di-tyrosines inter-moléculaires pourraient être essentielles pour l'assemblage de différentes protéines d'une même origine comme (AS-EPICUT1)-(AS-EPICUT1), ou d'origines différentes comme (AS-EPICUT1)-(CUT-2) ou (AS-EPICUT1)-collagènes. D'après cette hypothèse, les liaisons croisées des di- ou tri-tyrosines d'AS-EPICUT1 seraient impliquées dans la construction d'une surface insoluble et résistante aux divers agents mécaniques et chimiques.

Enfin, le(s) gène(s) *as-epicut1* a (ont) été déterminé(s) avec toutes ses (leurs) caractéristiques essentielles, un codon d'initiation "ORF-start", un codon de terminaison, la protéine prédite et les constituants biochimiques.

Les études génétiques d'*as-epicut1* forment une base pour les études biochimiques, immunologiques et moléculaires concernant la surface des nématodes. L'expression de la protéine AS-EPICUT1 et la production d'anticorps polyclonaux anti-cuticuline pourraient révéler la présence d'épitopes à la surface de diverses espèces comme *C.elegans*, *O.volvulus* etc...

Bibliographie

- Bektesh, S., Van Doren, K., and Hirsh, D. (1988) Presence of the *Caenorhabditis elegans* spliced leader on different mRNAs and in different genera of nematodes. *Genes and Development* 2, 1277-1283
- Bird, A.F., and Bird, J. (1991) The structure of nematodes, pp 44-77. Academic Press, San Diego.
- Bisoffi, M., Betschart, B. (1996) Repetitive peptide motifs in the cuticlin of *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80, 55-64
- Cox, G.N., Strapans, S. and Edgar, R. S. (1981) The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. II. Stage-specific changes in Ultrastructure and Protein Composition during Postembryonic Development. *Developmental Biology* 86, 456-470
- Cox, N. G. (1985) Genetic mapping of *Caenorhabditis elegans* collagen genes using DNA polymorphisms as phenotypic markers. *Genetics* 109, 513-528
- Cox, N.G.,(1990) Molecular biology of the cuticle collagen gene families of *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. *Acta Tropica* 47, 269-281
- Cox, N. (1992) Molecular and Biochemical aspects of nematode collagens. *Journal of parasitology* 78(1), 1-15
- De Giorgi, C., De Luca, F., Di Vito, M., Lamberti, F. (1997) Modulation of expression at the level of splicing of cut-1 RNA in the infective second-stage juvenile of the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Molecular and General Genetics* 253, 589-598

- Favre, R., Cermola, M., Nunes, C. P., Hermann, R., Müller, M., and Bazzicalupo P. (1998) Immuno-Cross-Reactivity of CUT-1 and cuticlin epitopes between *Ascaris lumbricooides*, *Caenorhabditis elegans*, and *Heterorhabditis*. *Journal of Structural Biology* 123, 1-7
- Ferguson K.C., Rothman J.H. (1999) Alterations in the conserved SL1 *trans* -spliced leader of *Caenorhabditis elegans* demonstrate flexibility in length and sequence requirements in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 19(3), 1892-1900
- Fetterer, R.H., Roads, M.L. (1990) tyrosine derived cross-linking amino acids in the sheath of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of parasitology* 76, 619-624
- Fujimoto, D., and Kanaya S. (1973) Cuticlin: A noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 157, 1-6
- Fujimoto, D., Hortiuchi, K., and HIRAMA, M. (1981) Isotrityrosine, a new crosslinking amino acid isolated from *Ascaris* cuticle collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 99, 617-623
- Huang, X., Duran, E., Diaz, F., Xiao, H., Messer, WS.Jr., Komuniecki, R. (1999) Alternative-splicing of serotonin receptor isoforms in the pharynx and muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 101(1-2), 95-106
- Johnstone, I. L., Schafi, Y., Majeed, A., Barry, D. (1996) Cuticular collagen genes from the parasitic nematode *Ostertagia circumcincta*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80: 103-112
- Lassandro, F., Sebastiano, M., Zei F., Bazzicalupo, P. (1994) The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 65, 147-159

- LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L., and Beverly, S. M. (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes and Development* 7(6), 996-1007
- Lewis, E., Hunter, S. J., Tetley L., Nunes, C. P., Bazzicalupo, P., Devaney E. (1999) cut-1-like genes are present in the filarial nematodes, *Brugia pahangi* and *Brugia malayi*, and , as in other nematodes, code for components of the cuticle. *Molecular and Biochemical Parasitology* 101, 173-183
- Kimberly, C. F., and Joel, H. R. (1999) Alterations in the conserved SL1 *trans* -spliced Leader of *Caenorhabditis elegans* demonstrated flexibility in length and sequence requirements in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 19(3), 1892-1900
- Kingston I. B., Wainwright, S. M., and Cooper, D. (1989) Comparison of collagen gene sequences in *Ascaris suum* and *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 37, 137-146
- Kingston, I. B., and Pettit, J. (1990) Structure and expression of *Ascaris suum* collagen genes. *Acta Tropica* 47, 283-287
- Marti S. (1991) Biochemische und immunologische charakterisierung von cuticlin, einem strukturprotein aus der kutikula von *Ascaris suum*. Thesis, Basel.
- Matthews, K. R., Tschudi, C., and Ullu, E. (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes and Development* 8(4),491-501
- Park, Y.S. and Kramer, J.M (1990) Tandemly duplicated *Caenorhabditis elegans* collagen genes differ in their modes of splicing. *Journal of Molecular Biology* 211, 395-406.

- Ristoratore, F., Cermola, M., Nola, M., Bazzicalupo, P., and Favre, R. (1994) Ultrastructural immuno-localization of CUT-1 and CUT-2 antigenic sites in the cuticles of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 26(3), 437-443
- Ross, L. H., Freedman, J. H., and Rubin, C. S. (1995) Structure and expression of novel spliced leader RNA genes in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 22066-22075
- Sebastiano, M., Lassandro, F., and Bazzicalupo, P. (1991) cut-1 a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a Dauer-specific noncollagenous component of the cuticle. *Developmental Biology* 146, 001-0012
- Shamansky L. M., Pratt, D., Boisvenue, R. J., and Cox, G. N. (1989) Cuticle collagen genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* are highly conserved. *Molecular and Biochemical Parasitology* 37, 73-86
- Spieth, J., Brooke, G., Kuersten, S., Lea, K., and Blumenthal, T. (1993) Operons in *C.elegans* : polycistronic mRNA precursors are processed by *trans* -splicing of SL2 to downstream coding regions. *Cell* 73, 521-532
- Timinouni, M., Bazzicalupo, P. (1997) cut-1-like genes of *Ascaris lumbricooides*. *Gene* 193, 81-87

Chapitre V

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

L'exosquelette ou cuticule des nématodes est l'une des structures les plus complexes synthétisées par les organismes vivants (Lee, 1966; Lee, 1977; Bird, 1971; Lumsden, 1975; Edgar et al, 1982; Inglis, 1983; Wright, 1987; Betschart et al, 1990). Les composants de la cuticule sont synthétisés par les cellules hypodermiques et transportés dans la cuticule, où ils constituent par des ponts intermoléculaires un complexe extracellulaire formé de plusieurs couches (Bird et Bird, 1991). La surface structurelle externe de la cuticule nommée épicuticule (Fujimoto et Kanaya, 1973) est formée de lipides (Proudfoot et al, 1991) et de cuticulines (Fujimoto et Kanaya, 1973; Betschart et Jenkins, 1987). Cette surface est hautement insoluble en présence de ME ou d'agents dénaturants (Fujimoto et Kanaya, 1973; Marti, 1991). Des molécules non-structurelles antigéniques dominées par des glycoprotéines, sécrétées et excrétées par la cuticule, se trouvent localisées sur la surface externe de l'épicuticule "surface associated antigens" (Parkhouse et al, 1981; Maizels et al, 1983a et 1983b; Maizels et al, 1984; Maizels et Silkirk, 1988; Maizels et Page, 1990; Storey and Philipp, 1992; McReynolds, 1993; Rao, 1999). Ces molécules sont transportées à l'extérieur par des pores excrétrices et par l'œsophage (Maizels et Silkirk, 1988, Bird et Bird, 1991).

Les antigènes associés à la surface et l'épicuticule construisent la région exposée directement au système immunitaire. Contrairement à l'épicuticule qui forme une structure inaccessible aux anticorps (Parkhouse et al, 1981; Ortega-pierres et al, 1984; Devany et al, 1988; Betschart et al, 1990), les molécules associées à la surface possède un pouvoir antigénique très élevé (Maizels et Page, 1990; Rao et al, 1999).

Cette thèse a consisté à étudier la surface exposée des nématodes (1) au niveau des substances sécrétées et excrétées (E/S) et (2) au niveau des protéines structurales de l'épicuticule.

1. La chitinase

Parmi les substances E/S, la chitinase sécrétée par les filaires parasitaires a été identifiée au cours de ces dernières années comme ayant un potentiel antigénique élevé (Lucius et al, 1991; Adam et al, 1996; Wang et al, 1997, Harrison et al, 1999). Son rôle dans la survie et le

développement des parasites dans les conditions dictées par leur hôte a été discuté. L'activité chitinolytique a été examinée au cours de cette thèse (chapitre II) chez un nématode libre. Pour la première fois, l'activité chitinolytique a été détectée chez *C.elegans* et elle a été mesurée dans tous les stades de développement. Par réactions croisées avec des anticorps monoclonaux préparés contre L3 d'*A.viteae* (Adam et al, 1996), des épitopes ont été détectés au stade L3 et dans le surnageant de la mue de L3 en L4 de *C.elegans*, indiquant la présence d'épitopes de chitinase communes aux espèces parasitaires et à *C.elegans*.

1.1 Détection d'une activité chitinolytique au cours du cycle de Caenorhabditis elegans.

La plupart des études effectuées sur la chitinase chez les nématodes ont été concentrées sur les stades larvaires infectieux. Le rôle de la chitinase a été lié à l'infection, à l'interaction parasite-hôte et au développement, mais seulement dans certains stades (Lucius et al, 1991, Adam, et al, 1996, Fuhrman et al, 1992). Le choix d'un nématode libre, comme *C.elegans*, a montré que l'activité chitinolytique est présente pendant tous les stades larvaires et chez l'adulte grvide sans lien avec le parasitisme (chapitre II). Plusieurs chercheurs ont proposé *C.elegans* comme modèle pour étudier les espèces parasitaires parce que ce nématode peut former une référence pour mesurer les adaptations liées au parasitisme (Politz et Philipp, 1992; Lewis et al, 1999). Ces concepts nous font supposer que les études de l'activité enzymatique au cours du cycle pourraient être comparables entre *C.elegans* et les espèces parasitaires, mais avec certaines différences dues au mode de vie et à l'environnement de chaque espèce.

C.elegans a permis l'étude de l'activité chitinolytique de tous les stades du cycle. L'activité la plus élevée a été trouvée pendant le passage de l'œuf à L1, puis le taux de cette activité diminue progressivement dans les stades larvaires suivants. L'activité chitinolytique s'est révélée négligeable dans l'extrait protéinique des jeunes adultes, mais elle commence à augmenter progressivement à partir des adultes gravides pour devenir relativement importante pendant la ponte. Ainsi, il semble que l'expression des enzymes chitinolytiques actifs n'est pas limitée seulement à certains stades infectieux, à la dégradation de la paroi de l'œuf ou à la dégradation de la gaine membranaire des microfilaires, mais ces enzymes semblent jouer un rôle dans le développement de tous les stades.

1.2. Discussion du rôle de la chitinase chez les filaires parasites et *C.elegans* au cours du cycle

Le rôle des chitinases chez les nématodes parasites a été analysé seulement dans certains stades de développement. La chitine est présente exclusivement dans la paroi de l'œuf, et le rôle de la chitinase dans l'hydrolyse de la structure chitineuse de cette paroi a été décrit (Brydon et al, 1987; Gooday et al, 1988). Les stades L1 et L3 qui représentent des stades infectieux pour les arthropodes et les vertébrés représentent les stades larvaires analysés (Lucius et al, 1991; Fuhrman et al, 1992, 1995; Adam et al, 1996; Harrison et al, 1999; Wang et al, 1999). Par contre, l'expression des enzymes chitinolytiques dans les autres stades du cycle L2, L4 et adultes jeunes n'a pas été analysée. Le manque de données concernant les chitinases à ces stades pourrait être dû à la difficulté d'obtenir du matériel parasite aux différents stades ou parce que le rôle de la chitinase avait été toujours lié à l'infection chez les autres parasites étudiés comme *Plasmodium* (Huber et al, 1991) et *Leishmania* (Sieber et al, 1991). Des études supplémentaires des autres stades de développement chez les nématodes parasites seront intéressantes à réaliser.

Dans le cas de certaines espèces parasites avec un passage intermédiaire à travers d'un insecte, il est logique de penser que la chitinase des nématodes est impliquée dans la destruction des structures chitineuses du vecteur. Un rôle de la chitinase parasite dans la destruction de la membrane péritrophique de l'insecte ne peut pas être soutenu pour les microfilaires de *Brugia*. Vu l'absence de membrane péritrophique, la chitinase des microfilaires de *Brugia* n'est pas exprimée pour assurer leur transmission à travers les moustiques mais pour assumer une autre fonction physiologique (Fuhrman et al, 1992). Les femelles de *Brugia* ssp produisent des microfilaires avec une gaine membranaire qui représente la paroi de l'œuf sous forme modifiée (Rogers et al, 1976). Les microfilaires gardent la gaine membranaire pendant leur circulation dans le sang des vertébrés, mais elles la perdent pendant la phase initiale de leur développement dans l'arthropode. La destruction de cette gaine est nécessaire pour les mues successives et le développement des larves dans le vecteur. De la chitine a été trouvée dans les femelles gravides de *B.malayi* mais pas chez le mâle (Fuhrman et Piessens, 1985). Les femelles en présence du diflubenzuron (un inhibiteur puissant de la synthèse de chitine) produisent des microfilaires avec une gaine membranaire incomplète, ce qui indique

que la synthèse de chitine est un facteur essentiel dans la morphogénèse des microfilaires (Fuhrman et Piessens, 1985). Dans ce cas, il semble très clair que la chitinase est essentielle pour la destruction de la structure chitineuse de la gaine membranaire des microfilaires pendant leur mue et que l'expression de la chitinase pendant cette période est plutôt liée au développement qu'à l'infection dans le vecteur. Ces données supportent notre résultat qui montre que l'activité chitinolytique est intense pendant la destruction de la paroi de l'œuf (œuf-L1). Parmi les adultes, les jeunes ont montré une activité chitinolytique très négligeable. Cette activité commence à augmenter dès la phase initiale de l'embryogénèse chez les hermaphrodites gravides pour atteindre un taux élevé pendant l'éclosion. L'activité chitinolytique pendant le début de la formation de l'œuf pourrait s'expliquer par l'implication possible de certains enzymes chitinolytiques dans la régulation du taux de chitine dans la paroi de l'œuf comme proposé par Gooday et ses collaborateurs (1988).

Chez les nématodes parasitaires, la plupart des auteurs ont lié la chitinase à la période d'infection du vecteur ou des vertébrés. La chitinase pourrait être impliquée dans la pénétration de la larve infectieuse à travers la peau de l'hôte sans qu'on connaisse exactement la nature du substrat approprié pendant cette période. Adam et al (1996) ont suggéré que la chitinase exprimée pendant la période de développement des L3 d'*A.viteae* pourrait avoir d'autres substrats que la chitine. L'enzyme est excrété dans le milieu de culture immédiatement après que les larves ont été mises dans des conditions ressemblant à celles dans l'hôte vertébré pendant la migration des larves L3 à travers les tissus (Adam et al, 1996). La suggestion que la chitinase exportée pourrait aider la dégradation des tissus de l'hôte semble raisonnable bien que des substrats appropriés n'aient pas été identifiés jusqu'à présent. Des molécules homologues à la chitinase ont été trouvées récemment dans les cartilages et les oviductes des vertébrés (Renkema et al, 1995, 1997 et 1998 ; DeSouza et Murray, 1995; Hakala et al, 1993; Sendai et al, 1994). Si les chitinases chez les vertébrés pouvaient intervenir dans la dégradation des structures extracellulaires dans certaines conditions d'inflammation et de dégénération (Renkema et al, 1995, 1997 et 1998), il serait aussi possible que la chitinase parasitaire remplisse des fonctions homologues au niveau de la peau pendant l'infection.

Vu que la chitinase de L3 exprimée pendant la mue d'*A.viteae* possède des épitopes en commun avec l'extrait de L3 de *C.elegans*, il est possible que la chitinase exprimée pendant

cette phase de réorganisation de la cuticule, pourrait aussi intervenir pendant la mue. Cette hypothèse se base sur les données de Rhoads et Fetterer (1994) qui démontrent la présence de molécules de chitotriosides dans la cuticule de *Haemonchus contortus*. Ce résultat indique que les constituants de la chitine sont des composants structuraux de la cuticule de certains nématodes et que la chitinase de L3 est spécifique à la dégradation de ces oligomères de chitotriosides ou à leur réarrangement pendant la phase de la mue. Il est aussi possible que des oligomères de chitotriosides se trouvent dans les cuticules des autres stades comme L2 et L4. Nos résultats qui prouvent la présence d'une activité chitinolytique dans tous les stades larvaires de *C.elegans* indiquent que les enzymes chitinolytiques pourraient être impliquées dans le mécanisme de la mue de tous les stades larvaires.

Les stades larvaires de *C.elegans* ont montré un taux d'activité chitinolytique différent d'un stade à un autre. Cette différence du niveau chitinolytique pourrait être due à des différences dans les composants cuticulaires d'un stade à un autre (Bird et Bird, 1991; Wright, 1987). D'après ces hypothèses, il semble intéressant de détecter et de mesurer le taux de molécules de chitotrioside dans les cuticules de tous les stades larvaires. Par suite, il serait intéressant d'établir une liaison entre le taux de ces molécules et le taux des enzymes chitinolytiques à chaque stade, surtout pendant les mues.

Au cours de cette étude (chapitre II), il est devenu clair que l'activité chitinolytique peut s'exprimer aux différents stades de *C.elegans*, mais il n'est pas clair à quel degré ces résultats peuvent être appliqués aux nématodes parasites.

1.3. Les aspects immunologiques de la chitinase chez les filaires parasites

Les aspects immunologiques de la chitinase sont très importants. Plusieurs chercheurs sont intéressés à ces aspects chez les filaires comme *B.malayi*, *O.volvulus* et *W.bancrofti*. Ces filaires sont responsables de la cécité des rivières et de la filariose lymphatique qui touchent plus de 100 millions de personnes dans les régions tropicales (WHO, 1992). L'infection de l'homme se produit par des arthropodes infectés. Il est évident que certaines personnes développent une immunité naturelle parce que ces individus ne sont pas touchés par la filariose malgré le niveau élevé de transmission locale (Elson et al, 1994; Freedman et al, 1989). La réponse immunitaire humorale reconnaît d'une façon différente les antigènes des larves L3

(Nutman et al, 1991). Il a été supposé que la vaccination avec ces antigènes pourrait bloquer l'infection. Chez un modèle animal, la vaccination avec des larves L3 atténuées par irradiation s'est révélée comme le meilleur chemin pour obtenir une immunité protectrice (Philipp et al, 1988). L'immunisation des mériens avec des larves L3 d'*A.viteae* atténuées par irradiation induit plus de 90 % de protection contre une infection ultérieure (Lucius et al, 1991). Le sérum des animaux vaccinés avec des larves L3 d'*A.viteae* reconnaissent un nombre faible de protéines parmi lesquelles la chitinase de L3 d'*A.viteae* était l'antigène dominant reconnu par la réponse humorale chez les mériens protégés (Adam et al, 1996). Chez les mériens vaccinés avec une chitinase recombinante, une protection partielle contre une infection par *B.malayi* a été obtenue, mais cette protection ne réduit pas le charge de nématodes adultes (Wang et al, 1997). La vaccination était moins efficace lorsqu'elle était administrée pendant la phase pre-infectieuse, et inefficace chez les mériens déjà microfilarémiques. L'épitope protecteur de la chitinase semble localisé à l'extrémité C-terminale de la molécule (Wang et al, 1997). La vaccination avec un autre antigène de surface SXP1, présent dans différents stades de *B.malayi*, réduit aussi la microfilarémie, et aussi dans certaines expériences le charge de nématodes adultes (Wang et al, 1997). La protection partielle induite par la chitinase recombinante de L3, agit contre une infection ultérieure, mais cette vaccination n'a pas d'effet contre la charge de nématodes adultes déjà établis de *B.malayi* (Wang et al, 1997). Ceci pourrait être dû à l'absence d'épitopes de la chitinase de L3 chez les adultes. Récemment, les études de Wang et ses collaborateurs (1999) indiquent que la chitinase recombinante représente un antigène idéal pour la détection de filarioses occultes ou lymphatiques à partir d'échantillons de sang des résidents des régions endémiques.

Les résultats des autres études immunologiques concernant les réponses inflammatoires primaires contre la chitinase se révèlent différentes de celles des réponses humorales. L'importance d'un antigène particulier dans ces réponses inflammatoires n'avait pas été encore déterminée avant l'expérience de Rao et al (1999). La réponse inflammatoire des mériens infectés avec *Brugia* augmente rapidement pendant l'infection primaire puis diminue pendant l'aggravation de la maladie, et ceci est dû au nombre de coagulations lymphatiques présentes dans leurs vaisseaux. Les réactions d'hypersensibilité spécifique de ces animaux se mesurent par la réponse pulmonaire inflammatoire granulomateuse (PGRN), induite par les antigènes

somatiques des nématodes adultes (SAWA) et par la prolifération des cellules des nodules lymphatiques rénaux. La cinétique de ces réponses correspond à la formation de lésions lymphatiques. Rao et ses collaborateurs (1999) ont utilisé la PGRN pour mesurer la réponse immunitaire cellulaire à quatre protéines recombinantes au cours de l'infection primaire de *B.pahangi*. Ces protéines sont la BpL4, la glycoprotéine (glutathione peroxydase) gp29, la "heat shock protein" (hsp) 70, et la chitinase des filaires. La PRGN a été mesurée les jours 14, 28, 56, et > 150 après l'infection (PI) chez des mériens infectés, des mériens sensibilisés avec SAWA, et des mériens non infectés. La protéine homologue à gp29 est la seule protéine testée qui a induit, le 28ème jour après l'infection, une réponse PGRN significativement plus forte que celle du contrôle. Ces résultats indiquent que la gp29 pourrait être une partie du complexe antigénique qui induit la réponse inflammatoire primaire. En revanche, ces résultats n'indiquent pas que les autres protéines recombinantes testées, dont la chitinase, ne sont pas antigéniques pour la réponse inflammatoire primaire (Rao et al, 1999). Ces protéines nécessitent probablement un changement dans la nature et la sensibilité du test utilisé, et une détermination des conditions de test qui correspondent le mieux aux avec les caractéristiques de chaque protéine.

Adam et al (1996) supposent que différentes chitinases peuvent exister chez une seule espèce de nématode et que l'expression d'une chitinase donnée est spécifique à des stades bien déterminés et dans des conditions bien définies dans cette espèce. Une autre observation issue de notre travail sur *C.elegans* en faveur de cette hypothèse est représentée par les résultats des réactions croisées. L'anticorps monoclonal mAb 2H2, anti-chitinase de L3 d'*A.viteae* (Adam et al, 1996), testé sur des extraits de L1, L2, et L3 de *C.elegans*, a reconnu seulement une bande de 60 kD dans l'extrait de L3, mais pas dans les autres stades testés. L'autre monoclonal mAb 24-4 d'*A.viteae* a reconnu seulement une bande de 60 kD dans les surnageants contenant les produits de la mue de L3 et pas dans les extraits protéiques de différents stades de *C.elegans* (chapitre II). Donc, bien que l'activité chitinolytique soit détectée dans tous les stades de *C.elegans*, les épitopes de la chitinase présents dans un stade et dans des conditions déterminées comme la mue, ne sont pas présents dans d'autres stades et dans d'autres conditions, par exemple avant ou après la mue.

La comparaison de l'activité chitinolytique de *C.elegans* à différents stades et les données d'Adam (1996) qui indiquent que la chitinase est exprimée seulement chez les microfilaires et les larves L3, révèle une distinction importante à mentionner. Si l'activité chitinolytique trouvée dans les larves L4 de *C.elegans* n'est pas due à une activité de lysozymes, il semble que les anticorps monoclonaux contre la chitinase de L3 d'*A.viteae* n'ont pas reconnus d'épitopes chez les larves L4 d'*A.viteae* (Adam et al, 1996) parce que les chitinases de L4 d'*A.viteae* sont différentes de celles de L3 et non pas parce qu'elles sont absentes.

A côté des études immunologiques sur *Brugia ssp* et *A.viteae*, d'autres études concernant la capacité antigénique de la chitinase d'*Onchocerca volvulus* ont été réalisées. L'ADNc de la chitinase d'*O.volvulus* spécifique au stade infectieux L3 (Wu et al, 1996) a été cloné dans un plasmide d'expression eucaryotique (pJW4303) et utilisé pour vacciner des souris par immunisation par ADN avec "Accel GeneGun" (Harrison et al, 1999). La survie des larves infectieuses au cours de l'infection ultérieure a été contrôlée par l'utilisation de chambres à micropores implantées. Pendant le premier essai, les souris qui ont été immunisées 3 fois pendant 4 mois avec 1 µg d'ADN codant la chitinase d'*O.volvulus*, ont répondu par des réponses d'anticorps modestes, dominées par IgG2a. Cette réponse immunitaire du premier essai a causé une réduction des parasites de 36 % en comparaison avec le contrôle. Pendant le deuxième essai, l'administration d'une dose d'ADN plus élevée (5 µg) avec un nombre plus élevé d'immunisations (5 fois pendant 6 mois), a stimulé une réponse immunitaire humorale dominée par IgG1, et une réduction des parasites de 53 % (Harrison et al, 1999). Les anticorps des souris vaccinées réagissent avec la cuticule des larves L3 en phase post-infectieuse. Ces observations indiquent que la cuticule représente le site de l'attaque immunitaire pendant la sécrétion de la chitinase.

D'après cette dernière étude, il semble que la chitinase peut induire une protection partielle chez les souris et que le niveau de cette protection dépend de la dose, de la fréquence, et de la période d'administration (Harrison et al, 1999).

1.4. Perspectives

Vue la capacité antigénique de la chitinase et la présence de cet enzyme chez les différentes espèces des nématodes, une détermination plus complète de sa capacité antigénique chez les nématodes parasitaires est en cours chez plusieurs chercheurs. Notre étude a montré, pour la première fois, la présence d'une activité chitinolytique dans tous les stades de développement, ce qui montre que cette activité n'est pas limitée à certains stades.

Afin de révéler l'importance de son rôle au cours du cycle, une inhibition de la chitinase à chaque stade du cycle pourrait se réaliser en utilisant aussi *C.elegans* qui représente un modèle facile à maintenir dans le laboratoire. L'existence possible de différentes chitinases chez *C.elegans* (Hodgkin et al, 1998) indique que la détermination de la spécificité et du rôle de chaque chitinase à chaque stade est très difficile. Il serait plus facile d'inhiber les chitinases en général à chaque stade et cette inhibition peut s'effectuer par voie chimique ou génétique.

Pour inhiber la chitinase par voie chimique il est possible d'utiliser l'allosamidine dans le milieu de culture. L'allosamidine est formé d'un dimère de -N-acetylallosamine lié à un diméthylaminocyclitol (Sakuda et al, 1986). Cette molécule a montré une inhibition puissante pour une variété de chitinases de la famille 18 des glycanohydrolases. L'allosamidine a montré une bonne activité inhibitrice dans les études réalisées sur plusieurs organismes, *Streptomyces griseus* (Bactérie), *Artenia salina* (crustacé), et *Chironomus tentans* (insecte) (Spindler et Spindler-Barth, 1994). Par son activité inhibitrice sur la chitinase, l'allosamidine a la capacité de bloquer la transmission de *Plasmodium* à travers la membrane péritrophique du vecteur (Shahabuddin, 1993).

A côté de l'étude de détection de l'activité chitinolytique au cours du cycle, d'autres études génétiques concernant l'identification, et l'expression d'une chitinase de *C.elegans* ont été réalisées par J-M. Neuhaus (département de biochimie). En coopération avec J-M. Neuhaus, l'étude génétique et une étude immunologique d'une chitinase isolée sont en cours par F. Azzouz dans notre laboratoire.

2. La cuticuline

Les caractéristiques de l'épicuticule et la caractérisation d'une protéine de la cuticuline d'Ascaris suum

L'isolation des cuticules de différentes espèces des nématodes, *C.elegans* (Cox et al, 1981; Ouazana et Herbage, 1981), *Panagrellus silusiae* (Leushner et al, 1979), *A.viteae* (Betschart et al, 1985) et *B.pahangi* (Devaney et al, 1990) a permis la caractérisation de différents composants de la cuticule des nématodes. Il est devenu évident que la plupart des constituants protéiques de la cuticule sont des collagènes qui peuvent être solubilisés en présence de SDS et ME. Dans tous les cas, les cuticules contiennent des résidus qui restent insolubles en présence de différents détergents et agents dénaturants. Dans les vers vivants d'*A.viteae* marqués à l'iode radioactive, l'activité la plus élevée a été trouvée dans le composant insoluble ou les couches électron-denses (Betschart et Jenkins, 1987). Le composant insoluble se trouve à la surface des nématodes, et les informations concernant sa composition et son immunogénicité sont encore faibles. Au cours de cette thèse, la séquence as-epicut1 isolée à partir d'une librairie d'ADNc d'*A.suum* (Bisoffi et Betschart, 1996) et codant pour une protéine insoluble de l'épicuticule a été complètement séquencée. Les caractéristiques génétiques et protéiques ont été déterminées par isolation de clones d'ADNc supplémentaires et d'un clone d'ADN génomique, ainsi que par l'étude d'as-epicut1 directement sur le génome. Par recherche d'homologie dans des banques de séquences, des séquences homologues à as-epicut1 ont été identifiés chez *C.elegans*, *B.malayi* et *O.volvulus* et les séquences peptidiques correspondantes sont identiques à 77 % dans certaines régions. La protéine AS-EPICUT1, qui représente la première protéine structurale identifiée de l'épicuticule, a montré une complexité génétique importante représentée par la présence des régions répétitives et par le mode de transcription et l'arrangement d'as-epicut1 dans le génome (chapitres III et IV). Cette complexité ne représente qu'une partie de la complexité du résidu insoluble de la surface dont les informations biochimiques, structurales et génétiques disponibles restent encore limitées.

2.1 Composition biochimique des cuticulines

A présent, seules peu de données concernant les constituants biochimiques de l'épicuticule sont disponibles. La cuticuline possède une composition en acides aminés et une diffraction de

rayon X différentes de celles des collagènes cuticulaires et contient un nombre élevé de ponts de dityrosine et de ponts disulfures (Fujimoto et Kanaya, 1973).

Plusieurs tentatives ont été réalisées afin de solubiliser les fragments des cuticulines d'*Ascaris suum* avec des agents chimiques et enzymatiques. Les études préliminaires de Marti (1991) indiquent que les épicuticules peuvent être digérées avec une variété de protéases pour produire des fragments peptidiques qui peuvent être reconnus par les anticorps préparés contre la cuticuline. Certains peptides ont été isolés et séquencés. Les propriétés de charge et d'hydrophobicité de ces peptides sont très similaires. La purification de ces peptides n'a pas été possible, et cette difficulté d'obtenir des peptides purifiés a été expliquée par la présence de séquences répétitives (Marti, 1991). Des peptides contenant 15 acides aminés ont été séquencés et ces peptides montrent deux régions avec plus de 4 prolines (Marti, 1991). A cause des fortes liaisons croisées dans la cuticuline, l'isolation des fragments spécifiques était difficile. Dans les conditions alcalines, la cuticuline développe une coloration brune. En utilisant les méthodes de chromatographie, des dityrosines, isodityrosines, trityrosines et isotrityrosines ont été identifiées comme composants de ponts (Marti, 1991). La composition biochimique d'AS-EPICUT1 et sa relation avec l'épicuticule ont été déjà discutées au chapitre III.

2.2 Aspects immunologiques de la cuticuline

En utilisant la cuticuline d'*A.suum* Archer et ses collaborateurs (1985) ont montré que ce composant ne provoque pas une réponse immunitaire cellulaire, alors cette réponse est stimulée lorsque l'animal reçoit une immunisation primaire avec les collagènes cuticulaires. Des différents efforts ont été effectués afin de purifier les cuticulines de plusieurs espèces de nématodes. Les études concernant l'immunogénicité des composants cuticulaires des filaires *A.viteae* ont révélé la présence de couches électron-denses résistantes aux collagénases et elles ont indiqué la présence de liaisons entre ces zones et les collagènes cuticulaires (Baschong et al, 1982; Betschart et al, 1985; Betschart et Jenkins, 1987). Les anticorps préparés contre les couches électron-denses ont reconnu les collagènes parce que le matériel utilisé pour la préparation de ces anticorps était contaminé par des collagènes (Betschart et al, 1985). L'utilisation de nématodes adultes d'*A.suum* a permis finalement une purification suffisante de

cuticulines (Betschart et al, 1990). Les anticorps préparés contre la cuticuline purifiée ont montré pour la première fois une spécificité élevée pour la zone corticale externe d'*A.suum* (Betschart et al, 1990; Bisoffi et Betschart, 1996). Seule une faible réaction a aussi été trouvée contre les collagènes cuticulaires (Betschart et al, 1990). Les anticorps anticuticulines d'*A.suum* ont réagi aussi avec les couches électron-denses d'*A.viteae* et *B.pahangi* aux stades adultes et avec la zone corticale de la cuticule d'*O.volvulus* (Betschart et al, 1990; Marti, 1991; Bisoffi et Betschart, 1996).

Par comparaison avec as-epicut1, les résultats de nos recherches dans les banques des données ont détecté des séquences homologues à as-epicut1 chez *C.elegans*, *B.malayi* et *O.volvulus*. L'analyse de la structure protéique déduite de ces fragments chez *C.elegans* montrent le même niveau d'hydrophobicité que pour AS-EPICUT1. Ces données génétiques supportent les données immunologiques et indiquent que des gènes homologues à as-epicut1 sont présents chez les autres nématodes, et par conséquent des protéines homologues.

2.3 Etudes structurales de la cuticuline et de l'épicuticule

Betschart (1990) suggère que l'épicuticule intacte d'*A.suum* serait inerte et posséderait une structure différente de la cuticuline isolée. Les anticorps préparés contre les cuticulines purifiées réagissent fortement avec la cuticuline dans des sections purifiées, mais la surface des nématodes n'est pas reconnue par ces anticorps (Betschart, 1990). Betschart (1990) suppose que la différence de réactivité entre la cuticuline dans l'épicuticule et la cuticuline isolée est due à la présence de lipides dans la couche de l'épicuticule. La présence de domaines lipidiques à la surface de différents nématodes a été démontrée (Proudfoot et al, 1990), et une couche lipidique a été aussi décrite chez les nématodes adultes d'*A.suum* (Bird, 1957). Il est possible que certains facteurs supplémentaires interviennent pour rendre la cuticuline de l'épicuticule inaccessible au système immunitaire, par exemple la présence de la polyprotéine gp 15/400. Cette polyprotéine qui représente un antigène proximal de la surface de *B.malayi*, semble jouer un rôle dans la fixation de lipides acides aux composants lipidiques (rétinoïdes) de la surface de la cuticule (Kennedy et al, 1995). Donc, ce polypeptide pourrait créer une barrière entre l'épicuticule et le système immunitaire. D'une façon exceptionnelle, les propriétés lipidiques de l'épicuticule se révèlent hétérogènes avec une affinité sélective pour certains lipides et une

diffusion latérale à l'intérieur de la surface de l'épicuticule. Les lipides non polaires peuvent diffuser et s'intégrer dans l'épicuticule (Proudfoot et al, 1990). Ces propriétés de diffusion permettraient ainsi l'intégration de constituants lipidiques de l'hôte pour assurer une couverture tolérée par le système immunitaire.

2.4 Comparaison entre la cuticuline AS-EPICUT1 et d'autres protéines insolubles

Comme les anticorps polyclonaux, l'anticorps monoclonal mAb 8.1 dirigé contre la cuticuline purifiée d'*A.suum*, a aussi détecté la zone corticale dense de l'épicuticule d'*A.suum* (Bisoffi et Betschart, 1996). Aucune réaction avec les structures collagèneuses n'a été détectée avec cet anticorps, mais seulement des réactions avec les tissus hypodermiques et les couches basales collagèneuses adjacentes qui se sont révélées très faibles (Bisoffi et Betschart, 1996). Les anticorps préparés contre le produit protéique du fragment d'ADNc as-epicut1, isolé avec le monoclonal mAb 8.1 d'une librairie d'ADNc de l'hypoderme d'*A.suum* adulte, ont montré une réaction très forte avec la zone corticale supérieure d'*A.suum*. Ces anticorps ont aussi démontré une réaction faible avec les zones collagèneuses.

D'un autre côté, d'autres composants insolubles de la cuticule ont été identifiés. Les deux gènes *cecut-1* (Sebastiano et al, 1991) et *cecut-2* (Lassandro et al 1994) ont été isolés d'un nématode libre *C.elegans*, et les produits CECUT-1 et CECUT-2 de ces gènes ont été nommés des cuticulines. Cette nomenclature conduit à une confusion entre la localisation de ces protéines et la définition de la cuticuline par Fujimoto et Kanaya (1973). Bien que ces composants représentent des matériaux insolubles de la cuticule, ils ont été trouvés dans différentes régions de la cuticule (Sebastiano et al, 1991; Ristatore et al, 1994; Favre et al, 1995; Favre et al, 1998; Lewis, 1999), mais pas dans l'épicuticule qui représente la seule région formée par des cuticulines (Fujimoto et Kanaya, 1973). C'est seulement dans la zone corticale externe du stade L1 de *C.elegans* qu'on a démontré des épitopes de CECUT-1 et de CECUT-2. La protéine CECUT-1 a été trouvée chez plusieurs espèces de nématodes, *M.artiellia* (De Luca et al, 1994; De Giorgi et al, 1996), *A.lumbricoides* (Timinouni et Bazzicalupo, 1997), *B.pahangi* et *B.malayi* (Lewis et al, 1999). Donc, d'après la comparaison de l'immunolocalisation des différentes protéines identifiées comme de composants insolubles

de la cuticule, seule la protéine AS-EPICUT1 représente un composant de l'épicuticule, d'où l'identification correcte de cette protéine comme cuticuline (Bisoffi et Betschart, 1996).

Les séquences peptidiques de CUT-1 de toutes les espèces mentionnées montre jusqu'à 90 % d'identité. Ces données indiquent que la protéine CUT-1 est conservée entre les différentes espèces de nématodes. Par contre, AS-EPICUT1 n'a pas révélé une identité aussi importante avec les séquences identifiées dans les banques des données. D'après sa localisation dans les régions internes de la cuticule, la protéine CUT-1 pourrait intervenir dans la formation d'une structure interne conservée chez les différentes espèces.

Bien que la protéine CUT-2 ne soit pas un composant de l'épicuticule, cette protéine a fourni la possibilité d'étudier pour la première fois les propriétés biochimiques des composants insolubles de la cuticule au niveau de leurs ponts (Lassandro et al 1994; Parise et Bazzicalupo, 1997). La protéine recombinante CUT-2 soluble a été démontré un excellent substrat pour étudier les pontages catalysés par la peroxydase en présence de H₂O₂. Ces liaisons aboutissent à la formation d'un complexe insoluble de CUT-2 avec un poids moléculaire élevé (Lassandro et al 1994). La formation de complexes intermédiaires de CUT-2 comme des dimères ou trimères, peut être détectée lorsque la réaction de pontage se ralentit ou est interrompue avant la formation du complexe final (Parise et Bazzicalupo, 1997). La protéine recombinante forme de petits complexes non-covalents qui représentent les substrats compétents pour le pontage (Parise et Bazzicalupo, 1997). L'inhibition de la formation de ponts intermoléculaires par l'urée et la chromatographie selon la taille sous des conditions différentes du recombinant CUT-2, suggèrent que les interactions hydrophobiques sont importantes pour la formation et la stabilisation des polymères (Parise et Bazzicalupo, 1997). Par contre la protéine AS-EPICUT1 ne possède pas la même hydrophobicité que CUT-2. AS-EPICUT1 est formée de régions répétitives et chaque région répétitive comprend une partie hydrophobe, riche en alanines et en prolines, flanquée de deux extrémités hydrophiles importantes. Cette structure rappelle la forme d'une protéine transmembranaire. La proportion de résidus tyrosines dans AS-EPICUT-1 est important (5.3 %) et dépasse aussi bien celle de CUT-2 (4.3 %) que celle de CUT-1 (2.6-3.1 %). Ainsi, la probabilité d'établir des ponts est plus élevée pour AS-EPICUT-1 que pour les autres protéines insolubles, mais les résidus tyrosines se trouvent essentiellement dans les parties hydrophiles. Il est important de

mentionner que les parties hydrophiles constituent les régions qui peuvent avoir jusqu'à 77 % d'identité entre les différentes séquences homologues à AS-EPICUT1 chez: *C.elegans*, *B.malayi*, et *O.volvulus*. Dans les régions répétitives d'AS-EPICUT-1, les parties hydrophobes riches en alanine et proline sont les régions responsables de l'homologie avec les structures extracellulaires connues chez d'autres espèces, comme l'insecte *Locusta migratoria* (Hojrup et al, 1986; Bisoffi et Betschart, 1996). Ces régions riches en alanine et proline caractérisent aussi les séquences identifiées homologues à AS-EPICUT1 chez *C.elegans*. Ces régions sont plus importantes chez *C.elegans* et le nombre de résidus prolines et alanines est plus élevé dans les régions répétitives déduites du clone K08D12 de *C.elegans*. Il est important de rappeler aussi que les propriétés communes à AS-EPICUT1 et CUT-2 sont basées sur les taux identiques de résidus alanines et prolines et la présence de régions répétitives.

Les parties hydrophiles des régions répétitives d'AS-EPICUT1 pourraient être exposées à une phase aqueuse, à la surface externe qui serait l'environnement de l'hôte ou aux fluides intra-épicuticulaires dans l'espace entre les deux faces de l'épicuticule décrit par Peixoto et De Souza (1995). Ces modèles peuvent conduire à d'autres hypothèses. Par exemple, les anticorps polyclonaux anticuticuline ou anti-AS-EPICUT1 (Bisoffi et Betschart, 1996) devraient réagir avec la surface externe de l'épicuticule si les parties hydrophiles d'AS-EPICUT1 sont exposées à la surface. Le résultat des tests immunologiques effectués sur des sections des nématodes contredit cette hypothèse et aucune réaction n'a été détectée à la surface externe de l'épicuticule (Betschart et al, 1990; Bisoffi et Betschart, 1996). Afin de confirmer ces observations, il semble intéressant d'utiliser seulement la partie hydrophile dans la préparation des polyclonaux pour tester de nouveau la réaction de la surface externe des nématodes. Les études morphologiques montrent que l'épicuticule peut être formée de plusieurs lamelles, trilamellaires chez *C.elegans* avec deux faces externe et interne et une matrice entre les deux qui peut être occupée par des fluides ou de l'eau (Peixoto et De Souza, 1994 et 1995). L'épicuticule est hepta-laminée chez *W.bancrofti* (De Souza et al, 1993). En tout cas, si des fluides peuvent exister dans la structure multilamellaire de l'épicuticule d'*A.suum*, il serait possible que les parties hydrophiles d'AS-EPICUT1 soient exposées à ces

fluides intra-épicuticulaires. Il est aussi possible qu'AS-EPICUT1 intervienne dans la formation des parois des canaux excréteurs et sécréteurs au niveau de l'épicuticule.

Si les tyrosines qui se trouvent dans les parties hydrophiles peuvent intervenir dans la formation des liaisons intermoléculaires, il semble que ces liaisons doivent s'effectuer dans des régions exposées ou dans des liquides. Il nous reste à demander si les tyrosines d'AS-EPICUT1 contribuent à former des ponts entre les divers constituants protéiques dans les fluides intra-épicuticulaires sous formes des filaments et des fibres pour fixer les structures lamellaires de l'épicuticule ou de la région amorphe qui sépare les deux couches électron-denses des filaires? .

2.5 Perspectives

Si les interactions hydrophobes entre les molécules individuelles des cuticulines sont vraiment essentielles pour la formation des polymères (Parise et Bazzicalupo, 1997), AS-EPICUT1 serait incapable de réaliser un nombre important des liaisons intermoléculaires. Dû à la difficulté de déterminer le poids moléculaire exact du précurseur AS-EPICUT1, la présence de polymères n'a pas été encore déterminée. Ainsi, la théorie indiquant l'importance de l'hydrophobicité dans la formation du complexe polymérique ne peut pas être justifiée par les études moléculaires effectuées sur AS-EPICUT1 jusqu'à présent (Bisoffi et Betschart, 1996). Les études de Marti (1991) et de Bisoffi et Betschart (1996) concernant le poids moléculaire d'AS-EPICUT1 ont révélé, par western-blot, des valeurs différentes dans un extrait d'hypoderme d'*A.suum*, 67 et 40 kD, respectivement. Le précurseur recombinant d'AS-EPICUT1 synthétisé chez *E.coli* montre avec le monoclonal mAb 8.1 un profil de plusieurs bandes de différentes tailles. Ce résultat indique la possibilité d'une polymérisation entre les monomères d'AS-EPICUT1 (Bisoffi et Betschart, non publié; observation personnelle). Au niveau génétique, plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'analyser les observations moléculaires mentionnées (chapitres III et IV). D'après les analyses et la comparaison des différents clones d'ADN isolés de la librairie d'ADNc et d'ADN génomique, il semble que plusieurs gènes d'*as-epicut1* peuvent coexister sur le génome. Ces gènes pourraient produire des protéines de différentes masses moléculaires. Les mécanismes d'épissage différentiel et de trans-épissage ont aussi été discutés. Toutes ces analyses ont contribué à montrer la

complexité d'AS-EPICUT1 et les difficultés liées à la détermination de sa masse moléculaire réelle. Pour éclaircir ces données, il semble intéressant de réaliser un travail complémentaire et d'inhiber à l'aide d'urée la formation de polymères à partir des précurseurs d'AS-EPICUT1 (voir études de Parise et Bazzicalupo, 1997).

Les analyses de séquences homologues à *as-epicut1* chez les autres espèces *C.elegans*, *B.malayi* et *O.volvulus* ont montré des caractéristiques préliminaires satisfaisantes qui permettent de commencer un travail moléculaire pour vérifier leur identité comme cuticulines. Dans ce but, les régions répétitives du clone K08D12 de *C.elegans* peuvent être choisies pour produire des précurseurs et ensuite pour produire des anticorps. Les anticorps prévus seront à tester sur des sections de *C.elegans*, et par réactions croisées sur d'autres espèces comme *A.suum*, *A.viteae*, *Brugia ssp.*, et *O.volvulus*.

Pour que les études moléculaires de l'épicuticule ne restent pas limitées à une seule protéine, l'AS-EPICUT1, l'isolation et la détermination d'autres constituants protéiques de l'épicuticule ou des régions électron-denses sont indispensables. Les différentes connaissances liées à la composition biochimique, génétique, structurale et moléculaire des résidus insolubles peuvent construire une base qui permettra d'identifier d'autres protéines responsables de la formation des régions électron-denses. Par exemple, l'inhibition *in vivo* des pontages inter- et intramoléculaires des précurseurs destinés à construire l'épicuticule serait une voie possible pour étudier les molécules qui restent solubles sous ces conditions. L'inhibition *in vivo* peut se réaliser par l'addition dans le milieu de culture d'urée pour inhiber les interactions hydrophobes possibles (Parise et Bazzicalupo, 1997), et des inhibiteurs classiques de la transglutaminase pour inhiber la formation de ponts au niveau des résidus glutamines (Chandrashekar et Mehta, 2000). Si cette inhibition réussit, certaines molécules destinées à s'intégrer dans la cuticule pendant la mue resteront solubles. Ces molécules peuvent être récupérées de la cuticule en voie de reconstitution. Récupération de la cuticule des nématodes, préparation d'anticorps à partir du surnageant, adsorption sur de la cuticuline normale purifiée, récupération des anticorps spécifiques anticuticulines adsorbés, ces sont les étapes qui permettront d'obtenir des anticorps spécifiques aux différentes protéines insolubles de l'épicuticule. Ensuite ces anticorps pourront être utilisés pour isoler des clones correspondants à partir de bibliothèques d'ADNc de l'hypoderme et d'ADN génomique.

Enfin, l'identification des autres protéines structurales de la surface des nématodes n'est pas envisagée seulement pour étudier les composants biochimiques et génétiques de la surface des nématodes, mais surtout pour déterminer les raisons qui rendent ces molécules inertes vis-à-vis du système immunitaire. La présence tolérée des nématodes au sein de leur hôte est toujours une question sans réponse dans le domaine médical. L'étude biochimique des molécules structurales de la surface permettra à l'avenir de comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions entre la surface des nématodes et l'environnement de leur hôte.

Bibliographie

- Adam R., Kaltmann B., Rudin W., Friedrich T., Marti T., and Lucius R. (1996) Identification of Chitinase as the Immunodominant Filarial Antigen Recognized by Sera of Vaccinated Rodents. *The Journal of Biological Chemistry* 271(3), 1441-1447
- Archer G.T., Coulits N., Jindra J., and Robson J.E. (1985) Eosinophilia, mast cell hyperplasia and antibody production in rats following intraperitoneal injection of *Ascaris* cuticle including studies of immune eosinophil granule lysis. *Pathology* 17, 101-107
- Baschong W., Tanner M., Betschart B., Rudin W., and Weiss N. (1982) *Dipetalonema viteae*: Extraction and immunogenicity of cuticular antigens from female worms. *Experimental Parasitology* 53, 262-269
- Betschart B., Marti S., and Glaser M. (1990) Antibodies against the cuticlin of *Ascaris suum* cross-react with epicuticular structures of filarial parasites. *Acta Tropica* 47, 331-338
- Betschart B., and Jenkins J.M. (1987) Distribution of iodinated proteins in *Dipetalonema viteae* after surface labelling. *Molecular and Biochemical Parasitology* 22(1), 1-8.

- Betschart B., Rudin W., and Weiss N. (1985) The isolation and immunogenicity of the cuticle of *Dipetalonema viteae*. *Parasitenkunde* 71, 87-95
- Bird A.F., and Bird J. (1991) The structure of nematodes, pp 44-77. Academic Press, San Diego.
- Bird A.F. (1971) The Structures of nematodes. Academic Press, New York
- Bird A.F. (1957) Chemical composition of the nematode cuticle. Observations on individual layers and extracts from these layers in *Ascaris lumbricoides* cuticle. *Experimental Parasitology* 6, 383-403
- Bisoffi M., and Betschart B. (1996) Repetitive peptide motifs in the cuticlin of *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80, 55-64
- Brydon L.J., Gooday G.W., Chappell L.H., and King T.P. (1987) Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 25(3), 267-72
- Chandrashkar R., and Mehta K. (2000) Transglutaminase-catalysed Reactions in the Growth, Maturation and development of Parasitic Nematodes. *Parasitology Today* 16(1), 11-17
- Cox N. G., Kusch M., and Edgar R. S. (1981) Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: Its isolation and partial characterization, *The Journal of Cell Biology* 90, 7-17
- De Giorgi C., De Luca F., Di Vito M., and Lamberti F. (1997) Modulation of expression at the level of splicing of cut-1 RNA in the infective second-stage juvenile of the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Molecular and General Genetics* 253, 589-598

- De Luca F., De Giorgi C., and Lamberti F. (1994) Cuticlin gene organization in *Meloidogyne artiellia*. In: Lamberti F., De Giorgi C., and Bird D.M. (eds) *Advances in Molecular Plant Nematology*. Plenum Press, New York, pp 85-95
- DeSouza M.M., and Murray M.K. (1995) An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* 136(6), 2485-96
- De Souza W., Souto-Padron T., Dreyer G., and Andrade L.D. (1993) *Wuchereria bancrofti*: freeze-fracture study of the epicuticle of microfilariae. *Experimental Parasitology* 76, 287-290
- Devaney E., Betschart B., and Rudin W. (1990) the analysis of the 30 kDa antigen of *Brugia pahangi* and its interaction with the cuticle: a short review. *Acta Tropica* 47, 365-372
- Devaney E. (1988) The biochemical and immunological characterisation of the 30 kilodalton surface antigen of *Brugia pahangi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 27, 83-92
- Edgar R.S., Cox G.N., Kusch M, and Politz J.C. (1982) The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology* 14, 248-258
- Elson L.H., Guderian R.H., Araujo E., Bradley J.E., Days A., and Nutman T.B. (1994) Immunity to onchocerciasis: Identification of a putatively immune population in a hyperendemic area of Ecuador. *Journal of Infectious Diseases* 169, 588-594
- Favre R., Cermola M., Nunes C. P., Hermann R., Müller M., and Bazzicalupo P. (1998) Immuno-Cross-Reactivity of CUT-1 and cuticlin epitopes between *Ascaris lumbricoides*, *Caenorhabditis elegans*, and *Heterorhabditis*. *Journal of Structural Biology* 123, 1-7

- Favre R., Hermann, R., Cermola M., Hohenberg H., Muller M., and Bazzicalupo P. (1995) Immuno-gold-labelling of CUT-1, CUT-2 and cuticlin epitopes in *Caenorhabditis elegans*, and *Heterorhabditis sp* processed by high pressure freezing and freeze-substitution. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 27, 341-347
- Freedman D.O., Nutman T.B., and Ottesen E.A. (1989) Protective immunity in bancroftian filariasis. Selective recognition of a 43-kD larval stage antigen by infection-free individuals in an endemic area. *Journal of Clinical Investigation* 83, 14-22
- Fuhrman J.A., Lane W.S., Smith R. F., Piessens W.F., and Perler F.B. (1992) Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 1548-1552
- Fuhrman J.A., and Piessens W.F. (1985) Chitin synthesis and sheath morphogenesis in *Brugia malayi* microfilariae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 17, 93-104
- Fujimoto D., and Kanaya S. (1973) Cuticlin: A noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 157, 1-6
- Gooday G.W., Brydon L.J., and Chappell L.H. (1988) Chitinase in female *Onchocerca gibsoni* and its inhibition by allosamidin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 29(2-3): 223-5
- Hakala B.E., White C., and Recklies A.D. (1993) Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *The Journal of Biological Chemistry* 268(34), 25803-25810
- Harrison R.A., Wu Y., Egerton G., and Bianco A.E. (1999) DNA immunisation with *Onchocerca volvulus* chitinase induces partial protection against challenge infection with L3 larvae in mice. *Vaccine* 12(18), 647-655

- Hodgkin J., Horvitz R., Jasny B. R., and Kimble J. (1998) *C. elegans*: Sequence to biology. *Science* 282, 2011-2019
- Hojrup P., Anderson S.O., and Roepstorff P. (1986) Isolation, characterization and N-terminal sequence studies of cuticular proteins from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *European Journal of Biochemistry* 154, 153-159
- Huber M, Cabib E, and Miller LH. (1991) Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88(7), 2807-10
- Inglis W.G. (1983) The design of the nematode body wall: the ontogeny of the cuticle. *Australian Journal of Zoology* 31, 705-716
- Kennedy M.W., Allen J.E., Wright A.S., McCruden A.B., and Cooper A. (1995) The gp15 / 400 polyprotein antigen of *Brugia malayi* binds fatty acids and retinoids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 71, 41-50
- Lassandro F., Sebastiano M., Zei F., and Bazzicalupo P. (1994) The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 65, 147-159
- Lee D.L. (1966) The structure and composition of the helminth cuticle. In: *Advances in parasitology*. vol.4 (Dawes,B., ed.) pp. 187-254, Academic Press. New York.
- Lee D.L. (1977) The nematode epidermis and collagenous cuticle, its formation and ecdysis. *Symposia. Zoological Society of London* 39, 145-170

- Leushner J.R.A., Semple N.L., and Pasternak J. (1979) Isolation and Characterization of the cuticle from the free-living nematode *Panagrellus silusiae* *Biochemica and Biophysica Acta* 580, 166-174
- Lewis E., Hunter S.J., Tetley L., Nunes C.P., Bazzicalupo P., and Devaney E. (1999) cut-1-like genes are present in the filarial nematodes, *Brugia pahangi* and *Brugia malayi*, and , as in other nematodes, code for components of the cuticle. *Molecular and Biochemical Parasitology* 101, 173-183
- Lucius R., Textor G., Kern A., and Kirsten C. (1991) *Acanthocheilonema viteae*: vaccination of jirds with irradiation-attenuated stage-3 larvae and with exported larval antigens. *Experimental Parasitology* 73(2), 184-96
- Lumsden R.D. (1975) Surface ultrastructure and biochemistry of parasitic helminths. *Experimental Parasitology* 37, 267-239.
- McReynolds L.A., Kennedy M.W.; and Selkirk M.E. (1993) The polyprotein Allergens of Nematodes. *Parasitology Today* 9, 403-406
- Maizels R.M., and Page A.P. (1990) Surface associated glycoproteins from *Toxocara canis* larval parasites. *Acta Tropica* 47, 355-364
- Maizels R.M., and Selkirk M.E. (1988) Immunobiology of nematode antigens. In: *The Biology of Parasitism* (Englund P.T., and Sher A., eds.), pp 285-308. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Maizels R.M., De Savigny D., and Ogilvie B.M. (1984) Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunology* 6, 23-37

- Maizels R.M., Partono F., Oemijati S., and Ogilvie B.M. (1983a) Antigenic analysis of *Brugia timori*, a filarial nematode of man: initial characterization by surface radioiodination and evaluation of diagnostic potential. *Clinical and Experimental Immunology* 51, 269-277
- Maizels R.M., Meghji M., and Ogilvie B.M. (1983b) Restricted sites of parasite antigens from the surface of different stages and sexes of the nematode parasite *Nippostrangylus brasiliensis*. *Immunology* 48, 107-121
- Marti S. (1991) Biochemische und immunologische charakterisierung von cuticlin, einem strukturprotein aus der kutikula von *Ascaris suum*. Thesis, Basel.
- Neuhaus J.M. (1999) Pathogenesis-Related Proteins in Plants, (Datta, S.K., Muthukrishnan, S. eds.) CRC Press LLC.
- Nutman T.B., Steel C., Ward D.J., Zea- Flores G., and Ottesen E.A. (1991) Immunity to onchocerciasis: recognition of larval antigens by humans putatively immune to *Onchocerca volvulus* infection. *Journal of Infectious Diseases* 163, 1128-1133
- Ortega-pierres G., Chayen A., Clark N.W.T, and Parkhouse R.M.E. (1984) The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens to *Trichinella spiralis*. *Parasitology* 88,359-369
- Ouazana R., and Herbage D. (1981) Biochemical characterization and the cuticle collagen of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemica and Biophysica Acta* 669, 236-243
- Parise G., and Bazzicalupo P. (1997) Assembly of nematode cuticle: role of hydrophobic interactions in CUT-2 cross-linking. *Biochemica and Biophysica Acta* 1337, 295-301
- Parkhouse R.M.E., Philipp M., and Ogilvie B.M. (1981) Characterisation of the surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasite Immunology* 3, 339-352

- Peixoto C.A., and De Souza W. (1995) Freeze -fracture and deep-etch view of the cuticle of adult forms of *Caenorhabditis elegans*. *Tissue Cell* 27, 561-568
- Peixoto C.A., and De Souza W. (1994) Freeze -fracture characterization of the cuticle of adult and dauer forms of *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology Research* 80, 53-57
- Philipp M., Davis T., Story N., and Carlw C.K.S. (1988) Immunity in filariasis: Perspectives for vaccine development. *Annual Review of Microbiology* 42, 685-716
- Politz S.M., and Philipp M. (1992) *Coenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes a focus on the cuticle. *Parasitology Today* 8, 6-12
- Proudfoot L., Kusel J.R., Smith H.V., Harnett W., Worms M.J., and Kennedy M.W. (1990) The surface lipid of parasitic nematodes: Organization, and modifications during transition to the mammalian host environment. *Acta Tropica* 47(5-6), 323-330.
- Rao U.R., Nasarre C., Coleman S.U., Horohov D.W., and Klei T.R. (1999) Granulomatous inflammatory response to recombinant filarial proteins of *Brugia* species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60(2), 251-254
- Renkema G.H., Boot R.G., Au F.L., Donker-Koopman W.E., Strijland A., Muijsers A.O., Hrebicek M., and Aerts J.M. (1998) Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *European Journal of Biochemistry* 251(1-2), 504-509
- Renkema G.H., Boot R.G., Strijland A., Donker-Koopman W.E., van den Berg M., Muijsers A.O., and Aerts J.M. (1997) Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *European Journal of Biochemistry* 244(2), 279-285

- Renkema G.H., Boot R.G., Muijsers A.O., Donker-Koopman W.E., and Aerts J.M. (1995) Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270(5), 2198-2202
- Rhoads M.L., Fetterer R.H. (1994) Purification and characterization of surface-associated proteins from adult *Haemonchus contortus*. *Journal of Parasitology* 80(5), 756-763
- Ristoratore F., Cermola M., Nola M., Bazzicalupo P., and Favre R. (1994) Ultrastructural immuno-localization of CUT-1 and CUT-2 antigenic sites in the cuticles of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 26(3), 437-443
- Rogers R., Ellis D.S., and Denham D.A. (1976) Studies with *Brugia pahangi*. 14. Intrauterine development of the microfilaria and a comparison with other filarial species. *Journal of Helminthology* 50, 251-257
- Sakuda S., Isogai A., Matsumoto S., and Suzuki A. (1986) The structure of Allosamidin, a insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Letters* 27, 2475-2478
- Sebastiano M., Lassandro F., and Bazzicalupo P. (1991) cut-1 a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a Dauer-specific noncollagenous component of the cuticle. *Developmental Biology* 146, 001-0012
- Sendai Y., Abe H., Kikuchi M., Satoh T., and Hoshi H. (1994) Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biology of Reproduction* 50(4), 927-934
- Shahabuddin M., Toyoshima T., Aikawa M., and Kaslow D.C. (1993) Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90, 4266-4270

- Sieber K.P., Huber M., Kaslow D., Banks S.M., Torii M., Aikawa M., and Miller L.H. (1991) The peritrophic membrane as a barrier: its penetration by *Plasmodium gallinaceum* and the effect of a monoclonal antibody to ookinetes. *Experimental Parasitology* 72(2), 145-156
- Spindler K-D., and Spindler-Barth M. (1994) Inhibition of Chitinolytic Enzymes from *Streptomyces griseus* (Bacteria), *Artemia salina* (Crustacea), and a cell Line from *Chironomus tentans* (Insecta) by Allosamidin and Isoallosamidin. *Pesticide Science* 40, 113-120
- Storey N., and Philipp M. (1992) *Brugia malayi*: Patterns of Expression of Surface-Associated Antigens. *Experimental Parasitology* 74, 57-68
- Timinouni, M., and Bazzicalupo, P. (1997) cut-1-like genes of *Ascaris lumbricoides*. *Gene* 193, 81-87
- Wang S., Xiong M., Liu T., and Tang L. (1999) Evaluation of recombinant chitinase antigen in serological diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 30(3), 569-571
- Wang S.H., Zheng H.J., Dissanayake S., Cheng W.F., Tao Z.H., Lin S.Z. and Piessens W.F. (1997) Evaluation of recombinant chitinase and SXP1 antigens as antimicrofilarial vaccines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56, 474-481
- World Health Organization Expert Committee on Filariasis (1992) Technical Report Series N°. 821, World Health Organization. Geneva
- Wright K.A. (1987) The nematode's cuticle-its surface and the epidermis: function, homology, analogy-a current consensus. *Journal of Parasitology* 73, 1077-1083

Wu Y., Adam R., Williams S.A., and Bianco A.E. (1996) Chitinase genes expressed by infective larvae of the filarial nematodes, *Acanthoecilonema viteae* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 75, 207-219

REMERCIEMENTS

C'est avec un réel plaisir que je remercie toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement le professeur Bruno Betschart pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son laboratoire, pour les conseils qu'il m'a prodigués, pour la confiance et la patience qu'il m'a témoignées. Comme je tiens à le remercier pour son soutien et son encouragement pendant les moments difficiles au cours des années de mes études à Neuchâtel.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude au professeur Jean-Marc Neuhaus, qui m'a patiemment orientée au long de mon travail sur la chitinase, pour ses conseils et sa gentillesse dont j'ai bénéficié.

Je remercie Jean-Luc Perret pour les discussions et l'aide informatique et Josiane pour l'aide bibliographique, et je leur exprime ma reconnaissance pour leur gentillesse. Je remercie cordialement Fayçal, Eric, Emmanuelle, pour leur coopération et leur sympathie.

Je présente mes remerciements à mes collègues, Chang-Min, Hélène, Marta, Lina, Naceur, Djamel, pour leur gentillesse et leur sympathie.

Je remercie ceux qui sont toujours à mes côtés, tous les membres de ma famille qui m'ont témoigné sans cesse tant de patience et de soutien pendant de longues années, et qui sans eux rien de ce travail n'aurait été réalisé, je leur présente toute ma gratitude et mon amour.

Finalement, avec tout mon respect, Je présente mes remerciements au Fonds National Suisse (FNS) qui grâce à son soutien, les études moléculaires sur la cuticoline ont été réalisées.



CURRICULUM VITAE

Je suis née le 15 juillet 1964 à Beyrouth-Liban. J'ai suivi mes études primaires, secondaires et universitaires au Liban. J'ai obtenu les baccalauréats, première (1982-1983), et deuxième (1983-1984) parties, série scientifique, sciences expérimentales. J'ai poursuivi mes études universitaires en sciences naturelles, à la faculté des sciences de l'université libanaise, pendant la période de 1986-1991. Divers cours de biologie et des travaux pratiques de différents domaines de la biologie animale et végétale ainsi que de la biologie du sol ont été suivis.

Ensuite, en Belgique à l'université libre de Bruxelles, j'ai obtenu, après des cours intensifs au cours de deux ans de 1991-1993 y compris un travail d'immunologie, une licence spéciale en biologie moléculaire et biotechnologie avec un grade de distinction.

En 1993-1994, un travail de thèse a été entamé en parasito-immunologie à l'hôpital Érasme à Bruxelles. Ce travail consistait à étudier le système immunitaire contre l'infection de *Trypanosome cruzi*, responsable de la maladie de Chagas.

Pendant la période de 1995-2000, à l'université de Neuchâtel, institut de Zoologie, département de Parasitologie, cette présente thèse a été réalisée sous la direction du professeur Bruno Betschart et en coopération avec le professeur Jean-Marc Neuhaus du département de Biochimie.