

**Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences
Institut de Zoologie**

**Isolation et caractérisation de gènes codant
pour des protéines cuticulaires des nématodes
Ascaris suum et *Brugia pahangi***

**Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences**

**par Carmela Di Mito, Diplômée en Biologie
(Université de Neuchâtel)**

Neuchâtel 2001

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Isolation et caractérisation de gènes codant pour
des protéines cuticulaires des nématodes *Ascaris
suum* et *Brugia pahangi***

de Mme Carmela DI MITO

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, F. Müller (Fribourg) et
P. Bazzicalupo (Naples) absent mais a envoyé un rapport
favorable

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 24 août 2000

Le doyen:



J.-P. Derendinger

à ma maman

à mon frère Pascal et à son épouse Sandrine

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	3
SUMMARY	5
ABRÉVIATIONS	7
CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	9
LES NÉMATODES	10
<i>Systématique</i>	10
<i>Morphologie</i>	12
<i>Développement</i>	13
LA CUTICULE	15
<i>Rôle et importance de la cuticule</i>	15
<i>Propriétés et uniformité de la cuticule</i>	15
CAENORHABDITIS ELEGANS: DÉVELOPPEMENT ET DISTRIBUTION	22
ASCARIS SP.: DÉVELOPPEMENT ET DISTRIBUTION	24
BRUGIA SP.: DÉVELOPPEMENT ET DISTRIBUTION	29
BUTS DU TRAVAIL	36
RÉFÉRENCES	37
CHAPITRE 2 EXTRACTION DE L'ADN DES TISSUS MUSCULAIRES D'ASCARIS SUUM : UNE NOUVELLE MÉTHODE	43
INTRODUCTION	44
MATÉRIELS ET MÉTHODES	44
<i>Préparation des parasites</i>	44
<i>Extraction de l'ADN</i>	44
<i>Tests de qualité de l'ADN</i>	45
RÉSULTATS	46
DISCUSSION	47
RÉFÉRENCES	48
CHAPITRE 3 COMPARAISON DES PROFILS PROTÉIQUES DES NÉMATODES ASCARIS SUUM ET C. ELEGANS ET ESSAI DE CARACTÉRISATION D'UN GÈNE CODANT POUR UNE CUTICLINE CHEZ A. SUUM	49
INTRODUCTION	50
MATÉRIELS ET MÉTHODES	51
<i>Matériel utilisé</i>	51
<i>Extraction et séparation des protéines</i>	52

<i>Concentration des protéines</i>	52
<i>SDS-PAGE</i>	52
<i>Détection par hybridation du gène AsCut</i>	53
RÉSULTATS ET DISCUSSION	53
<i>Comparaison des profils protéiques de A. suum et C. elegans</i>	53
<i>AsCut: Préparation de l'ADN et hybridation</i>	56
RÉFÉRENCES	58
CHAPITRE 4 IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE GÈNES CODANT POUR DES COLLAGÈNES DE LA CUTICULE DE NÉMATODES PARASITES	61
INTRODUCTION	62
MATÉRIELS ET MÉTHODES	63
<i>Matériel utilisé</i>	63
<i>Production des protéines de fusion</i>	63
<i>Digestion enzymatique, SDS-PAGE et immunisation</i>	64
<i>Analyses par immunoblot</i>	64
<i>Amplification par PCR de l'ADN génomique</i>	65
<i>Sélection des clones par PCR</i>	65
<i>Sélection des clones par hybridation</i>	67
<i>Sous-clonage et séquençage de l'ADN</i>	67
<i>Extraction de l'ARN, synthèse des ADNc et séquençage</i>	68
<i>'Screening' d'une banque d'ADNc de L3 de Brugia pahangi</i>	68
RÉSULTATS ET DISCUSSION	69
<i>Expression et immunogénicité du produit du gène Bpcol-1</i>	69
<i>Isolation et séquençage des gènes Ascol-C et Ascol-D d'A. suum codant pour des collagènes</i>	72
<i>Présence d'un allèle d'Ascol-C</i>	73
<i>Structure des gènes Ascol-C et Ascol-D et comparaison avec d'autres collagènes de nématodes</i>	75
<i>Homologies entre Ascol-C et Bpcol-1</i>	79
RÉFÉRENCES	84
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE	89
PERSPECTIVES	93
RÉFÉRENCES	95
CHAPITRE 6 REMERCIEMENTS	99
ANNEXES	103
ANNEXE 1: DNA extraction from <i>Ascaris suum</i> muscle tissue	105
ANNEXE 2: IDENTIFICATION OF TWO COLLAGEN GENES FROM THE CUTICLE OF <i>ASCARIS SUUM</i>	107

RÉSUMÉ

Les nématodes comptent parmi les animaux les plus nombreux. Leur morphologie filiforme leur a permis de coloniser tous les milieux et de nombreuses espèces sont parasites d'insectes, de plantes ou de vertébrés. Ces vers ronds sont entièrement recouverts d'une couche de protéines: la cuticule. Cette matrice extracellulaire est constituée de plusieurs couches et protège l'animal des agressions de son environnement. Elle est le siège d'importants échanges et dans le cas des espèces parasites, elle constitue une interface entre le nématode et son hôte, une barrière entre le système immunitaire du vertébré et le ver. Les interactions entre le parasite et son hôte jouent un rôle primordial dans la réussite de l'infection, et la cuticule est à coup sûr le siège de telles interactions. Les travaux d'études les plus fréquents ont été effectués chez le nématode libre *Caenorhabditis elegans*. La cuticule est essentiellement constituée de collagènes (>80%) spécifiques des nématodes. Ils peuvent être solubilisés par l'association d'un détergent (SDS) et d'un agent réducteur (β -mercaptoéthanol). Le restant (<20%) est constitué de protéines insolubles, pour la plupart non-identifiées, nommées cuticlins. Les deux types de protéines sont étroitement liés par des liaisons covalentes impliquant des ponts-disulfures ainsi que des polyphénols (di- et des isotri-tyrosines). Les études menées à ce jour ont démontré que la structure et la composition de la cuticule sont hautement conservées au sein des différentes espèces. Le but de ce travail était d'étudier les protéines de la cuticule de différents nématodes afin de contribuer à une meilleure compréhension de cette matrice complexe qui permet au ver parasite de s'installer et de vivre dans son hôte, en échappant au système immunitaire.

Des expériences visant à comparer la composition en protéines de la cuticule du nématode libre *C. elegans* et du parasite intestinal du porc *Ascaris suum* ont été réalisées. Les profils obtenus diffèrent passablement en ceci que les collagènes de *C. elegans* n'apparaissent pas sous forme de monomères et rarement sous forme de dimères alors que ceux de *A. suum*, bien que majoritairement présents en tant que trimères sont également présent sous les deux autres formes. Les trois peptides formant les triples-hélices semblent donc être plus fortement liées chez le nématode libre.

En raison de leur insolubilité, les cuticlins ont été peu étudiés à ce jour. Le travail effectué par Marco Bisoffi, ayant abouti à l'isolation et à la caractérisation partielle du gène *Ascut*, codant pour une cuticline de l'épicuticule de *A. suum*, un complément d'analyse a été effectué.

La présence d'une seule copie du gène dans des extraits d'ADN génomique de *A. suum* digéré par différente enzyme a été démontrée par hybridation.

Une banque d'ADNc de l'hypoderme du parasite *A. suum* adulte a été amplifiée par PCR et criblée par hybridation. Deux nouveaux gènes ont pu être isolés et séquencés. Les protéines déduites de la séquence de ces deux gènes présentent l'organisation typique des collagènes de la cuticule des nématodes. Elles comportent des régions triples-hélicales avec une glycine tous les trois acides aminés, analogues de celles des collagènes de vertébrés, interrompues par des régions non-hélicales riches en cystéines. Le premier, *Ascol-C* (pour *Ascaris suum* collagène C) correspond au gène *Bpcol-1* décrit chez *Brugia pahangi*, une filaire du chat et du chien présente en Malaisie (taux d'homologie = 77%). Les séquences génomiques des gènes *Ascol-C* et *Bpcol-1* possèdent trois introns localisés exactement au mêmes endroits. Le taux d'homologie élevé, ainsi que les localisations conservées des introns suggèrent que ces deux gènes peuvent être orthologues. Le gène, sous forme de protéine de fusion avec la glutathion-S-transférase, a été exprimé dans *Escherichia coli*. Afin de confirmer sa nature collagénieuse deux tests ont été réalisés. Premièrement, la protéine de fusion a été traitée avec une collagénase et, deuxièmement, après avoir été transférée sur une membrane de nitrocellulose, elle a été révélée par des anticorps dirigés contre les collagènes de la cuticule de *B. pahangi*. Le deuxième gène, *Ascol-D* (pour *Ascaris suum* collagène D), avec un taux d'homologie de 54% est proche du gène *col-14* de *C. elegans*. Comme les deux gènes sont caractérisés par une organisation décrite jusqu'à maintenant uniquement chez *col-14*, une nouvelle classe (B.1) de collagènes de la cuticule des nématodes a été proposée.

Ce travail, montre encore une fois que la cuticule est conservée au sein du phylum des nématodes. Indirectement il a également permis de vérifier que *A. suum*, un parasite intestinal du porc et *B. pahangi* une filaire lymphatique du chat et du chien, transmise par un moustique, sont des espèces ayant un ancêtre commun. Des expériences supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour cerner la cuticule, les variations de sa composition au cours du développement de l'animal, l'organisation et les interactions entre ses protéines, et ces fonctions précise entre autres lors de l'invasion de l'hôte.

SUMMARY

Nematodes constitute one of the most abundant groups of animals. Their filiform morphology has enabled them to colonise all environments. Moreover, several species are parasitic in insects, vertebrates or plants. These roundworms are entirely covered by a layer of proteins, the cuticle. This extra-cellular matrix consists of several layers that preserve the nematode from the adverse conditions of the environment and is the site of important exchanges. In parasitic species it constitutes an interface between the nematode and its host, i.e. a barrier between the worm and the vertebrate's immune response. The interactions occurring between the parasite and its host play a key role for the success of the infection, and the cuticle is definitely the site of these interactions. Most studies have been carried out on the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. The cuticle essentially consists of nematode-specific collagens (> 80%) which can be solubilised by the conjunct use of a detergent (SDS) and a reducing agent (β -mercaptoethanol). The remaining constituents (< 20%) represent insoluble proteins, mostly unidentified so far, called cuticlins. Both protein-types are strongly associated with covalent bond: disulphide bonds as well as polyphenols (di- and isotri-tyrosines). Studies performed to this day have demonstrated that the structure and composition of the cuticle are highly conserved among different species. The goal of this present work was to study the proteins of the cuticle from different nematodes in order to contribute to a better understanding of this complex matrix which enables the parasitic worm to both invade and live within its host while evading its immune system.

Experiments aiming to compare the protein composition of the cuticle from the free living nematode *Caenorhabditis elegans* and the intestinal parasite of swines *Ascaris suum* have been carried out. The resulting profiles differ substantially in that the collagens from *Caenorhabditis elegans* don't appear as monomers and seldom appear as dimers whereas collagens from *Ascaris suum*, although mostly present in the form of trimers, are also present in the other two forms. It thus appears that the triple-helix forming peptides are more strongly associated in free-living nematodes.

Due of their insolubility, cuticlins have been studied very little to this day. Because the work performed by Marco Bisoffi had resulted in the isolation and partial characterisation of the *Ascut* gene coding for a cuticlin from the epicuticle of *A. suum*, further analyses were undertaken. The presence of a single copy of this gene in genomic DNA extracts from *A. suum* digested with various enzymes has been demonstrated by hybridisation techniques.

A cDNA bank from the hypodermis of adult *A. suum* parasites was amplified by PCR and scanned using hybridisation techniques. As a result, two new genes were isolated and sequenced. As was deduced by their DNA sequences, both proteins display the typical organisation of collagens of the cuticle of nematodes. They contain triple-helical regions with a glycine residue at every third amino-acid position, which are analogous to those of vertebrate collagens, interrupted by non-helical cysteine-rich regions. One gene, *Ascol-C* (standing for *Ascaris suum* collagen C) corresponds to the *Bpcol-1* gene described from *Brugia pahangi*, a filaria from cats and dogs in Malaya (with a homology rate of 77%). The genomic sequences of *Ascol-C* and *Bpcol-1* both exhibit three introns at strictly identical locations. The high rate of homology along with the conserved location of introns strongly suggest both genes to be orthologous. This protein was expressed in *Escherichia coli* in the form of a fusion protein with Glutathione-S-transferase. In order to establish its collagenous nature two tests were performed. First the fusion protein was treated with a collagenase and secondly, after transfer on a nitrocellulose membrane, it was revealed using antibodies directed against collagens from the cuticle of *B. pahangi*. The second gene, *Ascol-D* (standing for *Ascaris suum* collagen D), with a homology rate of 54%, rather matches the *col-14* gene of *C. elegans*. Since they are both characterised by an organisation of their cysteine residues described so far exclusively in *col-14* from *C. elegans*, a new class (B.1) of cuticular collagens from nematodes has been proposed.

This work once more demonstrates that the cuticle is conserved within the phylum of nematodes. Indirectly, it also established that *A. suum*, an intestinal parasite of swines, and *B. pahangi*, a lymphatic filaria of cats and dogs transmitted by a mosquito, are species that share a common ancestor. Further analyses are nevertheless essential to understand the cuticle, its variations in composition during the development of the worm, the organisation and interactions of its proteins, and these very functions in particular during the invasion of the host.

ABRÉVIATIONS

Ascut	<i>Ascaris suum</i> cuticline
β -gal	β -galactosidase
BME	β -mercaptoéthanol
bp	paires de bases
Bpcol-1	<i>Brugia pahangi</i> collagène 1
AA	acide aminé
ADNc (cDNA)	ADN complémentaire
EDTA	ethylenediaminetetra-acetic acid
ADNg (gDNA)	ADN génomique
CTAB	cetyltrimethyl ammonium bromide
GST	gluthation S-transférase
IPTG	isopropyl- β -thiogalacto-pyranoside
kDa	kilo Dalton
mRNA	ARN messenger
nt	nucléotides
o/n	over night
PBS	phosphate buffer saline (eau physiologique)
PCR	polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaine)
PMSF	phenylmethyl sulphonyl fluoride
Polyclar AT®	polyvinylpyrrolidone insoluble dans l'eau
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	standard saline citrate
TCA	acide trichloroacétique
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galcto-pyranoside

CHAPITRE 1

Introduction générale

Les nématodes

Déjà mentionnés par les Egyptiens 1500 ans av. JC, les nématodes ont été décrits par Aristote (384-322 av. JC) et, il y a environ 2000 ans, Celsus les distinguait des vers plats [Croll, 1977].

Les nématodes sont des vers ronds et allongés, d'une taille se situant entre 0.3 mm et plus de 8.5 m (*Placentonema gigantissimum* dans le placenta des baleines). Avec un nombre total d'espèces estimé à 800'000, ce phylum fait partie de ceux qui comptent le plus grand nombre d'individus. Près de 80'000 espèces ont été décrites, dont environ 49% de parasites très répandus. Les nématodes ont colonisé des milieux très divers et parasité tous les types d'êtres vivants. Ils sont présents dans les sol humides, dans les eaux douce et salée et, si l'on tient compte des parasites d'oiseaux ou d'insectes, ils ont même, en quelques sorte, colonisé les airs [Bird, 1971]. En ce qui concerne les espèces parasites, leurs hôtes se comptent parmi les vertébrés, y compris l'homme, les invertébrés et également parmi les végétaux [Croll, 1977].

Leur morphologie, ainsi que la fréquence de régimes saprophages chez de nombreuses espèces libres, les prédestinaient à une évolution vers le parasitisme [Bird, 1971]. En effet leur forme circulaire, fine et allongée, leur a permis de coloniser des environnements étroits tels que l'intestin, les vaisseaux sanguins et lymphatiques de leur hôte.

Mais ce qui leur a en effet donné la possibilité, après s'y être installés, de vivre dans des milieux aussi hostiles (enzymes digestives, anticorps, macrophages...), c'est la présence d'une couche externe protectrice: **la cuticule**. Cette gaine de protéines qui entoure complètement le ver, joue un rôle important de barrière entre l'animal et le milieu environnant [Bird & Bird, 1991].

Systematique

La classification des nématodes suscite encore aujourd'hui beaucoup de débats. Toutefois, en général, on accepte la séparation en deux classes selon la suggestion de Maggenti [1981], dont on peut retenir les caractéristiques facilement identifiables suivantes:

Classe des Adenophorea (ou Aphasmida)

- phasmides (= chémorécepteurs) absents
- chez les mâles généralement deux testicules

Classe des Secernentea (ou Phasmida)

- phasmides présents en position postérieure à l'anus

- chez les mâles généralement un seul testicule et des alae caudales désignées sous le nom de bursa copulatrix

Il est intéressant de mentionner que les Adenophorea, regroupent des espèces généralement marines ou libres. Quant aux Secernentea, ils englobent la plupart des espèces libres terrestres et des parasites (Table 1).

Table 1 Classification des nématodes (Selon Mehlhorn, 1988)

Sélection de quelques ordres et espèces parasites et du nématode libre <i>Caenorhabditis elegans</i>			
Classe	Ordre	Famille	Genre Espèce
Adenophorea	Trichocephalida	Trichuridae	<i>Trichuris sp.</i>
		Trichinellidae	<i>Trichinella sp.</i>
	Mermithida	Mermithidae	
Secernenta	Rhabditia	Rhabditidae	<i>Rhabdias bufonis</i> (parasite de la grenouille) <i>Caenorhabditis elegans</i> (libre dans le sol)
	Strongylida	Strongyloididae	<i>Strongyloides stercoralis</i>
		Ancylostomatidae	<i>Ancylostoma sp.</i> , <i>Necator sp.</i>
		Trichostrongylidae	<i>Trichostrongylus sp.</i> , <i>Haemonchus contortus</i>
		Dyctiocaulidae	<i>Dictyocaulus sp.</i>
	Ascarida	Ascarididae	<i>Ascaris suum</i>
		Toxocarididae	<i>Toxacara sp.</i>
		Oxyuridea	<i>Enterobius vermicularis</i>
	Spirurida	Filariidea	Filaires: <i>Acanthocheilonema vitae</i> , <i>Brugia pahangi</i> , <i>Onchocerca volvulus</i>
	Camallarida	Dracunculoidea	<i>Dracunculus medinensis</i>
Diplogasterida		Parasites d'insectes	
Aphelenchida		Parasites de plantes et d'insectes	
Tylenchida		Parasites de plantes et d'insectes	

CHAPITRE 1

Une étude moléculaire portant sur les relations entre les modes trophiques des différentes espèces et leur positions respectives dans la systématique a été entreprise par Blaxter et collaborateurs [1998]. Les résultats qu'ils ont obtenus, malgré le nombre restreint d'espèces considérées et l'absence de donnée sur certains nématodes importants, telle que *Onchocerca volvulus*, restent dans les grandes lignes en accord avec les systèmes de classifications précédemment admis.

Morphologie

Les nématodes sont en général dioïques et, chez de nombreuses espèces, il existe un dimorphisme sexuel marqué. Le mâle est, le plus souvent, plus petit que la femelle et ils peuvent posséder tous les deux des organes copulateurs (bursa copulatrix et spicules, vulve). Ce sont des pseudocœlomates à symétrie bilatérale, possédant pour la plupart un tube digestif complet muni d'un anus en position subterminale. La bouche est spécifique en fonction du régime alimentaire (sang, contenu intestinal, mucus, bactéries...). Le système excréteur lorsqu'il est présent se vide par des pores situés en position ventromédiane. Les systèmes respiratoire et circulatoire manquent. Le corps, rond et allongé, de symétrie bilatérale, est entièrement recouvert par une cuticule typique de nature protéique, sécrétée par un hypoderme lors de chaque mue. Les mouvements sont dus à des cellules musculaires longitudinales typiques, qui en association avec le liquide pseudocœlomique et la pression de la cuticule, jouent le rôle d'exosquelette.

Plus simplement, un nématode pourrait être décrit comme deux tubes séparés par un pseudocoelom dans lequel se trouvent les gonades au stade adulte. Le tube interne correspond au système digestif et le tube externe est constitué des muscles, de l'hypoderme et de la cuticule (Fig. 1).

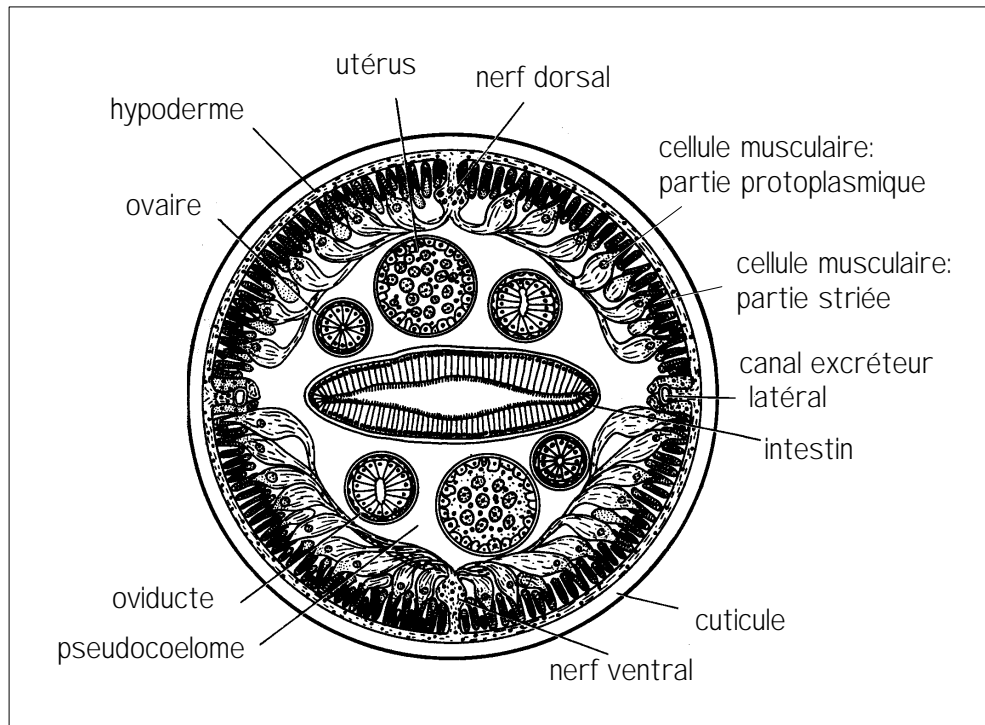


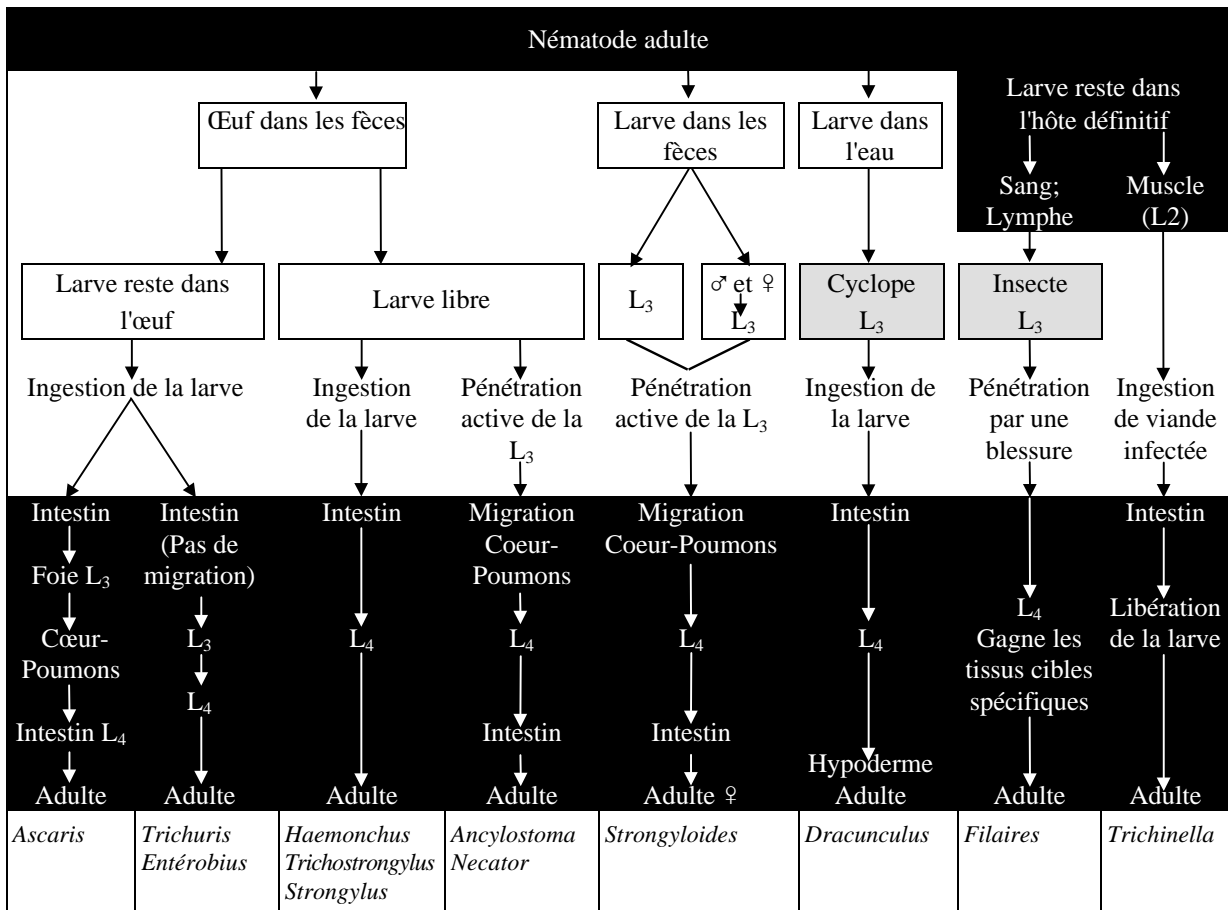
Fig. 1. Coupe d'une femelle d'*Ascaris suum* [d'après Smyth, 1994]

Développement

Mis à part chez quelques espèces (par exemple: *Strongyloides spp.*), l'ontogenèse des nématodes consiste en une série de mues impliquant 4 stades, que l'on qualifie de larvaires, bien qu'ils ne comportent pas de métamorphose. A l'exception du système reproducteur, de l'intestin, de l'épiderme et de la musculature somatique, la multiplication des cellules après l'éclosion est très réduite.

Dans l'ensemble, les développements des différentes espèces suivent un schéma similaire: après l'éclosion, une série de mues permet au ver d'atteindre le stade adulte mature. Une étude plus minutieuse des cycles met en évidence différentes stratégies dépendant du milieu environnant selon que l'espèce est libre, parasite de plantes, d'invertébrés ou de vertébrés.

Chez les parasites d'animaux, différents modes de transmission sont utilisés (Fig. 2), les œufs ou larves sont transmis soit directement (monoxénie), soit par l'intermédiaire d'un vecteur invertébré. Chez de nombreuses espèces, le troisième stade larvaire revêt un rôle important, soit de résistance à de mauvaises conditions de l'environnement, soit de transmission à l'hôte (larve infectieuse).



■ : Hôte définitif ■ : Hôte intermédiaire □ : Phase libre

Fig. 2. Représentation schématique des cycles des nématodes parasites d'animaux les plus importants (Selon divers auteurs).

La cuticule

Rôle et importance de la cuticule

De nombreux groupes de recherches se sont déjà intéressés à la cuticule des nématodes. Il s'agit d'une couche de protéines extracellulaire [Bird, 1971] qui entoure complètement ces vers. La cuticule peut être recouverte d'une couche de sécrétions supplémentaire, tels que des antigènes de surfaces [Page *et al.*, 1992]. Chez certaines espèces, une larve peut conserver, sous forme de gaine, des portions de cuticule du stade précédent [Zahner *et al.*, 1995]. C'est le cas, par exemple, des microfilaires du genre *Brugia*. Toutefois, la cuticule a souvent été décrite comme étant la surface externe des nématodes. Dans le cas des espèces parasites, cette surface est en contact direct avec l'hôte. Elle est, par conséquent, le siège des interactions hôte-parasite [Ogilvie *et al.*, 1980].

Propriétés et uniformité de la cuticule

Lors de chacune des quatre mues que subit un nématode au cours de son développement, la cuticule est à chaque fois synthétisée à nouveau. Les protéines de la cuticule sont toutes produites et sécrétées par l'hypoderme, qui représente la couche cellulaire la plus externe d'un nématode [Wright, 1987]. La cuticule, en tant qu'exosquelette, confère une assise rigide et élastique aux muscles lors du déplacement. Elle protège l'animal de la dessiccation et des invasions de micro-organismes (champignons et bactéries). De plus, il s'agit également d'une barrière sélective dans la nutrition et la sécrétion de métabolites. Les études menées sur *Brugia sp.* ont montré que le glucose, les acides aminés et l'adénosine passent à travers la cuticule. Cependant, parmi toutes les fonctions de cette gaine de protéine, celle qui prédomine est la protection du ver contre les agressions de l'environnement externe, en particulier chez les parasites. Ils doivent faire face aux réactions des différents tissus de l'hôte, comme le tube digestif, les systèmes sanguins et lymphatiques, les couches profondes de la peau et les systèmes immunitaires qui leur sont associés [Ogilvie *et al.*, 1980].

Selon le milieu auquel les espèces ont dû s'adapter, on observe de nombreux cycles de vie très différents chez les nématodes (voir chapitre précédant sur le développement). Malgré ces divergences, ces animaux démontrent une grande similarité dans leur développement et dans

leur structure. Cette constatation est également valable en ce qui concerne la formation et la structure de la cuticule. Josse et Harrington [1964] avaient déjà montré que la cuticule était constituée en majorité par des collagènes. Fujimoto et Kanaya [1973], quant à eux, ont mis en évidence la présence de protéines non-collagènes qu'ils ont appelées "cuticlène".

Bien que présentant des variations entre les différentes espèces et entre les stades de développement d'une même espèce, l'organisation de la cuticule est similaire chez tous les nématodes, aussi bien chez les espèces parasites que chez les vers libres [Politz & Philipp, 1992]. D'un stade à l'autre, au sein d'une même espèce, l'importance relative de chaque couche va évoluer, mais toujours selon un même schéma (Fig. 3 et 4) [Cox *et al.*, 1981c]. Il consiste en une série de couches basales soutenant les couches médianes et corticales, le tout étant recouvert par une couche corticale externe, l'épicuticule [Bird & Bird, 1991].

Les variations de l'organisation et du nombre des couches vont dépendre en grande partie de l'environnement propre à chaque stade dans lequel se trouve le ver. En règle générale chez les espèces libres l'épaisseur de la cuticule augmente d'un stade à l'autre, sans subir de transformations importantes [Leushner *et al.*, 1979]. Chez les espèces parasites, la composition et l'organisation des couches composant la cuticule vont varier plus fortement car le ver doit faire face à des environnements très différents au cours de son cycle. *Caenorhabditis elegans* se rapproche de ces derniers (Fig. 4), et certains auteurs pensent qu'il s'agit là d'une espèce qui est retournée à une vie libre secondairement [Cox *et al.*, 1981c].

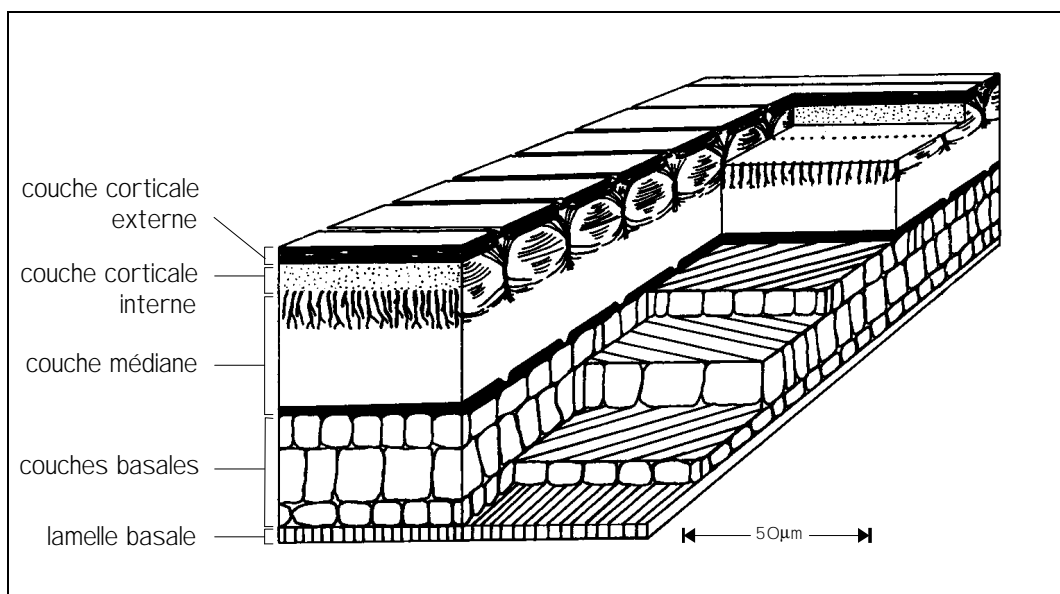


Fig. 3. Schéma de la cuticule d'*Ascaris* adulte. [d'après Bird, 1971]

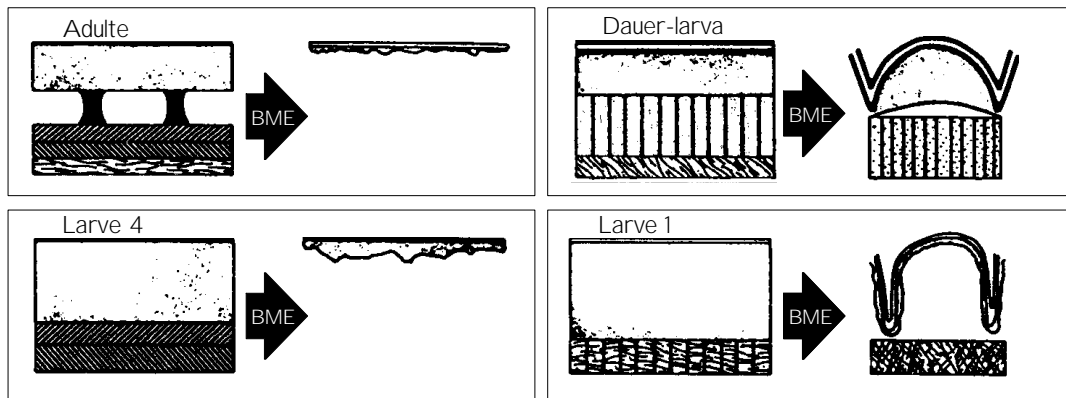


Fig. 4. Schéma des couches constituant la cuticule des différents stades de *Caenorhabditis elegans*, avant et après traitement au β -mercaptoethanol (flèche noir). Adapté d'après Cox et al., 1981c.

Les collagènes cuticulaires

Les collagènes présents chez les nématodes, tout comme ceux des vertébrés, sont caractérisés par des motifs d'acides aminés répétitifs, $(\text{Gly-X-Y})_n$, où X et Y représentent n'importe quel acide aminé, mais plus souvent la proline ou l'hydroxyproline. Cette séquence permet l'association de 3 chaînes de polypeptides, et est responsable de la structure triple-hélicale typique des collagènes. Chez les nématodes, deux types de collagènes ont été identifiés: les collagènes de membranes basale et ceux de la cuticule. Les premiers présentent de nombreuses similarités avec les collagènes des membranes basales des vertébrés. Par contre, les collagènes de la cuticule se différencient des collagènes épidermiques ou interstitiels des vertébrés par deux points importants [Cox, 1990]. Premièrement, ils sont plus petits (30 kDa contre 150 kDa chez les vertébrés), deuxièmement, leur structure hélicale n'est pas continue. Ces caractéristiques en font une structure spécifique des nématodes.

Chez *C. elegans*, dont le génome a été entièrement séquencé, le nombre de gènes codant pour des collagènes cuticulaires est de 170 [The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998]. Ils sont répartis dans l'ensemble du génome. Les protéines codées par ces gènes ont une séquence primaire différente, mais elles présentent toute une structure commune. Elles comportent, plusieurs zones hélicales interrompues par des zones non-collagènes comportant des cystéines. Une structure de ce type a également été décrite chez un collagène spécifique du cartilage des vertébrés (type IX) [Ninomiya & Olsen 1984]. Les collagènes de la cuticule sont constitués d'environ 300 acides aminés, dont approximativement la moitié font partie des zones répétitives $(\text{Gly-X-Y})_n$. Selon la description faite par Cox en 1990, la protéine peut être divisée en 5 domaines (Fig. 5). D'un gène à l'autre, les tailles des différents domaines sont similaires,

mais non-identiques. Les régions B et D sont des zones triple-hélicales, respectivement de 9 à 11 et de 40 à 42 triplets (Gly-X-Y)_n, typiques des séquences de collagènes. Le domaine D de chaque protéine comporte, dans sa région centrale, une interruption de la séquence (Gly-X-Y)_n de 2 à 8 acides aminés. Certains gènes présentent en plus une ou deux interruptions de cette zone.

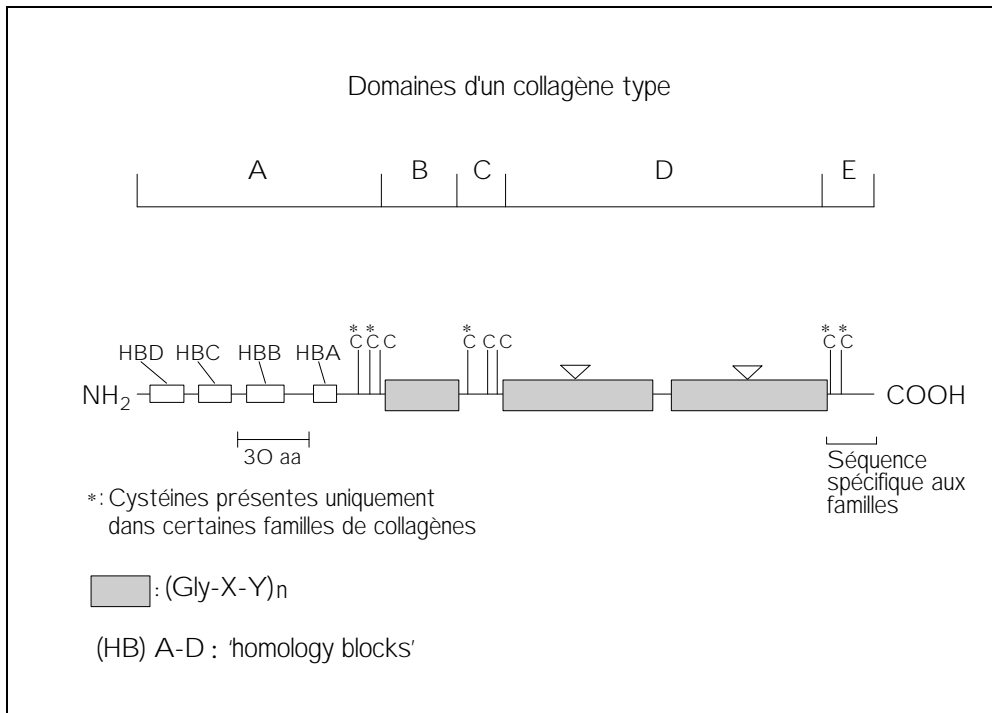


Fig. 5. Représentation schématique d'un collagène type de la cuticule de *Caenorhabditis elegans*. Les deux triangles indiquent les positions d'interruptions supplémentaires. Adapté selon Cox, 1990 et Kramer, 1994.

Les domaines A, C et E, quant à eux, représentent des zones non-hélicales. Les acides aminés impliqués dans des liaisons entre les protéines (cystéine et tyrosine) sont essentiellement localisés dans les domaines non hélicaux. Le domaine A est celui qui varie le plus en taille, il comprend entre 101-216 acides aminés et possède 4 régions conservées ('homology blocks') dans la majorité des collagènes de la cuticule de *C. elegans*, désignés par (HB) A à D (Fig. 5) [Kramer, 1994]. Le domaine HBD, à l'extrémité N-terminale correspond à une région d'acides aminés hydrophobes, qui pourrait jouer le rôle de séquence signal pour le transport extra-cellulaire [Cox, 1990, Kramer, 1994]. L'HBC contient des sites de clivage potentiels pour des peptidases. La région HBB contient un tryptophane, dont la fonction est inconnue, conservé dans la majorité des collagènes. Chez les vertébrés, le tryptophane est absent des collagènes. Le quatrième domaine (HBA) contient un site de reconnaissance pour une protéine

protéolytique du même type que la subtilisine [Ray & Hussey, 1995]. Le domaine A présente en plus 3 cystéines proches les une des autres, dont une occupant toujours la troisième position précédent le premier triplet (Gly-X-Y)_n du domaine B. Le domaine C varie de 12 à 21 acides aminés et contient 2 cystéines conservées. Parfois une troisième cystéine peut être présente à une localisation également conservée.

Les études traitant de la production et surtout des mécanismes d'assemblage des collagènes de nématodes sont encore rares. Il est possible, néanmoins de spéculer en étudiant les analogies de structures avec les collagènes de vertébrés déjà bien étudiés. Chez ces derniers, il a été démontré que la séquence primaire des protéines (procollagènes), ainsi que le nombre et les positions des cystéines de la région carboxyle étaient conservés au sein d'un même type de collagènes [Vuorio & de Combrughe, 1990]. Ce fait implique que seuls des collagènes appartenant à la même famille peuvent former ensemble des triples-hélices. La région non-hélicale C-terminale (pauvres en glycine, proline et hydroxyproline) des procollagènes fibrillaires joue un rôle important dans cette sélection, car les polypeptides individuels de collagène, s'associent tout d'abord grâce aux interactions de cette zone (ponts-disulfures entre les cystéines et liaisons covalentes entre les résidus lysyls) [Kühn, 1982; Stryer, 1988; Rawn, 1989].

Le domaine E des collagènes cuticulaires des nématodes pourrait jouer un rôle similaire, et les ponts disulfures qui s'y établissent, stabiliseraient les interactions initiales entre les polypeptides. Si l'on compare la structure de la zone triple-hélicale D avec les collagènes des membranes basales des vertébrés, par analogie, on peut penser que les interruptions dans la séquence (Gly-X-Y)_n servent à rendre plus flexibles les triples-hélices formées par ces protéines.

La disposition des cystéines, tout comme dans le cas des collagènes de vertébrés, implique que seuls des collagènes cuticulaires présentant les mêmes profils de cystéines peuvent former ensemble des triples-hélices. Le modèle proposé par Mc Bride et Harrington en 1967, suggérait que ces protéines extracellulaires formaient une structure triple-hélicale en se repliant sur elles-mêmes. Ce n'est qu'en 1990 que Betschart et Wyss ont montré chez *A. suum*, que les chaînes se formaient grâce à l'assemblage de trois monomères. Les polymères ainsi formés présentaient une taille de 47 nm, taille qui par la suite a été confirmée par des études de cryofracture [Martinez & de Souza, 1997]. Betschart et Wyss [1990] ont également démontré

que les fibres de collagènes de *Ascaris suum* étaient constituées par l'association bout à bout des dits trimères.

Chez *C. elegans*, 5 classes de gènes codant pour des collagènes ont été identifiées [Johnstone, 1993] (Fig. 6). Selon Kramer [1994], une sixième classe comprenant les gènes *col-8*, *col-19* *col-35* et *col-39* de *C. elegans*, peut être définie.

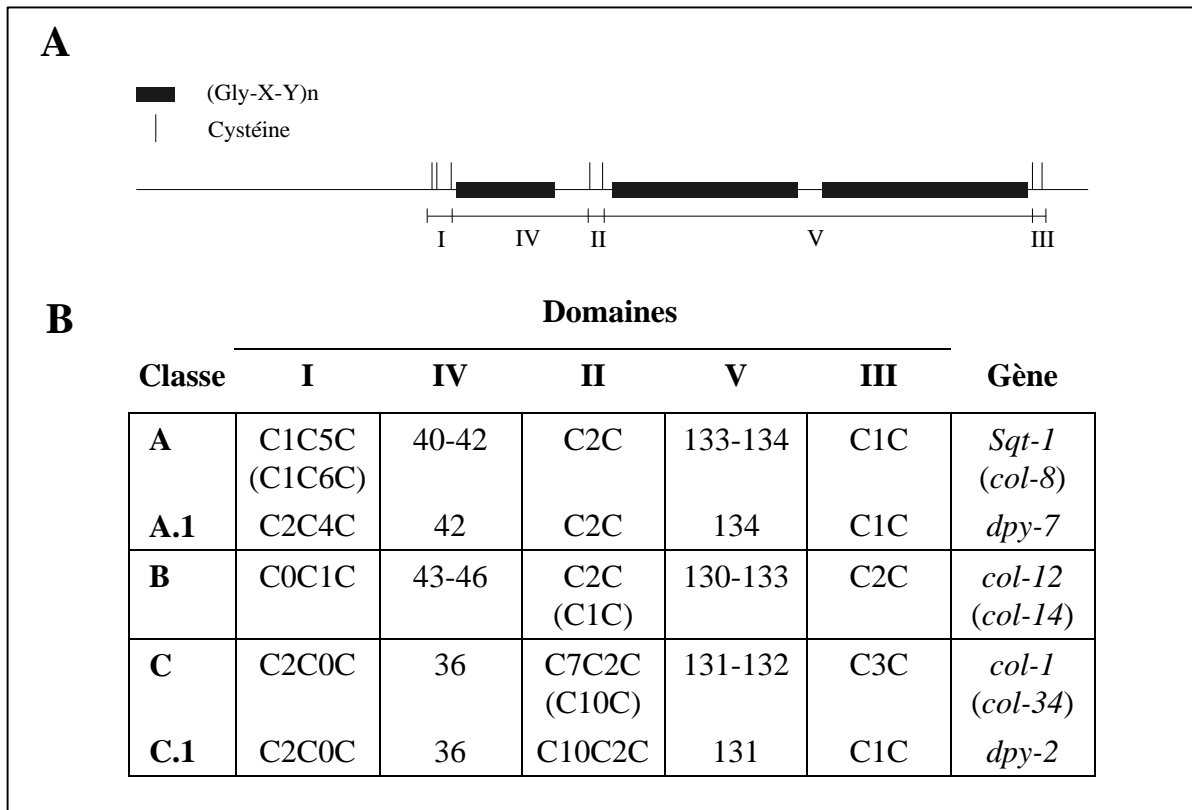


Fig. 6. Représentation des différentes classes de collagènes. **A.** Schéma d'un collagène de la cuticule typique. **B.** Comparaison des différentes familles de collagènes décrites chez *C. elegans*. Les domaines I, II et III, représentent les motifs de cystéines conservés au sein d'une même classe. Les domaines IV et V contiennent les zones Gly-X-Y, additionnées courtes séquences non Gly-X-Y. Les chiffres correspondent au nombre acides aminés. Les motifs entre parenthèses des régions I et II indiquent des variations au sein d'une même classe. Adapté selon Johnstone, 1993.

Les cuticlins

Contrairement aux collagènes sur lesquels de nombreuses recherches ont été effectuées [Cox, 1992], les données concernant les protéines non-collagènes de la cuticule sont encore aujourd'hui rares. En 1973, Fujimoto et Kanaya, après traitement des cuticules d'*Ascaris* avec

des détergents associés à des agents réducteurs de ponts-disulfures et à des collagénases bactériennes, isolent une fraction non soluble. Ils nomment ces protéines ‘**cuticline**’.

La présence de protéines de structures n'ayant pas les caractéristiques des collagènes était déjà connue depuis longtemps. En effet, en 1942 déjà, Campbell réalisait des immunisations du cochon d'Inde avec une fraction insoluble de la cuticule d'*A. suum*. Pour lui, cette fraction était constituée de kératine. Jusqu'à aujourd'hui, la présence de kératine chez *Ascaris* n'a jamais été confirmée. Par contre il semble évident que les extraits utilisés par Campbell étaient constitués des mêmes protéines que les extraits obtenus par Fujimoto et Kanaya [1973].

Les composés désignés par le terme de cuticline, ont été étudiés par analyse chimique, microscopie électronique et diffraction aux rayons-X [Fujimoto & Kanaya, 1973]. Ces protéines contiennent 30% résidus prolyl. Cette valeur est comparable aux résultats obtenus lors de l'analyse des collagènes d'*Ascaris*, il faut toutefois remarquer l'absence d'hydroxyprolines chez les cuticlins. D'autre part, le taux de glycine et d'acides aminés basiques est faible. Des liaisons covalentes de deux types, impliquant 2 ou 3 tyrosines (di- et isotri-tyrosine), ont été identifiées. Les cuticlins, en raison de leur structure typique en microscopie électronique, ont pu être identifiées comme étant la fraction superficielle de la cuticule [Fujimoto & Kanaya, 1973]. En 1990, Betschart et collaborateurs, immunisent des souris avec des extraits purifiés de cuticline d'*Ascaris*. Ils démontrent une réaction hautement spécifique des anticorps polyclonaux contre la couche corticale externe de la cuticule d'*A. suum* et des réactions croisées avec les cuticules des filaires parasites *B. pahangi*, *Acanthocheilonema vitae* et *O. volvulus*.

Par la suite, différents gènes codant pour des portions insolubles non-collagènes de la cuticule ont été identifiés, tout d'abord chez *C. elegans*: *cut-1* [Sebastiano *et al.*, 1991] et *cut-2* [Lassandro *et al.*, 1994] puis chez d'autres nématodes. Un gène homologue de *cut-1* a été identifié chez le nématode phytopathogène *Meloidogyne artiellia* [De Giorgi *et al.*, 1996], chez *A. suum* [D'Auria *et al.*, 1998] et *B. pahangi* [Lewis *et al.*, 1998]. Un gène codant pour une protéine non-collagène d'un autre type (*Ascut*) a également été identifié chez *A. suum* [Bisoffi *et al.*, 1996]. Les auteurs ont montré par immunocytochimie que, bien que *Ascut* présente peu d'homologie avec les gènes décrits chez *C. elegans*, le produit de ce gène est localisé dans l'épicuticule insoluble de *A. suum*.

Caenorhabditis elegans: Développement et distribution

C. elegans est un petit nématode libre cosmopolite qui vit dans le sol où il se nourrit essentiellement de bactéries. Les adultes sont de deux sexes, mâle et hermaphrodite, tous deux d'une taille d'environ 1.5 mm. Les hermaphrodites produisent à la fois des œufs et des spermatozoïdes et peuvent se reproduire par auto-fertilisation. Les mâles, facilement reconnaissable des hermaphrodites, sont plus fins et possèdent une bourse copulatrice (Fig. 7). Ils ne représentent que 0.3-0.5 % de la population et peuvent fertiliser les hermaphrodites. Les hermaphrodites ne peuvent pas se féconder l'un l'autre [Wood, 1988].

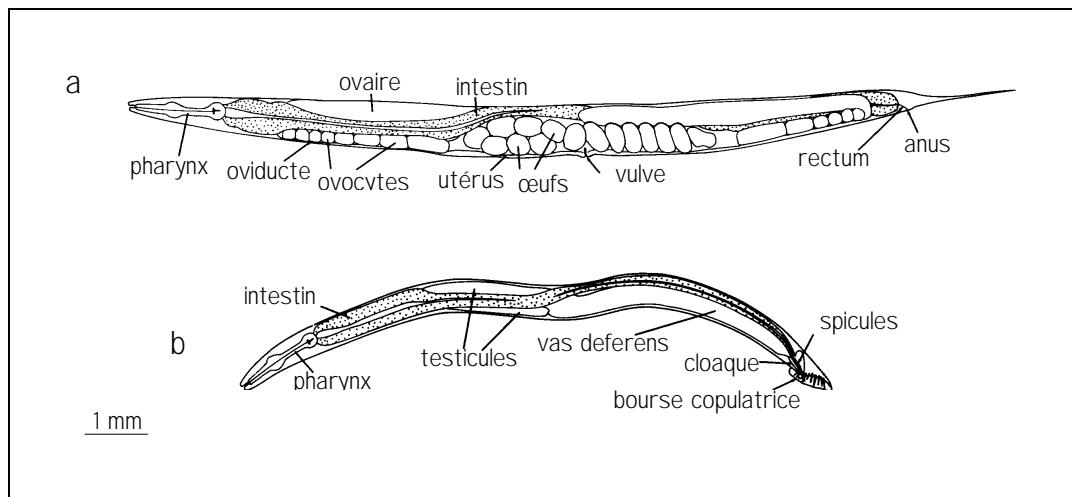


Fig. 7. Schéma d'une femelle (a) et d'un mâle (b) de *Caenorhabditis elegans*. Adapté selon Wood, 1988.

Dans des conditions optimales, le cycle dure environ trois jours à température ambiante. Il comporte quatre stades larvaires (Fig. 8), séparés par des mues, mais ne comportant aucune métamorphose. L'adulte mature est fertile durant 4 jours. L'hermaphrodite pond environ 300 œufs durant cette période. Lorsque l'environnement est défavorable (conditions climatiques, surpopulation, pénurie de nourriture), la larve 2 peut muer en une larve 3 modifiée, la "Dauer-larva". Ce stade larvaire qui ne se nourrit pas, présente une cuticule plus épaisse, et un métabolisme relativement bas. Lorsque les conditions redeviennent favorables, la larve mue en L4 et continue un développement normal [Wood, 1988]. Il est intéressant de constater que chez les nématodes parasites la L3 correspond au stade infectieux. La larve 3, qui est souvent un stade très résistant aux conditions externes, joue donc également un rôle important pour le maintien du cycle de *C. elegans*.

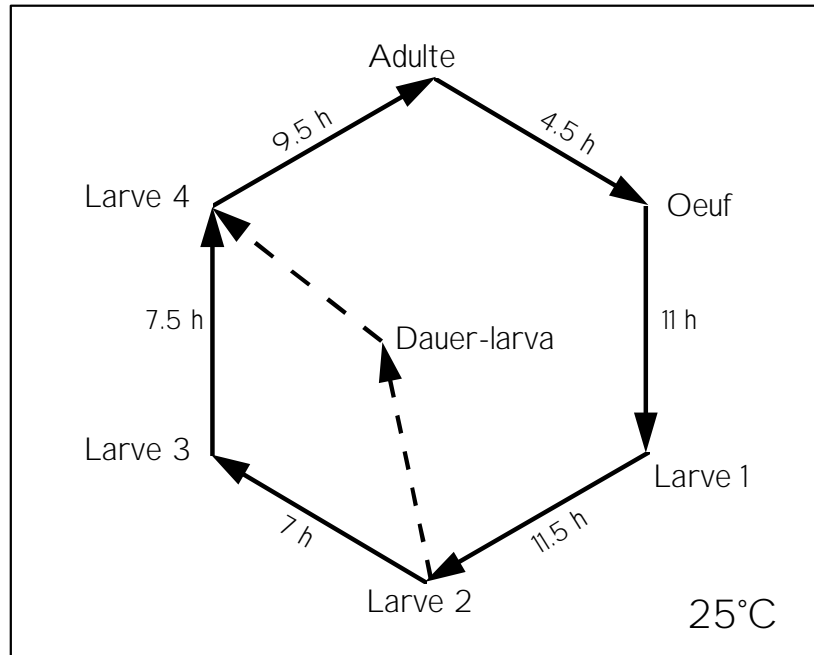


Fig. 8. Développement de *Caenorhabditis elegans*. Durée des différents stades à 25°C. Adapté selon Wood, 1988

C. elegans a été l'objet de nombreuses études. Il s'agit d'un animal simple, constitué de 959 ou 1031 cellules somatiques, respectivement pour l'hermaphrodite et le mâle. Il est transparent durant tout son cycle de vie, ce qui facilite son observation. De plus ce nématode est très facilement maintenu *in vitro*, soit sur un support solide (agar) ou en culture liquide. Différents mutants ont été obtenus [Wood, 1988]. Ils présentent des modifications morphologiques ou développementales, comme par exemple la souche *Daf 7* dont le deuxième stade larvaire mue en "Dauer-larvae" à 25°C, qui à leur tour muent en larves 4 lorsqu'elles sont soumises à un passage à 16°C.

La présence d'une larve 3 spécialisée ainsi que les variations importantes dans l'organisation des couches de la cuticule, peuvent suggérer que *C. elegans* est en fait un nématode parasite qui est retourné secondairement à une vie libre [Cox *et al.*, 1989.]. Cette hypothèse semble soutenue par le fait que, chez les Rhabditidae, on observe des espèces complètement libres, des espèces présentant des adaptations au parasitisme, des parasites facultatifs ou obligatoires, des espèces présentant une alternance de générations libres et parasites. Cet ordre pourrait être un pont entre un mode de vie libre et parasite. La simplicité de l'élevage de *C. elegans*, ainsi que les similarités de structure (cuticule) et de développement (L3 spécialisée) justifient, lors de certaines expériences, l'utilisation de *C. elegans* comme modèle *in vitro* de nématodes parasites.

***Ascaris sp.*: Développement et distribution**

L'ascaridiase est une parasitose intestinale qui se transmet par l'intermédiaire de sol et de nourriture contaminés par des matières fécales comportant des œufs d'*Ascaris sp.* En raison de sa grande taille, cette espèce était déjà connue des Egyptiens. Ce n'est pourtant qu'en 1683 qu'elle sera définitivement différenciée du ver de terre par Tyson [Grove, 1990]. La présence de deux espèces distinctes chez l'homme et le porc a été longtemps sujette à controverse. Anderson [1995] a montré qu'il n'y a pas de reproduction croisée et que les infections croisées, sous l'influence de facteurs génétiques et physiologiques de l'hôte et/ou du parasite, bien que possibles, restent rares. Actuellement on admet donc que: *Ascaris lumbricoides* infecte l'homme et *A. suum* le porc. Si la fertilité de *A. lumbricoides* chez le porc a été démontrée depuis plusieurs dizaines d'années [Galvin, 1968], la réciproque concernant *A. suum* chez l'homme, n'a été confirmée que très récemment par Anderson [1995]. Caldwell et Caldwell mentionnaient que dans une même région, bien que les porcs présentent un taux d'infection de 45 %, seul 1 % de la population humaine était infectée par *Ascaris sp.* Des études confirmant ces résultats ont été réalisées depuis dans d'autres parties du monde [Anderson *et al.*, 1993; Weidong *et al.*, 1996]. Il semblerait donc que, même si la possibilité d'une infection de l'homme par l'ascaris du porc ne peut pas être complètement écartée, le risque présenté pour l'homme par *A. suum* est peu important, voire inexistant.

En ce qui concerne l'homme, comme la plupart des parasitoses, l'ascaridiase touche les couches de la population les plus défavorisées. Cette infection parasitaire a lentement disparu des régions où le traitement des eaux usées a été introduit et où le niveau de vie s'est élevé. Elle reste toutefois la parasitose la plus répandue dans le monde et est susceptible d'être réintroduite dans des pays où elle avait disparu, si les conditions redeviennent favorables.

Dans les pays tropicaux et subtropicaux, l'infection par *A. lumbricoides* est un problème important qui vient se greffer sur les différentes carences dues à d'autres maladies, à la malnutrition et aux mauvaises conditions de vies. Le maintien du parasite est facilité par la simplicité de transmission, par le grand potentiel de reproduction et le temps de survie des œufs et des adultes (Table 2). De plus, une température élevée favorise un développement rapide des larves 1 et 2 et le fort taux d'humidité de ces régions augmente notablement la durée de vie des larves hors de l'hôte.

L'*Ascaris* présente un cycle monoxénique apparemment simple [Crompton *et al.*, 1985] qui implique quatre stades larvaires et des adultes immatures puis matures. Il y a quatre mues, et les sexes sont séparés. Mis à part la présence d'hôtes paraténiques (vers de terre, coléoptères du sol) chez *A. suum* [Urquhart *et al.*, 1989] (Fig. 9), les cycles de l'*Ascaris* de l'homme et du porc sont identiques.

Les œufs fertilisés, de forme ovale, mesurent 50-70 x 40-50µm. Ils sont pourvus d'une épaisse coquille transparente, légèrement brune, constituée de 4 couches. Ces différentes couches contiennent des mucopolysaccharides, des protéines, de la chitine et un lipide spécifique du genre *Ascaris*: l'ascaroside [Crompton, 1989]. Le développement embryonnaire et le passage du stade L1 au stade L2 ont lieu à l'intérieur de la coquille de l'œuf. Le développement des stades suivants (Larve 3, Larve 4, adulte), ainsi que la gamétogénèse, la fertilisation et la ponte, se déroulent à l'intérieur de l'hôte et nécessitent une migration complexe à travers différents tissus.

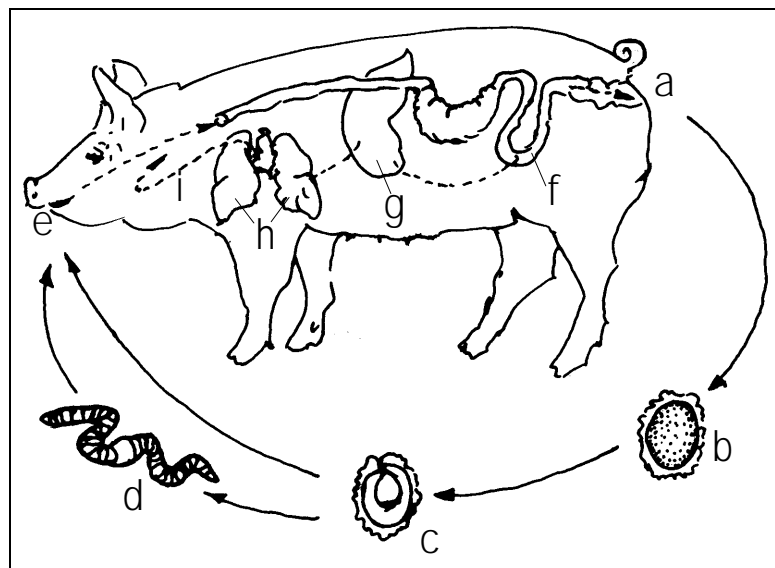


Fig. 9. Cycle de *Ascaris suum*. a. Œufs dans les fèces; b. Œuf embryonné; c. L1 dans l'œuf; d. Hôte intermédiaire invertébré; e. Ingestion des œufs; f.-i. Migration des larves à travers les tissus. Adapté selon Anderson 1992 et Urquhart *et al.*, 1989.

L'hôte s'infecte en ingérant les œufs embryonnés(e). La larve 2 éclôt dans l'intestin grêle (f). Elle force la paroi intestinale, entre dans le système porte hépatique, et rejoint le foie (g) 24 heures après l'infection. Une première mue se déroule alors (L2 \Rightarrow L3). (Dans le cas de *A. suum*, un hôte paraténique invertébré (d) contenant des L2 enkystées peut être ingéré. Les larves sont libérées des tissus durant la digestion. Par la suite, leur développement continue de manière classique.) Le troisième stade larvaire continue sa migration à travers le foie, le cœur

droit et les artères pulmonaires. La larve atteint les poumons 4 à 6 jours après l'infection (**h**). Elle rejoint la lumière des alvéoles en perforant les parois des capillaires alvéolaires. Elle migre ensuite le long des bronches pour rejoindre le pharynx, où elle est avalée pour la deuxième fois (**i**). Environ 2 semaines après l'infection, elle se trouve de nouveau dans la lumière de l'intestin grêle (**f**), où les deux dernières mues vont avoir lieu (L3 ⇌ L4; L4 ⇌ adulte). Après une phase de croissance et de maturation de 3 à 4 semaines, les adultes commencent à se reproduire. Le mâle est en général plus fin que la femelle. Il est facilement reconnaissable à son extrémité postérieure recourbée [Crompton, 1989]. Les œufs sont libérés dans les fèces (**a**), où ils vont subir l'embryogenèse suivie d'une mue (Œuf ⇌ L1; L1 ⇌ L2) (**b**; **c**). Durant ce parcours à travers son hôte, le ver est passé de 260-280 µm x 28 µm (L2 dans le foie) à 25-30 cm x 2-6 mm (adulte). Ce qui représente une croissance d'un facteur 10⁵.

Table 2 Développement d' *Ascaris lumbricoides* (selon Crompton *et al.*, 1985)

Durée des différentes phases				
	Stade	Activité	Localisation	Durée
Homme	Larves infectieuses (L3)	Invasion Migration	Intestin grêle Foie et poumons	14 jours
	Larves (L4) Adultes juvéniles	Croissance et développement	Intestin grêle	61 jours
	Adultes matures (♀ et ♂)	Croissance Survie Reproduction	Intestin grêle	~ 1 année
Environnement	Œufs fertilisés ¹	Survie Développement embryonnaire	Sol	
	Œufs avec larves (L1)			> 10 ans
	Œufs infectieux avec larves (L2)	Transmission passive à un nouvel hôte	Sol Mains Nourriture	Quelques semaines à plusieurs années

¹ Une femelle d'*A. lumbricoides* produit environ 200 millions d'œufs, dont 65 millions d'œufs fertilisés.

L'hypothèse d'une monoxénie secondaire, qui serait à l'origine de cette migration complexe a été avancée. L'hétéroxénie est un des caractères de base de la super-famille des Ascaridoidea.

La présence d'un hôte intermédiaire procure deux avantages au parasite: premièrement, le parasite se trouve directement dans la chaîne alimentaire de son hôte; deuxièmement, du fait de l'élimination de la phase de migration, la période prépatente est raccourcie de manière significative. Par analogie avec les cycles des *Ascarididae* parasites de carnivores qui présentent un passage dans un hôte intermédiaire, l'hypothèse de la perte de l'hôte intermédiaire durant l'évolution paraît évidente. Les espèces parasites d'hôtes non-carnivores (ex: *Ascaris sp.*), sont quant à elles monoxéniques. Elles sont probablement dérivées d'ancêtres qui infectaient des carnivores, et la perte de l'hôte intermédiaire, en raison d'un changement d'hôte définitif, les aurait obligées à effectuer la migration à travers les tissus de ce dernier [Anderson, 1992].

Le cas intéressant de *Toxascaris leonina* renforce cette hypothèse. Ce nématode, parasite des canidés et des félinés présente 2 cycles différents:

- a) l'infection se fait directement par les œufs contenant le deuxième stade larvaire, et les larves effectuent une migration à travers les tissus, similaire à celle observée chez *Ascaris*.
- b) un hôte intermédiaire (rongeur), ingère les œufs, les larves migrent à travers les tissus et stoppent leur développement au stade L3 (larve infectieuse). Lorsque le rongeur est mangé par l'hôte définitif, les larves libérées des tissus musculaires lors de la digestion, s'installent directement dans l'intestin, où elles terminent leur développement normalement (L3 ⇒ L4, L4 ⇒ adulte) [Anderson 1992].

Manifestations cliniques et traitement.

La grande majorité des infections sont asymptomatiques, car elles sont dues à des infections légères. Des infections massives peuvent conduire à des pathologies graves, pouvant parfois entraîner la mort du malade. La gravité des symptômes dépend de la quantité d'œufs ingérés et de l'existence ou non d'une infection plus ancienne. Un des principaux symptômes est dû à la migration des larves, qui induisent des réactions au niveau des tissus. Le premier signe clinique évident est dû à la présence des larves dans les poumons, il se manifeste 5 à 6 jours après l'infection sous forme d'une pneumonie accompagnée de toux et parfois de fièvre, ainsi que d'une éosinophilie élevée. Le foie peut également être lésé lors du passage des larves, mais les nécroses qui s'y développent passent en général inaperçues. La seconde phase clinique provient de la présence des adultes dans l'intestin. Lors d'infections légères, l'intestin grêle étant l'habitat normal des vers adultes, les signes cliniques sont restreints. Ils consistent essentiellement en une atrophie de la muqueuse intestinale entraînant des coliques, des pertes

d'appétit, de ballonnement et des problèmes de malnutrition et de carences en vitamines A et C. Dans les cas de forte parasitémie, on observe parfois des complications graves. La plus commune (75%) est l'obstruction intestinale, pouvant s'aggraver parfois en perforations de la paroi de l'intestin [de Silva *et al.*, 1997]. Les *Ascaris* adultes démontrent une tendance à la migration lorsque leur environnement est perturbé. En présence d'anesthésiques ou de forte fièvre, et lors de surcharge parasitaire, ils rejoignent des localisations aberrantes et provoquent ainsi des symptômes aigus provoqués par exemple par la présence des vers dans les canaux pancréatique ou biliaire. Aux Philippines, 20% des patients traités chirurgicalement pour des problèmes biliaires, présentent des *Ascaris*. Les abcès hépatiques quant à eux peuvent être dus à la migration de femelles dans le foie, à travers le canal biliaire [Manson-Bahr & Bell, 1987]. Dans des cas extrêmes les *Ascaris* envahissent même les sinus paranasaux [Naravane *et al.*, 1997].

Le diagnostic d'une infection par *Ascaris* peut être effectué simplement par l'observation d'adultes dans les selles ou par la recherche d'œufs dans les selles. Lors de la migration des larves, une forte éosinophilie, accompagnée de symptôme de pneumonie peut être détectée. En complément, des radiographies ainsi que des tests sérologiques peuvent être effectués. Il faut toutefois être conscient que la réponse immunitaire contre les adultes est faible et que de fortes réactions croisées sont observées contre d'autres nématodes [Manson-Bahr & Bell, 1987].

Bien que les ascaridiasés causent peu ou pas de pathologie, il est néanmoins important d'effectuer un traitement lorsqu'une infection est diagnostiquée. Le traitement est efficace uniquement contre les adultes et les médicaments les plus efficaces sont les benzimidazolés: mébendazole (Vermox®), flubendazole (Fluvermal®) et l'albendazole (Zentel®), le pamoate de pyrantel (Combatrim®) [Gentilini *et al.*, 1993].

***Brugia sp.*: Développement et distribution**

Les filaires sont des nématodes parasites des tissus et des espaces intertissulaires de toutes les classes de vertébrés, hormis les poissons. Les adultes étant localisés dans les tissus de l'hôte, ces espèces ont dû développer des moyens de transmission spécialisés. Elles sont toutes transmises par des arthropodes hématophages. Parmi les nématodes parasites de l'homme, huit espèces, toutes regroupées dans la famille des *Filariidea* (classe des *Secernentea*, ordre des *Spirurida*), sont responsables de "filarioses". Ces espèces sont les suivantes: *Brugia malayi*, *B. timori*, *Wuchereria bancrofti*, *O. volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *M. ozzardi* et *M. perstans* [Manson-Bahr & Bell, 1987].

Les pathologies développées lors d'une filariose lymphatique, causées par *W. bancrofti*, *B. malayi* et *B. timori*, étaient déjà connues dans l'antiquité. En 1863, le chirurgien J.N. Demarquay effectue une ponction sur un patient souffrant d'une tumeur au scrotum. L'observation du fluide récupéré indique la présence de nombreux parasites (des microfilaires) en addition des globules lipidiques, cellules purulentes et filaments de fibrine. Mais, en raison de sa petite taille, et de la présence d'un vecteur invertébré, ce n'est qu'en 1900 que le cycle est élucidé et que le moustique est identifié en tant que vecteur [Anderson, 1992].

Les filaires lymphatiques touchent les populations pauvres (zones rurales, bidonvilles) des régions tropicales et subtropicales (Fig. 10). Selon l'estimation de l'O.M.S., sur 118 millions de personnes infectées, près de 90% le sont par *W. bancrofti* et moins de 10% par *Brugia sp.*. La plupart des personnes infectées se trouvent en Asie et en Afrique, dont les deux-tiers en Chine, Inde et Indonésie.

Les deux genres présentent de grandes similarités, aussi bien concernant leur morphologie que leur cycle de vie. *W. bancrofti* est présent dans toutes les régions tropicales d'Afrique, d'Asie, de Chine, du Pacifique et d'Amérique. En règle générale, la transmission de l'agent infectieux a lieu la nuit, excepté dans le Sud-Pacifique, où les vecteurs sont des moustiques diurnes. Le seul hôte connu de *W. bancrofti* est l'homme. Le genre *Brugia* est confiné au sud et sud-est de l'Asie, de l'Inde à la Corée. Parmi les 8 espèces composant le genre *Brugia*, deux touchent naturellement l'homme: *B. malayi*, et *B. timori*. *B. malayi* infecte également différentes espèces de singes, le chat, le chien et d'autres animaux sauvages ou domestiques. *B. timori* touche essentiellement l'homme et a été rapporté uniquement dans quelques îles d'Indonésie. La transmission expérimentale à l'homme de *B. pahangi*, une filaire rencontrée chez les chats et les chiens, s'est parfois soldée par le développement d'une pathogénicité [Grove, 1990].

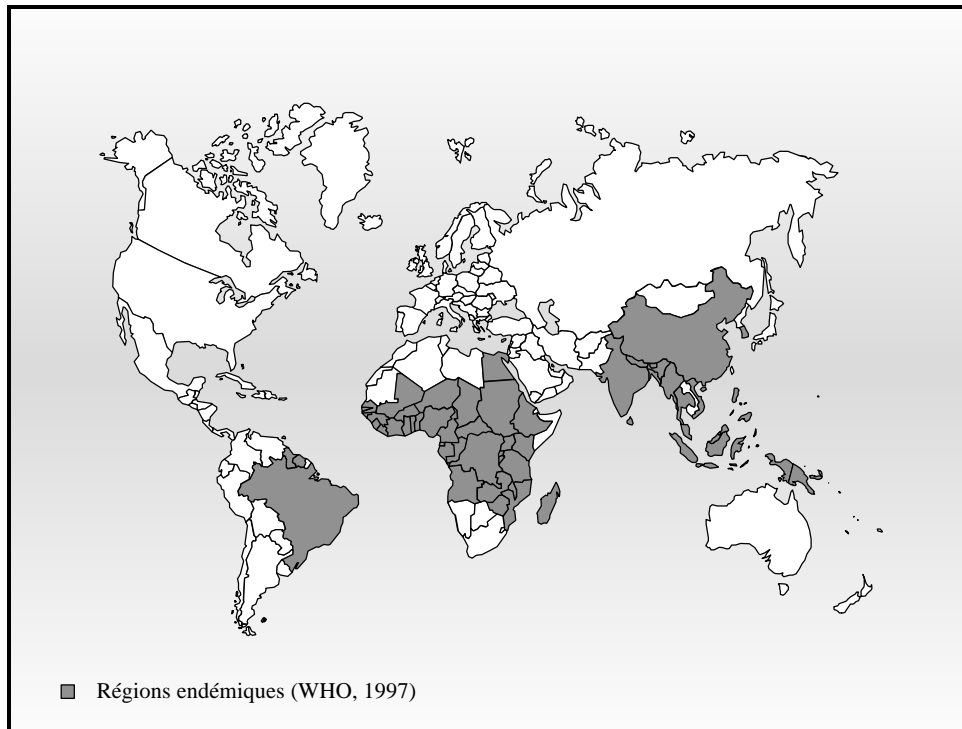


Fig. 10. Distribution géographique des filaires lymphatiques

Les filaires lymphatiques sont de petits nématodes. Les adultes, de 4 (σ) à 6.5 (♀)mm x 0.1 mm, sont localisés dans le système lymphatique de leur hôte, proche des ganglions lymphatiques. Le développement et la transmission des deux genres sont similaires (Table 3; Fig. 11). La femelle étant vivipare, les œufs éclosent dans la partie supérieure de l'utérus, à l'intérieur d'une membrane chorionique qui est conservée sous forme de gaine lors de la naissance des microfilaries. Les microfilaries (larves 1) peuvent persister 5-10 ans en l'absence de ré-infection. Elles sont localisées dans les artérioles des poumons (2). Elles démontrent une périodicité associée au comportement de nutrition des vecteurs (Table 4), qui se traduit par une migration dans les vaisseaux sanguins périphérique durant les heures d'activité de ces derniers. Lors du repas sanguin du moustique (3), les microfilaries sont ingérées avec le sang. Une heure après avoir été ingérées, les larves perforent leur gaine et, ainsi libérées, traversent la paroi de l'estomac. Elles passent dans l'hémolymphe et rejoignent les muscles thoraciques (4), où les larves s'épaississent et muent en larves 2 (forme saucisse). Ensuite, elles muent une deuxième fois. Chez l'homme ce troisième stade larvaire correspond au stade infectieux. Les larves 3 migrent vers la tête du moustique et entrent dans la gaine du proboscis (5).

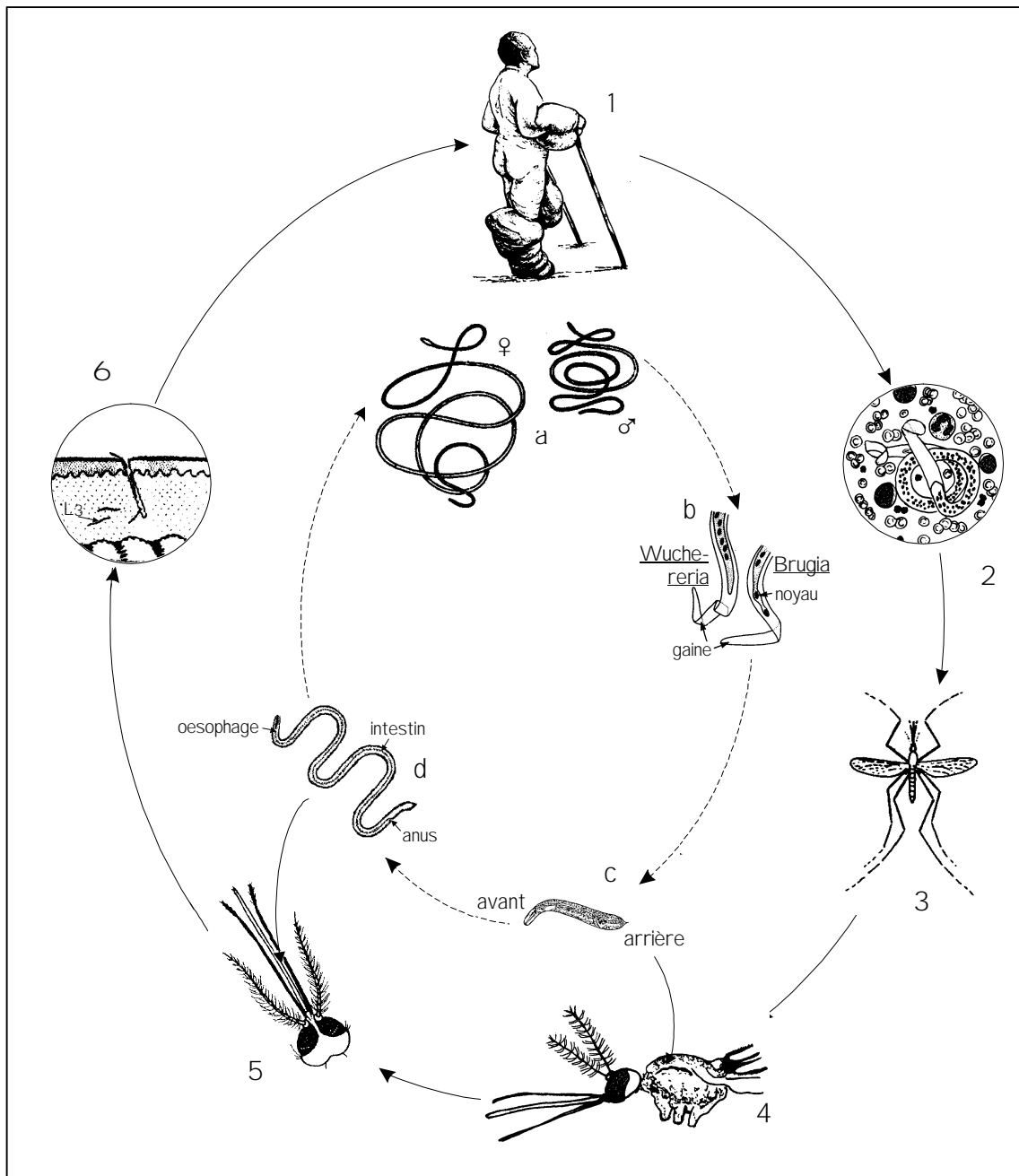


Fig. 11. Cycle de *Brugia sp.* 1. Eléphantiasis dû aux filaires adultes (a); 2. Présence des microfilaries dans le sang périphérique, b. Morphologie de l'extrémité postérieure des microfilaries (L1) chez les genres *Wuchereria* et *Brugia*; 3. Infection du vecteur invertébré lors du repas sanguin. 4. Migration de la larve dans les muscles thoraciques du moustique, suivie d'une 1ère mue en L2 (c) et d'une seconde en L3 (d); 5. Migration de la larve infectieuse (L3) dans les pièces buccales du moustique; 6. Pénétration des L3 dans l'hôte définitif par une lésion de la peau. Adapté selon Mehlhorn, 1988.

Les larves infectieuses vont quitter les pièces buccales du moustique lors d'un repas sanguin suivant et profiter d'une lésion de la peau, par exemple l'endroit de la piqûre, pour infecter le nouvel hôte (6). Dans des conditions optimales (température élevée et haut taux d'humidité), la

CHAPITRE 1

phase dans le vecteur prend 9-10 jours. Les larves infectieuses rejoignent les vaisseaux lymphatiques en passant par les vaisseaux sanguins périphériques, migrent vers le ganglion lymphatique le plus proche où elles effectuent les deux dernières mues (L3 ⇒ L4; L4 ⇒ adulte) et deviennent matures en 3-12 mois.

Table 3 Développement de *Brugia malayi* (Selon Manson-Bahr & Bell, 1987; Anderson, 1992)

Durée des différentes phases				
	Stade	Activité	Localisation	Durée
Homme	Larves 4 (L4) Adultes juvéniles	Migration Croissance et développement	Vaisseaux lymphatiques	♂ 23 jours ♀ 27-33
	Adultes matures (♀ et ♂)	Croissance Survie Reproduction (vivipare)	Vaisseaux lymphatiques	Ponte 1 an après l'infection pendant ~ 10 ans
	Larve 1 (L1)	Passage dans la circulation sanguine	Vaisseaux sanguins (Périodicité)	5-10 ans
Moustique		Passage dans le vecteur (moustique hématophage)	Intestin, perte de la gaine. Passage rapide dans l'hémolymphe (30-60 min.)	3 jours
	Larves 2 (L2)	Migration	Muscles thoraciques	2-4 jours
	Larves infectieuses (L3)	Infection Migration	Pièces buccales du vecteur	Infectieuse 9-10 jours après l'injection
Homme		Passage dans l'hôte définitif	Système lymphatique	8-9 jours

= phase dans le vecteur arthropode

Table 4 Développement des filaires lymphatiques (Selon Manson-Bahr & Bell, 1987; Anderson, 1992)

Hôtes principaux et vecteurs		
	Hôte mammifère	Moustique vecteur naturel
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Homme	<i>Anopheles spp.</i> <i>Aedes spp.</i> <i>Culex quinquefasciatus</i>
<i>Brugia malayi</i>	Homme , Singes (<i>Presbytis spp.</i> , <i>Macaca fascicularis</i>), chat...	<i>Anopheles spp.</i> <i>Mansonia spp.</i>
<i>Brugia timori</i>	Homme	<i>Anopheles barbirostris</i>
<i>Brugia pahangi</i>	Singes, félidés sauvages, chat, chien, etc. Homme??	Moustique spp.

Manifestations cliniques et traitement

Les manifestations cliniques chez l'homme sont semblables pour les trois espèces: *W. bancrofti*, *B. malayi* et *B. timori*. De nombreux malades ne présentent aucun symptôme durant des années, le seul signe de l'infection est la présence de microfilaries dans le sang. Cependant, de nombreuses pathologies peuvent se développer, déjà trois mois après la pénétration des larves. Une des premières manifestations est une lymphangite aiguë (inflammation du système lymphatique). Elle se déclare tout d'abord au niveau d'un ganglion lymphatique, puis se propage dans les vaisseaux lymphatiques périphériques. Elle s'accompagne de fièvres irrégulières similaires à celles provoquées par un accès de paludisme et de nausée (fièvres éléphantoides). Les vaisseaux lymphatiques sont douloureux et durs au toucher, puis se dilatent et développent un œdème, qui peut mettre plusieurs semaines à se résorber. Les manifestations cliniques les plus graves découlent du dysfonctionnement du système lymphatique. Elles se traduisent en lymphadénite (inflammation des ganglions lymphatiques), lymphangite aiguë, lymphodème, lymphocœle, chylurie (urine laiteuse, contenant des lymphocytes, de l'albumine, de la fibrine et des lipides) et des accidents génitaux aigus. Les lésions touchant les organes génitaux, en particulier l'hydrocœle du scrotum, sont caractéristiques de *W. bancrofti*. Le développement répété de lymphangites conduit au développement d'une réponse immunitaire excessive due à la présence des adultes et peut conduire à une pathologie spectaculaire: l'éléphantiasis. Lors de chaque attaque, l'œdème

s'amplifie et se résorbe plus lentement, jusqu'à ce qu'il devienne permanent. La peau distendue s'épaissit, devient verruqueuse. Une fibrose des vaisseaux lymphatiques se développe ainsi qu'une hyperplasie fibreuse des tissus subcutanés. Les membres inférieurs sont le plus fréquemment touchés, parfois en association avec une hypertrophie du scrotum (*Wuchereria*) ou des bras [Manson-Bahr & Bell, 1987].

Les microfilaires peuvent également être responsables de pathologies. Une réaction typique d'hypersensibilité, l'éosinophilie pulmonaire tropicale, est due à la présence des microfilaires dans les poumons de l'hôte. Elle se manifeste par des crises d'asthme nocturne, un nombre levé d'éosinophiles dans le sang et les tissus ainsi qu'un taux élevé d'IgE spécifique aux filaires [Manson-Bahr & Bell, 1987].

En ce qui concerne *B. pahangi*, le cycle chez le chat, bien que beaucoup plus rapide, est similaire à celui de *B. malayi* chez l'homme; le chat ne développe pas d'éléphantiasis. La courte durée de chaque phase, rend l'observation des symptômes difficiles. De plus, pour que des pathologies telles que l'œdème se déclarent, l'inflammation du système lymphatique doit persister suffisamment longtemps pour que les tissus se dilatent [Anderson, 1992].

Le diagnostic classique des filarioses lymphatiques est basé sur l'observation microscopique des microfilaires dans le sang [Manson-Bahr & Bell, 1987]. La recherche d'une microfilarémie doit tenir compte de son éventuelle périodicité. Malheureusement, la présence des microfilaires, n'est pas représentative de la gravité de l'infection car les larves sont parfois uniquement présentes lors des premiers stades de la maladie. L'observation directe des larves peut être renforcée par des analyses sérologiques [Weil, 1990], mais la recherche d'antigènes circulants ne permet pas d'établir un diagnostic sûr. La complexité de la réaction immunitaire de l'hôte envers les filaires et les problèmes de réactions croisées entre tous les nématodes rendent difficile l'interprétation d'un diagnostic sérologique [Gentilini et al, 1993].

Le traitement des manifestations cliniques est essentiellement symptomatique (repos, antalgiques, anti-inflammatoires, antihistaminiques). Les interventions chirurgicales sont en général effectuées uniquement dans de graves cas d'occlusion des vaisseaux lymphatiques. Lors de complications bactériennes, des antibiotiques peuvent être administrés (pénicillines). Lors d'une manifestation lymphatique aiguë, la prescription d'un filaricide est contre-indiquée car elle risque d'accentuer les symptômes.

En dehors des périodes aiguës de la maladie, le traitement consiste essentiellement en chimiothérapie dirigée contre les microfilaires. Les médicaments les plus utilisés sont la diéthylcarbamizine (DEC) qui possède également un effet macrofilaricide inconstant, et l'ivermectine (Mectizan®). Des dérivés antimoniés et arsenicaux présentent des effets macrofilaricides puissants. Ils sont malheureusement également toxiques pour le malade, et en outre, la mort brutale des filaires adultes peut être à l'origine de graves obstructions du système lymphatique.

L'obtention de données supplémentaires, s'ouvrant sur de nouvelles formes de diagnostics et surtout sur une lutte efficace contre les adultes semblent être une nécessité dans la lutte contre ces parasites.

Buts du travail

De nombreuses études ont démontré l'importance de la cuticule chez les nématodes, en tant qu'exosquelette et de barrière entre l'animal et l'environnement. Chez les espèces libres, comme *C. elegans*, elle protège le ver de la dessiccation, empêche l'invasion de micro-organismes (champignons, bactéries) et est le lieu de nombreux échanges avec l'extérieur [Bird, 1971]. Dans le cas des espèces parasites d'autres rôles viennent s'ajouter à ceux mentionnés ci-dessus pour assurer la survie du ver malgré les systèmes de défense de l'hôte. Ils doivent entre autre faire face à une agression supplémentaire: la réponse immunitaire de l'hôte dans lequel ils vivent et se reproduisent. Le succès de l'infection d'un hôte par un parasite dépend dans une large mesure de la réaction du premier lors de la détection du second [Ogilvie *et al.*, 1980]. La cuticule, en tant qu'interface entre le nématode parasite et son hôte, joue donc un rôle important lors de l'implantation et du maintien du parasite. Malgré les nombreuses études touchant aux domaines des nématodes, de nombreuses questions concernant le maintien d'un nématode parasite dans son hôte restent en suspens [Betschart, 1990].

Le but de ce travail était de contribuer à l'identification et à la caractérisation des protéines constituant la cuticule des nématodes. Des données nouvelles seraient susceptibles d'aider à mieux cerner les mécanismes permettant le maintien du nématode dans un hôte, et par là, d'induire de nouvelles voies dans la lutte contre ces parasites.

Deux aspects ont été abordés:

- Analyses complémentaires du gène *Ascut*, codant pour une cuticline, décrit par Bisoffi et collaborateurs chez *A. suum* [Bisoffi *et al.*, 1996].
- Etudes portant sur les similarités existant entre les collagènes de la cuticule de différents nématodes: *C. elegans*, *B. pahangi*, *A. suum*, dans le but de définir des épitopes utilisables dans un test de diagnostic.

Références

- Anderson R. C. 1992. Nematodes Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission. CAB International
- Anderson T. J. C, Romero-Abal M. E., et Jaenike J. 1993. Genetic Structure and Epidemiology of *Ascaris* Population: Patterns of Host Affiliation in Guatemala. *Parasitol.* 107, 319-334
- Anderson T. J.C. 1995. *Ascaris* Infections in Humans from North America: Molecular Evidence for Cross-Infection. *Parasitol.* 110, 215-219
- Betschart B. 1990. Structure, Molecular Biology and Immunology of the Cuticle of Parasitic Nematodes. *Acta Trop.* (Special Issue; Betschart B., ed.). 47, 251-418
- Betschart B. et Wyss K. 1990. Analysis of the Cuticular Collagens of *Ascaris suum*. *Acta Trop.* 47, 297-305
- Betschart B., Rudin W., et Weiss N. 1985. The Isolation and Immunogenicity of the Cuticle of *Dipetalonema vitae* (Filaroidea) *Z. Parasitenkd.* 71, 87-95
- Bird A. F. 1971. The Structure of nematodes. Academic Press, New York
- Bird A. F. et Bird J. 1991. In: The Structure of Nematodes, pp 44-77. Academic Press, San Diego
- Bisoffi M., Marti S. et Betschart B. 1996. Repetitive Peptide Motifs in the Cuticlin of *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80, 55-64
- Blaxter M. L., De Ley P., Gareys J. R., Liu L. X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J. R., Mackey L. Y., Dorris M., Frisse L. M., Vida J. T. et Thomas W. K. 1998. A Molecular Evolutionary Framework for the Phylum Nematoda. *Nature.* 392, 71-75
- Campbell D. H. 1942. Experimental Eosinophilia with Keratin from *Ascaris suum* and other sources. *J. Infectious Diseases.* 71, 270-276
- Cox G. N. 1992. Molecular and Biochemical Aspects of Nematodes Collagens. *J. Parasitol.* 78, 1-15
- Cox G. N. 1990. Molecular Biology of the Cuticle Collagen Gene Families of *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. *Acta Trop.* 47, 69-281

CHAPITRE 1

- Cox G. N., Kusch M., De Nevi K. et Edgar R. S. 1981a. Temporal Regulation of Cuticle Synthesis during Development of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 84, 277-285
- Cox G. N., Kusch M. et Edgar R. S. 1981b. Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: Its Isolation and Partial Characterisation. *J. Cell. Biol.* 90, 7-17
- Cox G. N., Staprans S. et Edgar R. S. 1981c. The Cuticle of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 86, 456-470
- Croll N. A. et Matthews B. E. 1977. *Biology of Nematodes*. Glasgow and London, Blackie
- 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 Ltd. London and Philadelphia.
- Crompton D. W. T., Nesheim M. C. et Pawlowski Z. S. 1985. *Ascariasis and its Public Health Significance*. Taylor & Francis Ltd. London and Philadelphia.
- D'Auria S., Rossi M., Tanfani F., Bertoli E., Parise G. et Bazzicalupo P. 1998. Structural Analysis of ASCUT-1, a Protein Component of the Cuticle of the Parasitic Nematode *Ascaris lumbricoides*. *Eur. J. Biochem.* 255, 588-504
- De Giorgi C., De Luca F. et Lamberti F. 1996. A Silent-Splicing signal in the Cuticlin-Encoding Gene of the Plant Parasitic Nematode *Meloidogyne artiella*. *Gene.* 170, 261-265
- De Silva N. R., Guyatt H. L., et Bundy D. A. P. 1997. Morbidity and Mortality due to *Ascaris*-induced Intestinal Obstruction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 91, 31-36
- Fujimoto D. et Kanaya S. 1973. Cuticlin: a Noncollagen Structural Protein from *Ascaris suum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 157, 1-6
- Galvin T. J. 1968. Development of Human and Pig *Ascaris* in the Pig and Rabbit. *J. Parasitol.* 54, 1085-1091
- Gentilini M., Caumes E., Danis M., Mouchet J., Duflo B., Lagardère B., Richard-Lenoble D., et Bruker G. 1993. *Médecine tropicale. Médecine-Sciences*, Flammarion
- Grove D. I. 1990 *A History of Human Helminthology*. C.A.B. International
- Johnstone I. L. 1993. The Cuticle of the Nematode *Caenorhabditis elegans*: A Complex Collagen Structure. *BioEssays.* 16, 171-178

- Josse J. et Harrington W. F. 1964. Role of Pyrrolidine Residues in the Structure and Stabilisation of Collagen. *J. Mol. Biol.* 9, 269-287
- Lassandro F., Sebastiano M., Zei F. et Bazzicalupo P. 1994. The Role of Dityrosine Formation in the Crosslinking of CUT-2, the Product of a Second Cuticlin Gene of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 147-159
- Leushner J., Semple N. L. et Pasternak J. 1979. Isolation and Characterization of the Cuticle from the free-Living nematode *Panagrellus silusiae*. *Biochim. Phys. Acta.* 580, 166-174
- Lewis E., Hunter S. J., Tetley L., Pavia Nunes C., Bazzicalupo P. et Devaney E. 1998. *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. *Mol. Biochem. Parasitol.* 101, 173-178
- Kramer J. M. 1994. Structures and Functions of Collagens in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 8, 329-336
- Kühn K. Chemical properties of collagen. In: *Immunochemistry of the extracellular matrix.* vol. 1, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1982
- Maggenti A. 1981. *General Nematology.* Springer-Verlag New York Heidelberg Berlin.
- Manson-Bahr P. E. C. et Bell D. R. 1987. *Manson's Tropical Diseases* (nineteenth edition), Baillière Tindall, London
- Martinez A. M. et De Souza W. 1997. A Freeze-Fracture and Deep-Etch Study of the Cuticule and Hypodermis of Infective Larvae of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). *Int. J. Parasitol.* 27, 289-297
- McBride O. W. and Harrington W. F. 1967. *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
- Naravane A., Lindo F. J., Williams L. A. D., Gardener M. T. and Fletcher C. K. 1997. *Ascaris lumbricoides* in the Paranasal Sinuses of a Jamaican Adult. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 91, 37
- Ninomiya Y. et Olsen B. R. 1984. Synthesis and Characterization of cDNA Encoding a Cartilage-Specific Short Collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 3014-3018

CHAPITRE 1

- Ogilvie B. M., Philipp M., Jungery M., Maizels R. M., Worms M. J. et Parkhouse, R. M. E. 1980. In: The Surface of Nematodes and the Immune Response of the Host. In The Host Invader Interplay (Van den Bossche, H, ed.) pp 99-104. Elsevier, Amsterdam.
- Page A. P., Rudin W., Fluri E., Blaxter M. L. et Maizels R. M. 1992. *Toxocara canis*. A Labile Antigenic Coat overlying the Epicuticle of Infective Larvae. Exp. Parasitol. 75, 72-86.
- Politz S. M. et Philipp M. 1992. *Caenorhabditis elegans* as a Model for Parasitic Nematodes: a Focus on the Cuticle. Parasitol. Today. 8, 6-12
- Ray C. et Hussey R. S. 1995. Evidence for Proteolytic Processing of a Cuticle Collagen in a Plant-Parasitic Nematode. Mol. Biochem. Parasitol. 72, 243-6
- Rawl J. D. 1989. Fibrous proteins. In: Biochemistry. Neil Patterson Publisher, Burlington, North Carolina. pp 75-98
- Sebastiano M., Lassandro F. et Bazzicalupo P. 1991. *Cut-1* a *Caenorhabditis elegans* Gene Coding for a Dauer-Specific Noncollagenous Component of the Cuticle. Dev. Biol. 146, 001-012
- Smith D. J. 1994. Introduction to Animal Parasitology. (Third Edition), Cambridge University Press
- Stryer L. 1988. Connective-Tissue Proteins. In: Biochemistry (International Student Ed.) pp 261-281. W. H. Freeman and Company, New-York
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. Science. 282, 2012-2018
- Urquhart G. M., Armour J., Duncan J. L., Dunn A. M., et Jennings F. W. 1989. Superfamily Ascaridoidea. In: Veterinary Parasitology. Longman Scientific & Technical, UK
- Vuorio E., et de Combrugghe B. 1990. The Family of Collagen Genes. Annual Rev. Biochem. 59, 837-872
- Weidong P., Xianmin Z., Xiaomin C., Crompton D. W. T., Whitehead R. R., Jiangqin X. Haigeng W., Jiyuan P., Yang Y., Weixing W., Kaiwu X. et Yongxing Y. 1996. *Ascaris*, People and Pigs in a Rural Community of Jiangxi Province, China. Parasitol. 113, 545-557
- Weil G. J. 1990. Parasite Antigenia in Lymphatic Filariasis. Exp. Parasitol. 71, 353-356

Wood W. B. 1988. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wright K. A. 1987. The Nematode's Cuticle - its Surface and the Epidermis: Function, Homology, Analogy - A Current Consensus. *J. Parasitol.* 73, 1077-1083

Zahner H., Hobom G., et Stirm S. 1995. The Microfilarial Sheath and its Proteins. *Parasitol. Today.* 11, 116-120

CHAPITRE 2

Extraction de l'ADN des tissus musculaires d'*Ascaris suum*: une nouvelle méthode

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Parasitology Research*.

La version anglaise est reproduite en page 105 du présent travail.

Introduction

En raison des normes strictes d'hygiène imposées dans le cadre de l'élevage des animaux, les *A. suum* sont de moins en moins fréquents chez les porcs de nombreux pays industrialisés. L'ADN utilisé pour des études de biologie moléculaire est isolé chez l'ascaris à partir des tissus viscéraux tels que les gonades et le tube digestif. Les muscles ainsi que l'hypoderme ne sont généralement pas utilisés. En effet, les muscles sont relativement riches en glycogène et pauvres en ADN. De plus, contrairement aux autres représentants du règne animal, les nématodes produisent des polyphénols (di- et isotri-tyrosines), qui sont sécrétés par l'hypoderme et intégrés au niveau de la cuticule [Fujimoto & Kanaya, 1973]. Tous comme les polysaccharides et les polyphénols chez les plantes, la présence de glycogène et de polyphénols dans les cellules musculaires rend difficile l'extraction et la purification de l'ADN à partir de ce tissu. La présence de tels contaminants rend souvent les échantillons visqueux et l'ADN ainsi contaminé ne peut ni être digéré par des endonucléases, ni amplifié par PCR. Pour palier à ces inconvénients, les protocoles ont dû être adaptés. Nous avons effectué une extraction d'ADN de tissus animaux classique (SDS-Protéinase K) [Ausubel *et al.*, 1995], suivie d'une méthode d'extraction de l'ADN de vigne (*Vitis vinifera*) basée sur une extraction au CTAB et une purification au Polyclar AT® [Lodhi *et al.*, 1994] afin d'obtenir un ADN issu des cellules de muscle et de l'hypoderme suffisamment pur.

Matériels et méthodes

Préparation des parasites

Les vers adultes nous ont aimablement été offerts par le professeur Fritz Mueller de l'Université de Fribourg, Suisse. Ils ont été conservés à -20°C.

Les gonades ont été prélevées par dissection. Pour préparer les muscles, les cuticules ont été retirées à la main après plusieurs cycles de congélation - décongélation [Betschart *et al.*, 1990].

Extraction de l'ADN

L'ADN des gonades a été extrait par une méthode classique. Après une digestion à la protéinase K durant toute une nuit, il a été purifié par deux extractions au phénol : chloroforme : isoamylalcool (49.5:49.5:1), suivies d'une précipitation à l'éthanol,

avant d'être resuspendu dans du tampon TE (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA , pH 8) [Ausubel *et al.*, 1995].

Les muscles et l'hypoderme de deux adultes ont été incubés toute la nuit à 55°C dans 10 ml de tampon d'extraction classique pour les cellules animales (100mM NaCl, 10mM Tris-Cl pH 8, 25mM EDTA pH 8, 0.5% SDS) et 10 µl de protéinase K (Boehringer, 0.5 mg/ml). Les éventuels débris non-digérés ont été sédimentés par centrifugation lente à 3'000 g. Trois ou quatre inversions du tube, durant les deux premières heures d'incubation, permettent de bien répartir l'enzyme dans l'ensemble de l'échantillon. Le surnageant a été soumis à deux purifications, la première au phénol seul et la seconde au phénol : chloroforme : isoamylalcool (49.5:49.5:1). Chacune de ces purifications a été suivie d'une centrifugation (15 min. à 3'500 g) afin d'éliminer les protéines. La phase aqueuse contenant l'ADN, d'aspect blanc opaque, a été précipitée avec un volume égal d'éthanol 100% froid (-20°C), 20 min. à -80°C. Après un lavage à l'alcool 70%, le culot a été resuspendu dans 5 ml de tampon TE (10mM Tris-Cl pH8, 1mM EDTA pH 8). A cette solution, ont été ajouté 15 ml de tampon pour l'extraction de l'ADN de plantes (2% CTAB, 100mM Tris-Cl pH8, 20mM EDTA pH8, 1.4mM NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol) et 50 mg de Polyclar AT® (Serva, Heidelberg Germany) [Lodhi *et al.*, 1994]. L'échantillon a été incubée, 30 min. à 60°C, puis refroidi à température ambiante, extrait avec du chloroforme et précipité à l'éthanol. Le culot a été resuspendu dans 5 ml avant de répéter l'extraction au CTAB. L'extrait suite à l'adjonction de 25 ml de TE supplémentaire a été centrifugé 1h à 30'000g. Au terme de cette étape, le glycogène était sédimenté en une pastille transparente et compacte. L'ADN présent dans le surnageant a été précipité 20 min. à -80°C, avec deux volume d'éthanol 100% froid (-20°C). Après un lavage à l'éthanol 70%, le culot a été redissout dans 300 µl de tampon TE et traité 30 min. à température ambiante avec de la RNase (10 mg/µl).

Tests de qualité de l'ADN

Les ADNs extraits des gonades et des muscles ont été testés par digestion enzymatique et par PCR. La digestion enzymatique a été effectuée de manière standard à l'aide de l'endonucléase *EcoR I*. Dans chaque cas, 1 µg d'ADN a été digéré durant une nuit à 37°C.

Pour l'amplification par PCR, des amorces aléatoires ont été utilisées (5':-CAGTAGTCATATGCTTGTCTCAG-3'; 5'-TCCTTTAAGTTTCAGCTTTGA-3') et pour chaque tissu, 1µg d'ADN a été amplifié. Les conditions d'amplification comprenaient une étape

initiale de dénaturation de 2 min. à 94°C, suivie de 30 cycles de 30 sec. à 94°C, 30 sec. à 45°C, 1 min. à 72°C ainsi qu'une étape finale d'extension de 5 min. à 72°C.

Résultats

Deux tests ont été effectués pour comparer la qualité de l'ADN extrait à partir des gonades et à partir des tissus musculaires.

Les résultats montrent que l'ADN extrait du muscle était suffisamment pur pour être efficacement digéré par une endonucléase (Fig. 1).

De même, les analyses ont montré que dans des conditions identiques d'amplification par PCR, les rendements sont tout à fait comparables quelque soit le tissu d'origine (Fig. 2).

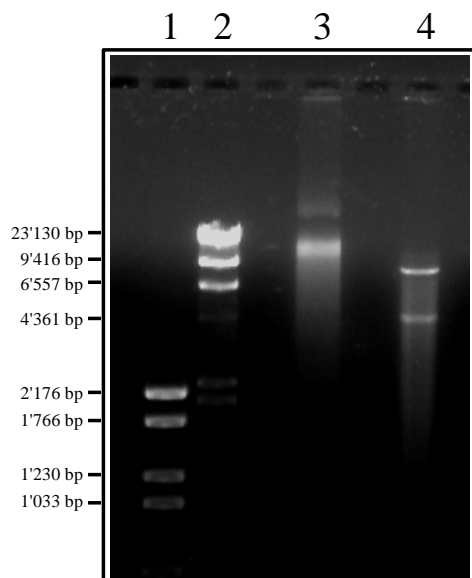


Fig.1. Digestion de l'ADN par *EcoR I*. **1.** et **2.** Marqueurs de poids moléculaires (Boehringer: marqueurs VI et II); **3.** ADN de muscle; **4.** ADN de muscle digéré par *EcoR I*. Environ 1 µg d'ADN a été utilisé dans chaque cas (1% agarose, 0.5X TBE).

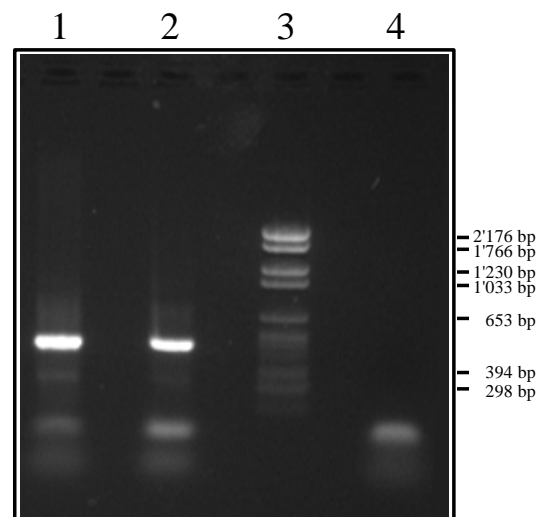


Fig.2. Amplification de l'ADN par PCR. **1.** ADN de gonades; **2.** ADN de muscle; **3.** Marqueur de poids moléculaire (Boehringer VI); **4.** Contrôle négatif. Les échantillons ont été séparés par électrophorèse et coloré au bromure d'éthidium.

Une mesure approximative de la concentration de l'ADN à l'aide d'un dosage au spectrophotomètre ($\lambda = 260$) a montré que la quantité d'ADN obtenu lors d'une extraction des tissus musculaires n'était pas négligeable. En fait, pour un individu, nous avons obtenu environ 406 µg d'ADN extrait du muscle et 600 µg extrait des gonades.

Discussion

Dans un premier temps, des extractions d'ADN classiques (SDS-protéinase K) sur des d'*A. suum* ont été effectuées. Il s'est avéré que cet ADN n'était pas utilisable pour la majeure partie des expériences car, après élimination des protéines par digestion à la protéinase K, il restait contaminé par de grandes quantités de glycogène. Déjà lors de l'extraction proprement dite, les culots d'ADN apparaissaient blanc et de taille peu orthodoxe pour la quantité de matériel de départ. Des tentatives de digestions à l'aide d'endonucléases et l'amplification de l'ADN par PCR s'étant soldées par des échecs, il a été envisagé de modifier le protocole d'extraction afin d'améliorer la purification de l'ADN.

Chez les plantes, l'extraction de l'ADN présente des difficultés apparemment similaire, dues majoritairement aux polysaccharides présents en grande quantité dans les cellules végétales et aux polyphénols qui se forment rapidement lors de la dégradation des tissus végétaux. Certaines espèces, comme par exemple la vigne (*Vitis vinifera*) présentent dans leur cellules de grandes quantités de ces contaminants. La présence de polysaccharides et de polyphénols rend les préparations d'ADN visqueuses, de qualité médiocre et diminue le rendement de l'extraction. Les protocoles ont donc dû être adaptés en conséquence [Lodhi *et al.*, 1994].

Par analogie, nous avons envisagé que les problèmes de purification pouvaient être dus à la forte teneur en glycogène des cellules musculaires. D'autre part, bien que les polyphénols soient en général absents chez les animaux, Fujimoto et Kanaya ont montré déjà en 1973 que des dityrosines et des isotryrosines étaient impliquées dans la cohésion des protéines formant la cuticule. Ces polyphénols sont sécrétés par l'hypoderme, lequel hypoderme reste en partie attaché au tissu musculaire lors de l'étape visant à retirer la cuticule. Ces molécules pouvaient donc facilement se retrouver dans les extraits d'ADN de cellules musculaires et perturber fortement les étapes de purification. Dans le but d'éliminer ces contaminants, nous avons envisagé d'assortir l'extraction classique (SDS + protéinase K) d'une phase équivalente à celle décrite pour les plantes (CTAB + Polyclar AT®), suivie d'une ultracentrifugation.

La présence de di- et d'isotryrosine dans l'extrait de muscle obtenu après la digestion à la protéinase K n'a pas été testée. Cependant, le résultat obtenu lors de l'utilisation de Polyclar AT® était nettement supérieur à celui obtenu lors d'un traitement utilisant uniquement le CTAB. Après ces deux extractions consécutives, une ultracentrifugation c'est avérée nécessaire pour sédimenter les derniers restes de glycogène. Nous avons également tenté de centrifuger à des vitesses élevées déjà après l'extraction à la protéinase K, mais le résultat n'était pas

concluant. Deux différents tests, une digestion de l'ADN par *EcoR I* et une amplification par PCR ont été réalisés. Aucune différence évidente n'a été remarquée entre les échantillons provenant de gonades de vers disséqués et du tissu musculaire.

Un dosage au spectrophotomètre a établi que pour un ver, bien que l'extraction de l'ADN de muscle soit plus lourde et plus longue, la quantité d'ADN extraite du muscle est quasi équivalente à celle obtenue à partir des gonades.

En raison des conditions d'élevage strictes, les ascaris sont de plus en plus difficiles à trouver dans les élevages de porcs modernes. L'extraction à partir de cellules musculaires permet donc de purifier un ADN qui précédemment était jeté et de doubler ainsi le rendement pour un même matériel de départ.

Références

- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., et Struhl K. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. 3 vols. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Betschart B., Marti S., et Glaser M. 1990. Antibodies against the Cuticlin of *Ascaris suum* Cross-React with Epicuticular Structures of Filarial Parasites. Acta Trop. 47, 331-338
- Fujimoto D. et Kanaya S. 1973. Cuticlin: a Noncollagen Structural Protein from *Ascaris suum*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 157, 1-6
- Lodhi M. A., Ye G-N, Weedwn N. F., et Reisch B. I. 1994. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species. Plant. Mol. Biol. Rep. 12, 6-13

CHAPITRE 3

**Comparaison des profils protéiques des nématodes *Ascaris suum*
et *Caenorhabditis elegans* et essai de caractérisation
d'un gène codant pour une cuticline d'*A. suum***

Introduction

La cuticule des nématodes est une structure protéique extracellulaire sécrétée par l'hypoderme. Les collagènes, constituent la majorité des protéines cuticulaires. En 1973 Fujimoto et Kanaya isolent et caractérisent une fraction insoluble de la cuticule de *Ascaris lumbricoides*, résistante aux collagénases, qu'ils nomment 'cuticline'. Les analyses biochimiques et biophysiques ont montré chez *Ascaris suum* que la cuticline est constituée d'un ensemble de protéines fortement liées entre elles par des liaisons covalentes, et qu'elle correspond à la couche corticale externe de la cuticule, l'épicuticule. Contrairement aux collagènes de la cuticule qui ont très tôt été l'objet d'études, d'abord biochimiques puis moléculaires, les cuticlins du fait de leur insolubilité, y compris en présence d'agents réducteurs (β -mercaptoethanol) et de détergeants (SDS), ont été peu étudiés. L'importance de l'épicuticule, et par conséquent des cuticlins, en tant que surface externe jouant le rôle de barrière entre le ver et le milieu externe, semble évidente. Malgré sa relative rigidité et sa nature inerte, la cuticule est le siège d'importantes interactions métaboliques entre le ver et son environnement. Elle doit répondre aux changements du milieu et sa structure, bien que conservée au sein du phylum, présente des variations importantes d'une espèce à l'autre, et également d'un stade à l'autre au sein d'une même espèce. Chez les nématodes parasites, la cuticule, et en particulier l'épicuticule, joue un rôle très important d'interface hôte-parasite. Elle est en effet en contact direct avec le système immunitaire de l'hôte.

Si de nombreux gènes codant pour des collagènes ont été rapportés chez *Caenorhabditis elegans* et également chez d'autres nématodes, seuls quelques gènes codant pour des protéines insolubles de la cuticule ont été isolés. Deux gènes, *cut-1* [Sebastiano *et al.*, 1991] et *cut-2* [Lassandro *et al.*, 1994], ont été décrits chez le nématode libre *C. elegans*. La protéine codée par le premier est exprimée essentiellement chez les dauer-larvae et en très faible quantité chez les autres stades. Elle forme deux cordons sous les ailes latérales. Le second gène code pour une protéine des régions corticales de la cuticule, présente chez tous les stades. Un troisième gène (*cut-3*) a été séquencé dans le cadre du '*C. elegans* genome project'. Des gènes du même type ont été isolés chez des nématodes parasites de plantes (*Meloidogyne artiellia*) [De Giorgi *et al.*, 1996] et de vertébrés (*A. lumbricoides*, *Brugia pahangi*) [Timinouni & Bazzicalupo, 1997]. Un gène partiel d'un autre type (*AsCut*), codant pour une cuticline localisée dans l'épicuticule du parasite intestinal du porc, *A. suum*, a également été isolé [Bisoffi *et al.*, 1996].

Les protéines codées par ces différents gènes, bien que faisant toutes partie de la fraction insoluble de la cuticule, n'ont que peu de similarités au niveau de leur séquence en acides aminés. Cependant plusieurs d'entre elles présentent des portions répétitives de type AAPA(A/V/I). Ce motif, prédominant chez *cut-2*, est également présent chez les *cut-1* de *C. elegans* et de *M. artiellia* et chez l'Ascut d'*A. suum* [Bisoffiet *al.*, 1998]. Par contre, il est complètement absent du *cut-3* de *C. elegans* et de l'*Ascut-1* de *A. lumbricoides* [Timinouni & Bazzicalupo, 1997]. Des motifs de ce genre ont également été décrits chez différentes protéines extracellulaire de structure de la cuticule des insectes [Horjup *et al.*, 1986].

Dans le cadre de ce travail, dans un premier temps, une comparaison des profils protéiques de *A. suum* et *C. elegans* a été effectuée. Nous nous sommes ensuite intéressés au gène *AsCut* de *A. suum* (n° d'accès: X92101) [Bisoffi *et al.*, 1996], pour tenter de déterminer si ce gène était présent dans le génome d'*A. suum* sous forme d'une ou plusieurs copies.

Les résultats présentés ici sont préliminaires. En effet, une thèse de doctorat portant sur les cuticlins est actuellement en cours à l'Université de Neuchâtel (Thèse de doctorat de M^{me} Alaeddine-Kamal, Institut de Zoologie, Département de Parasitologie).

Matériel et méthodes

Matériel utilisé

Les *C. elegans* de la souche *Daf 7* nécessaires à la mise en route d'un élevage nous ont été offerts par le professeur Fritz Müller (Institut de Zoologie, Fribourg, Suisse). Les vers ont été cultivés sur un milieu solide selon la méthode décrite par Brenner [1973]. Pour l'extraction des protéines, les populations de *C. elegans* ont été synchronisées pour obtenir de grandes quantités d'adultes [Cox & Hirsh, 1985]. L'utilisation de cette souche mutante qui stoppe son développement au stade "dauer-larva" lorsque la température est maintenue à 25°C a facilité la synchronisation. Sur boîte de Pétri, il faut compter 40 heures à 20°C (ou 28 heures à 25°C) pour obtenir des adultes à partir d'une culture stoppée au stade dauer-larva.

Les *Ascaris*, récoltés immédiatement après l'abattage des porcs et conservés à -20°C, provenaient d'un abattoir local.

Le clone 3.1 B1A-IF, correspondant à l'ADNc de *AsCut* inséré dans le plasmide Bluescript SK-, a été construit par M. Bisoffi dans le cadre de sa thèse de doctorat.

Extraction et séparation des protéines

Les *C. elegans* ont été soniqués 5 fois 20 secondes (sonde: 3 mm) à 50% de l'amplitude maximale (Sonicateur: Vibra Cell, Sonics & Materials, Inc. Danbury, ct USA) et les cuticules ont été lavées plusieurs fois dans le tampon de sonication (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 1mM EDTA; 1mM PMSF) afin d'éliminer les tissus. Les cuticules d'*A. suum*, prélevées à la main [Fujimoto & Kanaya, 1973; Marti, 1991], ont été lavés 3 fois (0.5M NaCl à 4°C) et rincées à l'eau distillée (4°C).

Pour pouvoir comparer les résultats, les extractions des protéines de la cuticule ont été effectuées selon la méthode décrite pour *C. elegans* par Cox *et al.* [1981a]. Le protocole d'extraction est donné pour les *C. elegans* (~1x10⁵ vers), les valeurs correspondant à l'extraction des protéines d'*A. suum* (~9 g) sont données entre parenthèse et en italique. Les cuticules, transférées dans un microtube de 1.5 ml (*tube Falcon de 50 ml*), ont été incubées dans 1 ml (*40 ml*) de tampon ST (125mM Tris-HCl pH 6.8; 1% SDS), 2 minutes à 100°C, puis o/n à température ambiante et centrifugées (15 min. à 4°C à 10'000 g). Les cuticules propres ont été bouillies 2 min. dans 0.5 ml (*50 ml*) de tampon ST + BME (125mM Tris-HCl pH 6.8; 1% SDS; 5% BME) avant d'être agitées gentiment o/n à température ambiante. Le surnageant contenant les protéines solubles de la cuticule a été récupéré après centrifugation (15 min. à 4°C à 10'000 g) et dialysé toute la nuit dans du 5% BME .

Concentration des protéines

Les protéines extraites de la cuticule de *C. elegans* ont été concentrées selon les deux techniques suivantes: (1) par une précipitation à l'acide trichloroacétique (concentration finale =15%) [Maizels *et al.*, 1991], suivie de quatre lavages à l'acétone et d'une resolubilisation des échantillons dans le tampon de charge pour SDS-PAGE (12.5% glycérol; 125mM Tris-HCl pH 6.8; 4% SDS; 10% BME; 1% bleu de bromophénol); (2) par centrifugation à travers une membrane poreuse (colonne Centricon de Amicon. 10 kDa).

SDS-PAGE

Les protéines solubles de la cuticule (*C. elegans*: 20 µl; *A. suum*: 5 µl) ont été séparées par électrophorèse sur un gel de SDS-polyacrylamide (acrylamide : bis-acrylamide, 30% : 0.8%) 12 % (MiniGel: Bio Rad Laboratories), sous l'action d'un courant constant de 100V. La

révélation par coloration au bleu de Coomassie a été effectuée dans des conditions standard [Sambrook *et al.*, 1989].

Détection par hybridation du gène *AsCut*

L'ADN de *C. elegans* a été extrait selon un protocole standard pour cellules animales [Sulston & Hodgkin, 1988]. L'ADN des *A. suum* a été extrait à partir des tissus musculaires de vers adultes [Di Mito & Betschart, 1998], comme décrit dans le chapitre 2 du présent travail. L'ADN des deux espèces a été soumis à des digestions enzymatiques par *EcoR I*, *Pst I* et *Hind III* durant toute la nuit dans des conditions standard. De l'ADN de thymus de veau a également été digéré par *EcoR I* et utilisé comme témoin négatif.

Après migration sur un gel d'agarose 0.8%, l'ADN digéré a été transféré toute la nuit [Ausubel *et al.*, 1995] sur une membrane en Nylon chargée positivement (Tropix, Perkin Elmer). Un fragment d'ADN de 1230 bp, amplifié par PCR et reconnaissant le gène *AsCut* [Bisoffi *et al.*, 1996] a été utilisé comme sonde. L'amplification a été effectuée sur le clone 3.1 B1 A-IF au moyen d'une amorce (5'-GGGCCATAGCACGATCACC-3') reconnaissant l'extrémité 5' du gène *AsCut* partiel [Bisoffi *et al.*, 1996] et de l'amorce standard M13 reverse localisée sur le vecteur. Les conditions d'amplifications étaient les suivantes: : 94°C x 2 min., 30 cycles: 94°C x 30 sec, 50°C x 1min., 72°C x 1 min., and 72°C x 5 min.. Le produit PCR ainsi obtenu a été marqué à la biotine par 'random priming' (Kit Gibco BRL). L'hybridation a été réalisée à 65°C durant toute la nuit et les lavages ont été effectués exactement comme décrit dans le protocole du kit chemiluminescent (Tropix) (2X5 min. in 2X SSC, 1% SDS; 2X 15 min. in 0.1X SSC, 1% SDS; 2X5 min. in 1X SSC).

Résultats et discussion

Comparaison des profils protéiques de *Ascaris suum* et *Caenorhabditis elegans*

Une comparaison des profils protéiques du parasite, *A. suum* et du nématode libre *C. elegans*, a été effectuée. Les extractions de protéines ont été effectuées exactement dans les mêmes conditions pour les deux nématodes. Pour concentrer les extraits, dans un premier temps une précipitation à l'acide trichloroacétique a été testée sur les échantillons issus de *A. suum*. Les

culots n'ont jamais pu être redissouts, même en augmentant la concentration de β -mercaptoethanol. Afin d'éviter la formation d'amas de protéines, une concentration par centrifugation sur une membrane poreuse a été effectuée en lieu et place de la précipitation. Grâce à cette méthode, les extraits de *C. elegans* ont pu être concentrés 40 X, ramenant ainsi la concentration en protéines à 2.4 mg/ml. Lors de la séparation des protéines sur gel, ~48 μ g ont été chargés. Les extraits de *A. suum* ont été chargés tel quel, sans concentration.

Lors de stockage prolongé des extraits de *A. suum*, en raison de la dégradation de l'agent réducteur, des ponts-disulfures entre les collagènes se forment à nouveau. Ceci se traduit par une viscosité accrue des solutions contenant les protéines et des retards de migration .

La comparaison des extraits protéiques d'*A. suum* et de *C. elegans* après migration sur un gel d'acrylamide 12% en présence de SDS montre que le nématode libre présente un profil de protéines très différent (Fig. 1). Un extrait de protéines solubles de la cuticule de *B. pahangi* a été ajouté à titre de comparaison.

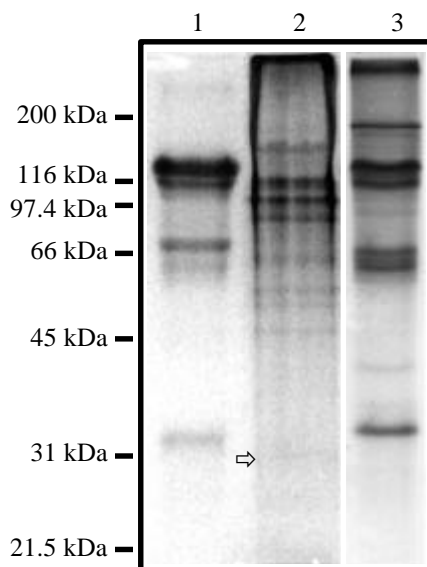


Fig. 1. Gel SDS-polyacrylamide 12%. Protéines solubles de la cuticule de nématodes adultes, extraites en présence de β -mercaptoéthanol.

1. *A. suum* adultes (5 μ l d'extrait); **2.** *C. elegans* adultes (20 μ l d'extrait concentré); \Rightarrow = bande faible de ~31 kDa; **3.** *B. pahangi* adultes. Les valeurs en kDa correspondent au marqueur de poids moléculaires (Bio-Rad, Broad range molecular marker).

Chez *A. suum* les profils protéiques peuvent se résumer à trois groupes de protéines correspondant aux collagènes: ~30 kDa = monomère; ~60 kDa = dimères; 116-120 = trimères. La migration des trimères est ralenties en raison de la structure même du collagène [Kühn, 1992]. Chez *B. pahangi*, quelques protéines solubles supplémentaires sont présentes, mais dans l'ensemble un schéma identique peut être établi (Fig.1, Table 1). Les études de Cox et collaborateurs sur la souche sauvage N2 de *C. elegans* montrent que les protéines solubles de la cuticule des adultes ont toujours un poids moléculaire plus grand que 50 kDa [Cox *et al.*,

1981b]. Des protéines plus petites ont toutefois été isolées chez les L1. La nature de ces protéines est encore inconnue, mais elles semblent être résistantes à la digestion par les collagénases [Cox *et al.*, 1981c]. Etonnamment, selon les résultats de Cox et collaborateurs, les collagènes de *C. elegans* ne sont apparemment jamais trouvés sous forme de monomères et probablement rarement sous forme de dimères dans des conditions de SDS-PAGE standard. Les bandes correspondant aux tailles théoriques des trimères des collagènes (91 et 106 kDa) représentent le 76% de l'extrait total (Table 1). Dans le cadre de ce travail, les bandes obtenues avec la souche mutante *Daf 7* (Fig.1) diffèrent légèrement en taille comparées aux résultats de Cox (Table 1). De plus, une bande très faible de environ 31 kDa a pu être mise en évidence chez *C. elegans* (Fig. 1). Cette taille pourrait correspondre à un monomère de collagène. La faible concentration de cette bande la rend difficilement observable, c'est pourquoi aucun test de digestion à la collagénase n'a été effectué pour confirmer sa nature.

Table 1. Comparaison des profils protéiques de *A. suum*, *C. elegans* et *B. pahangi*.

<i>A. suum</i> ¹		<i>C. elegans</i> (souche N2) [Cox <i>et al.</i> , 1981b]		<i>B. pahangi</i> ^{1, 2}	
Poids moléculaire apparent (kDa)	Proportion (%) de l'extrait total	Poids moléculaire apparent (kDa)	Proportion (%) de l'extrait total	Poids moléculaire apparent (kDa)	Proportion (%) de l'extrait total
> 200	1 ↑ 72.8	212	1.4 ↑	> 200	16.2 ↑
		197	5.6	200	12.6
		171	1.8		61.8
120	57.1	138	5.2	120	20.8
116	14.7 ↓	106	47.4	116	12.2 ↓
		91	28.6 ↓		
68	19.5	70	6.1	60-66	15.8
		54	4.5	40	3.5
32	7.7			35	18.9

¹ Les pourcentage ont été calculés à l'aide du programme Multianalyste (Bio-Rad Laboratories)

² Les protéines de la cuticule de *B. pahangi* ont été extraites selon la méthode décrite par [Betschart *et al.*, 1985].

La différence de profil protéique entre *C. elegans* et *A. suum*, de même que la similitude entre *A. suum* et *B. pahangi* ne sont pas surprenantes. En effet, selon les résultats obtenus par Blaxter et collaborateurs [Blaxter *et al.*, 1998] lors d'un essai de phylogénie moléculaire des Nematoda, *A. suum* (Ascaridida) et *B. pahangi* (Spirurida) ont probablement un ancêtre commun récent. Le nématode libre *C. elegans* est situé dans une branche qui s'est différenciée plus tôt dans l'évolution.

Préparation de l'ADN et hybridation

Le gène *AsCut* étudié dans ce travail correspond à un gène, partiellement séquencé, isolé d'une banque d'ADNc de l'hypoderme d'*A. suum* adulte [Bisoffi *et al.*, 1996].

L'ADN isolé des muscles d'*A. suum*, après dosage au spectrophotomètre, a été digéré par trois enzymes de restriction. Le choix des endonucléases a été fait en fonction de leur présence ou de leur absence dans la portion du gène *AsCut* séquencée par Bisoffi et Betschart [1996]. Les sites *EcoR I* et *Hind III* ne sont pas présents. Le site *Pst I* est situé dans la zone répétitive et de ce fait est présent 5 fois dans le gène (Fig. 2).

De l'ADN génomique non-digéré d'*A. suum* et de l'ADN génomique de thymus de veau, digéré par *EcoR I* ont été utilisés respectivement comme témoins positif et négatif (Fig. 2).

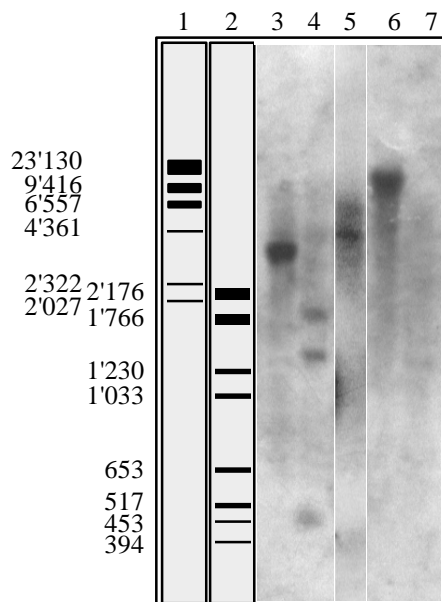


Fig. 2. Détection du gène *AsCut* par hybridation. **1.** et **2.** Marqueurs de poids moléculaires (Roche, marqueurs II et VI). La taille des bandes (bp) est indiquée à gauche; **3.** - **6.** ADNg d'*A. suum*: **3.** digéré par *EcoR I*; **4.** digéré par *Pst I*; **5.** digéré par *Hind III*; **6.** non digéré; **7.** ADNg de thymus de veau digéré par *EcoR I*.

L'ADN non digéré (échantillon 6) est bien reconnu par la sonde, par contre l'ADN de thymus de veau ne réagit pas. Une seule bande d'environ 4'200 bp a été révélée après la digestion par *EcoR I*. Lors de la digestion par *Pst I*, les trois bandes obtenues ont une taille de environ 500, 1'400, et 1'800 kDa. La bande de 500 kDa correspond environ à la taille de trois régions répétitives et est peut-être due à un problème d'accessibilité des sites de restriction dans cette zone. Suite à la digestion par *Hind III*, une bande (4'500 bp) a été observée. Ces résultats indiquent que le gène *AsCut* est présent une seule fois dans le génome.

Les études portant sur les protéines insolubles de *C. elegans* ont débouché sur l'isolation et la caractérisation de deux gènes. Le produit du gène *cut-1*, décrits chez *C. elegans* est localisé dans les sillons courant sous les ailes latérales des dauer-larvae [Sebastiano *et al.*, 1991]. Il est également présent en nettement moins grande quantité chez les autres stades, dans la partie corticale de la cuticule [Ristoratore *et al.*, 1994]. Plusieurs études visant à tester sa présence chez d'autres nématodes ont été effectuées. Ce gène semble commun à plusieurs espèces telles que l'entomoparasite *Heterorhabditis sp.* [Favre *et al.*, 1998], le parasite de plante *Meloidogyne sp.* [De Giorgi *et al.*, 1996], et les parasites de vertébrés *Ascaris suum* [Timinouni & Bazzicalupo, 1997], *Brugia pahangi* et *B. malayi* [Lewis *et al.*, 1999]. Le deuxième gène (*cut-2*) jusqu'à aujourd'hui n'a été décrit que chez *C. elegans*. Il code pour une protéine présente chez tous les stades et localisée préférentiellement dans les régions corticales de la cuticule [Lassandro *et al.*, 1994; Ristoratore *et al.*, 1994]. Ces protéines diffèrent donc des cuticlins décrites initialement chez *Ascaris* par Fujimoto et Kanaya [1973] qui sont quant à elles localisées exclusivement dans l'épicuticule.

Bisoffi et collaborateurs [1996] ont localisé le produit du gène *AsCut* dans l'épicuticule de *A. suum* par immunocytochimie, confirmant ainsi son appartenance à la famille des cuticlins. Ils ont également montré que des anticorps dirigés contre la protéine de fusion GST-*AsCut*, reconnaissent non seulement des protéines extraites de la cuticule d'*A. suum*, mais également une protéine de ~ 97 kDa d'un extrait total de *B. pahangi*. Toujours selon ces auteurs, aucune protéine de ce type n'est reconnue chez le stade adulte de *C. elegans*. Deux travaux de certificats effectués dans nos laboratoires permettent tout de même d'envisager la présence d'un gène semblable chez *C. elegans*. D'une part, des précurseurs de la protéine codée par *AsCut* ont été mis en évidence chez les L1 de *C. elegans* [Gaggini, 1998], d'autre part, trois fragments d'ADN de *C. elegans* présentent une forte homologie avec les motifs répétitifs de l'*AsCut*

[Stegmann, 1998]. Ces résultats préliminaires intéressants nécessitent cependant encore des vérifications.

Bien que la cuticule soit conservée au sein du phylum Nematoda, les différences entre les stades d'une même espèce et qui plus est entre des espèces différentes ont toujours été évidentes [Politz & Philipp, 1992]. *C. elegans* du fait de son maintien facile en culture in vitro, est un modèle de laboratoire intéressant. Pour de nombreuses études, ce ver représente de manière correcte les nématodes en général, sans toutefois surévaluer la similitude entre *C. elegans* et les autres espèces de nématodes.

Références

- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. et Struhl K. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. 3 vols. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Bisoffi M., Marti S. et Betschart B. 1996. Repetitive Peptide Motifs in the Cuticlin of *Ascaris suum*. Mol. Biochem. Parasitol. 80, 55-64
- Blaxter M. L., De Ley P., Gareys J. R., Liu L. X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J. R., Mackey L. Y., Dorris M., Frisse L. M., Vida J. T. et Thomas W. K. 1998. A Molecular Evolutionary Framework for the Phylum Nematoda. Nature. 392, 71-75
- Brenner S. 1973. The Genetic of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 77 71-94
- Cox G. N. et Hirsch D. 1985. Stage-Specific Patterns of Collagen Gene Expression during Development of *Caenorhabditis elegans*. Mol. Cell. Biol. 5, 363-372
- Cox G. N., Kusch M., De Nevi K. et Edgar R. S. 1981a. Temporal Regulation of Cuticle Synthesis during Development of *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 84, 277-285
- Cox G. N., Kusch M. et Edgar R. S. 1981b. Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: Its Isolation and Partial Characterisation. J. Cell. Biol. 90, 7-17
- Cox G. N., Staprans S. et Edgar R. S. 1981c. The Cuticle of *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 86, 456-470
- D'Auria S., Rossi M., Tanfani F., Bertoli E., Parise G. et Bazzicalupo P. 1998. Structural Analysis of ASCUT-1, a Protein Component of the Cuticle of the Parasitic Nematode *Ascaris lumbricoides*. Eur. J. Biochem. 255, 588-504

- De Giorgi C., De Luca F. et Lamberti F. 1996. A Silent-Splicing signal in the Cuticlin-Encoding Gene of the Plant Parasitic Nematode *Meloidogyne artiella*. *Gene*. 170, 261-265
- Di Mito C. et Betschart B. 1998. DNA Extraction from *Ascaris suum* Muscle Tissue. *Parasitol. Research*. 84, 595-597
- Favre R., Cermola M., Pavia Nunes C., Hermann R., Mülles M. et Bazzicalupo P. 1998. Immuno-Cross Reactivity of CUT-1 and Cuticlin Epitopes between *Ascaris lumbricoides*, *Caenorhabditis elegans*, and *Heterorhabditis*. *J. Struct. Biol.* 123, 1-7
- Fujimoto D. et Kanaya S. 1973. Cuticlin: a Noncollagen Structural Protein from *Ascaris suum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 157, 1-6
- Gaggini R. 1998. Recherche des précurseurs des protéines de la cuticline d'*Ascaris suum* chez *Caenorhabditis elegans*. Travail de certificat. Département de Parasitologie, Université de Neuchâtel, Switzerland
- Horjup P., Andersen S. O. et Roepstorff P. 1986. Isolation, Characterisation, and N-Terminal Sequence Studies of Cuticular Proteins from the Migratory Locust, *Locusta migratoria*. *Eur. J. Biochem.* 154, 153-159
- Kühn K. Chemical properties of collagen. In: *Immunochemistry of the Extracellular Matrix*. vol. 1, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1982
- Lassandro F., Sebastiano M., Zei F. et Bazzicalupo P. 1994. The Role of Dityrosine Formation in the Crosslinking of CUT-2, the Product of a Second Cuticlin Gene of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 147-159
- Lewis E., Hunter S. J., Tetley L., Pavia Nunes C., Bazzicalupo P. et Devaney E. 1998. *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. *Mol. Biochem. Parasitol.* 101, 173-178
- Marti S. 1991. Biochemische und immunologische Charakterisierung von Cuticlin, einem Strukturprotein aus der Kutikula von *Ascaris suum*. PhD Thesis, Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland
- Politz S. M. et Philipp M. 1992. *Caenorhabditis elegans* as a Model for Parasitic Nematodes: a Focus on the Cuticle. *Parasitol. Today*. 8, 6-12

CHAPITRE 3

Sambrook J., Fritsch E. F., et Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sebastiano M., Lassandro F. et Bazzicalupo P. 1991. *Cut-1* a *Caenorhabditis elegans* Gene Coding for a Dauer-Specific Noncollagenous Component of the Cuticle. *Dev. Biol.* 146, 001-0012

Stegmann S. 1998. Mise en évidence de la présence du gène codant pour la cuticline d'*Ascaris suum* chez *Caenorhabditis elegans*. Travail de certificat. Département de Parasitologie, Université de Neuchâtel, Switzerland

Sulston J. et Hodgkin J. 1988. Methods. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Wood W. B. 1988. pp 587-606. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Timinouni M. et Bazzicalupo P. 1997. *cut-1*-Like Genes of *Ascaris lumbricoides*. *Gene*. 193, 81-87

CHAPITRE 4

Identification et caractérisation de gènes codant pour des collagènes de la cuticule de nématodes parasites

Ce chapitre a été en partie soumis dans *Molecular and Biochemical Parasitology*

La version anglaise est reproduite en page 107 du présent travail.

Introduction

En 1964 déjà, Josse et Harington ont établi que la cuticule des nématodes était constituée majoritairement de protéines présentant des caractéristiques proches de celles des collagènes de vertébrés. Fujimoto et collaborateurs [1981], quant à eux, ont démontré que les collagènes de la cuticule étaient assemblés grâce à des liaisons fortes de différents types telles que di-tyrosine, isotri-tyrosine et ponts-disulfures entre des cystéines. Ces protéines d'environ 30 kDa, assemblées en trimères, sont spécifiques des nématodes. Elles présentent trois à cinq zones triple-hélicales comportant le motif (Gly-X-Y)_n, séparées par des zones non-hélicales riches en cystéines [Cox *et al.*, 1981a; Ouazana & Herbage, 1981]. La majorité des études portant sur ces protéines ont été effectuées chez le nématode libre *Caenorhabditis elegans*. A quelques exceptions près [Park & Kramer, 1990; Johnstone *et al.*, 1996], les gènes codants pour les collagènes de la cuticule sont dispersés dans le génome [Cox *et al.*, 1981a]. Ils forment une famille multi-génique composée de 170 gènes [The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998] qui, sur la base de l'organisation des zones hélicales et de la localisation précise des cystéines, peuvent être groupés en classes [Johnstone, 1993]. Les données concernant les nématodes parasites sont moins nombreuses, néanmoins des gènes codants pour des collagènes cuticulaires ont été isolés et caractérisés chez plusieurs espèces. Des parasites intestinaux (*Haemonchus contortus*, *Ascaris suum*, *Ostertagia circumcincta*) [Shamansky *et al.*, 1989; Kingston *et al.*, 1989; Johnstone *et al.*, 1996], des filaires lymphatiques (*Brugia malayi*, *Brugia pahangi*) [Scott *et al.*, 1995; Bisoffi & Betschart, 1996] mais également des parasites de plantes (*Meloidogyne incognita*) [Ray *et al.*, 1996] présentent des collagènes similaires à ceux décrits chez *C. elegans*. Ces données montrent encore une fois que la cuticule est une structure conservée au sein du phylum, du point de vue de sa composition et de structure.

Les collagènes de la cuticule ne sont, en temps normal, pas exposés au système immunitaire. Cependant, lors de chaque mue, des fragments de l'ancienne cuticule sont présents dans le sang, ce qui rend les collagènes accessibles aux cellules du système immunitaire. Contrairement aux collagènes de vertébrés, qui ne sont pas immunogènes, les collagènes de la cuticule le sont fortement. La première mue a lieu rapidement après l'infection de l'hôte, et par conséquent, une réponse immunitaire dirigée contre les collagènes peut être observée très tôt après l'infection. Par ce travail, nous avons cherché à contribuer à une meilleure connaissance des collagènes cuticulaire et de leur immunogénicité.

Matériel et méthodes

Matériel utilisé

Les *Ascaris suum* nous ont été fournis par un abattoir de la région et par le professeur Fritz Müller de l'Institut de Zoologie à Fribourg (Suisse). La banque de cDNA, préparée à partir d'ARNm isolés de l'hypoderme d'*Ascaris suum* adultes et clonée dans le bactériophage λ Zap II, nous a été aimablement offerte par les Dr. T. Geary et R. Klein (The Upjohn Company Kalamazoo, USA).

La banque d'ADNc de *B. pahangi* comportant le 'spliced leader' SL1 [Nilsen, 1993] a été préparée dans le phage λ Zap II à partir de L3 récoltées 3 jours après l'infection [Martin *et al.*, 1996]. La banque, ainsi que les adultes nous ont été fournis par le Dr. E. Devaney (Department of Veterinary Parasitology, University of Glasgow, UK). Le clone 19.1, correspondant au gène *Bpcol-1* partiel inséré dans le phage λ gt11 nous a aimablement été offert par le Dr. M. Bisoffi .

Production des protéines de fusion

La protéine de fusion du gène *Bpcol-1* accolé à la glutathion-S-transferase du trématode *Schistosoma japonicum* (~29 kDa) a été produite selon le protocole fourni par Pharmacia Biotech [1997]. Le gène *Bpcol-1* codant pour un collagène de la cuticule de *B. pahangi* a été amplifié par PCR, à partir du clone *Bpcol-1* / λ gt11 cultivé dans la souche d'*E. coli* Y1089, avec les amorces Bp5' et Bp3' (Table 2) reconnaissant les extrémité de la région codante de l'ADNc caractérisé par Bisoffi et Betschart [1996]. Les conditions d'amplifications suivantes ont été utilisées: : 94°C x 2 min., 30 cycles: 94°C x 30 sec, Ta°C x 30 sec, 72°C x 1 min., and 72°C x 5 min.. Le gène amplifié a été inséré dans le plasmide pGEX (Pharmacia Biotech). Dans ce but, les amorces Bp5' et Bp3' comportaient un site de restriction, respectivement *BamH I* et *EcoR I* (Fig. 1), correspondant aux sites présents sur le plasmide. La construction a été contrôlée par séquençage à l'aide des amorces pGEX 5' (5'-GGGAGCTGCATGTCAG-3') et pGEX 3' (5'-GCTGGCAAGCCACGT TTG-3'). L'expression a été induite dans la souche d'*E. coli* Top 10 (Invitrogen) en présence de 1 mM d'IPTG. Les cultures de bactéries ont été

lysées dans du PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) + 1 mM PMSF par un traitement au lysozyme suivi d'une sonication rapide.

Digestion enzymatique, SDS-PAGE et immunisation

La nature de la protéine a été testée par une digestion à la collagénase de *Clostridium histolyticum* (Sigma; type VII). La digestion a été réalisée durant o/n à 37°C, dans 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM CaCl₂ avec 100 µg/ml d'enzyme [Selkirk *et al.*, 1989]. La réaction a été stoppée par l'adjonction du tampon de charge pour SDS-PAGE et par incubation à 100°C durant 5 min. Les différents échantillons (digérés ou non) ont été séparés sur un mini-gel (Bio-Rad) de polyacrylamide 12% en présence de SDS (SDS-PAGE).

Pour les expériences d'immunisation, la bande correspondant à la protéine de fusion a été découpée du gel après une coloration au bleu de Coomassie. La protéine a ensuite été récupérée par électroélution (Biotrap® System, Schleicher et Schüll).

Deux souris Balb C ont été immunisées à 0, 15 et 30 jours par injections sous-cutanées de 100 µl de protéines + 100 µl d'adjuvant incomplet de Freund. La concentration en protéines de l'extrait n'a pas été dosée. Les 100 µl correspondent aux protéines obtenues par électroélution de la protéine de fusion après séparation sur gel d'environ 1.3 ml de culture bactérienne (D.O. = 0.9) induite deux heures en présence d'IPTG.

Analyses par immunoblot

Des lysats de bactéries et des extraits de vers ont été séparés sur des gels SDS-polyacrylamide 12% et transférés sur de la nitrocellulose (Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Après le transfert, la membrane a été bloquée 2 heures dans du TBST (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween® 20) (Promega, 1998). Les protéines ont été exposées aux anticorps polyclonaux (Table 1) durant toute la nuit. Après incubation avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (Nordic Immunological Laboratories) durant 1 heure, les bandes positives ont été visualisées en présence de 4-chloro-1-naphtol.

Le serum de lapin immunisé avec un extrait de collagènes totaux de la cuticule de *B. pahangi* a été préparé par M. Bisoffi dans le cadre de sa thèse de doctorat. Le serum de patient infecté par *Dipetalonnema perstans* nous a aimablement été offert par le laboratoire de Diagnostic Parasitaire (Neuchâtel, Suisse)

Table 1.

Liste des sera utilisés			
Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Souris / anti- <i>Bpcol-1</i>	1/50	Chèvre / anti-souris (IgG, H+L)	1/500
Lapin / anti collagène de <i>B. pahangi</i>	1/100	Souris / anti-lapin (IgG, H+L)	1/500
Humain / infecté par <i>Dipetalonema perstans</i>	1/100	Souris / anti-humain (IgG, Fc)	1/500

Amplification par PCR de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADNg de *Ascaris* a été effectuée à partir du muscle, selon la méthode décrite dans le chapitre 2 du présent travail [Di Mito & Betschart, 1998]. Pour *B. pahangi*, nous avons utilisé un protocole standard d'extraction pour cellules animales [Sulston & Hodgkin, 1988].

L'ADNg a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques codant pour les extrémités des gènes, dans les conditions suivantes: 94°C x 2 min., 30 cycles: 94°C x 30 sec, Ta°C x 30 sec, 72°C x 1 min., and 72°C x 5 min. (Table 2). Les différentes amorces ont été utilisées à une concentration de 0.1 mM et la *Taq* Polymerase (QIAGEN) a été utilisée selon les indications recommandées par le fournisseur. L'ADN génomique d'*A. suum* a été amplifié à l'aide des amorces AsRMET et Bp3', et celui de *B. pahangi* à l'aide des amorces Bptot5' et Bp3' (Tables 2 et 3, Fig. 1).

Sélection des clones par PCR

Une sélection des clones par PCR a été effectuée directement sur la banque. Différentes amorces ont été utilisées (Table 2). Les amorces Bp3' et Bp5' correspondent aux extrémités de la région codante du gène de collagène *Bpcol-1* [Bisoffi & Betschart, 1996]. Les amorces T3 et T7 reconnaissent les séquences des promoteurs T3 et T7 du vecteur M13. Les conditions d'amplification comprenaient une phase initiale de dénaturation de 2 min. à 94°C, 30 cycles de 30 sec. à 94°C: 30 sec. à Ta°C : 1 min. à 72°C, et une phase finale d'élongation de 5 min. à 72°C. Les séquences, les températures d'hybridation et la localisation des amorces sont mentionnées dans les Tables 2 et 3 et la Fig. 1.

Table 2. Liste des amorces utilisés pour la PCR et la RT-PCR.

Séquences (5'→3')
AsRMET: -ATGGCTGAAGACGATCCAAAGG-
AsRmid3': -TGTGCAGCATGAGGTTCTGG-
AsRmid5': -GTTGGGAATTCATGTTCTCAGAG- ¹
BP5': -GGATCCACCAAACCTCGAATCACGCGTTCA- ¹
BP3': -GAATTCCTTAATAGCCTGGAGCTGTTCTGGG- ¹
Bptot5': -ATGGTTGATTCTGATGATCCA-
F19mid5': -ACAGGGAATTCGTGGTGGTACGGG- ¹
SL1: -GCCGGAATTCGGTTAATTACCCAAGTTTGAG- ¹

¹ Les sites de restriction qui ont été ajoutés pour faciliter les manipulations des produits amplifiés sont indiqués en italique.

Table 3. Paires d'amorces utilisées pour la PCR

Températures d'hybridation (Ta)		amorce 3'			
		Bp3'	T7	F19mid5'	AsRmid5'
a m o r c e 5'	SL1	--	--	66°C	63°C
	T3	50°C	--	60°C	--
	Bp5'	60°C	50°C	--	--
	AsRmid3'	--	55°C	--	--
	AsRMET	60°C	--	--	--
	Bptot5'	53°C	--	--	--

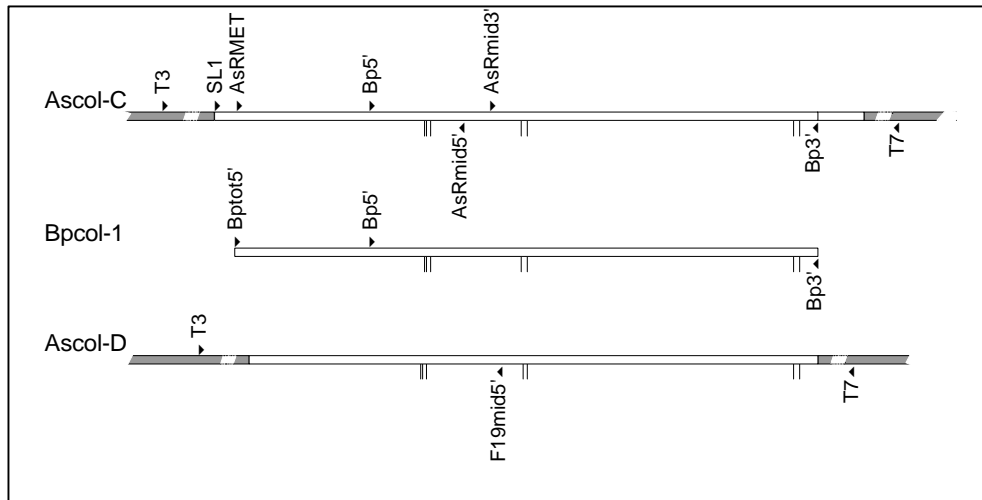


Fig.1. Localisation schématique des amorces. Les traits verticaux indiquent les positions des cystéines conservées au sein de la classe de collagènes B [Johnstone, 1993]. Le vecteur est indiqué en gris.

Sélection des clones par hybridation

Les phages λ Zap II ont été cultivés par infection de la souche d'*Escherichia coli* XL1-Blue. Les plages ainsi obtenues ont été transférées sur une membrane de Nylon chargée positivement, selon un protocole standard [Ausubel, *et al.*, 1995]. Une sonde ADN de 17-nt (5'-CCACCAGGACCACAAGG-3'), marquée à la biotine, reconnaissant une région collagène et un kit chémiluminescent (Tropix, Perkin Elmer) ont été utilisés pour le 'screening'. Le choix de la sonde était basé sur les séquences connues des gènes Bpcol-1 [Bisoffi & Betschart, 1996] et Bmcol-2 [Scott *et al.*, 1995] codant pour des collagènes cuticulaires respectivement de *B. pahangi* et *B. malayi*. L'hybridation a été réalisée à 51°C. Les lavages ont été effectués exactement selon les recommandations du kit (2X5 min. in 2X SSC, 1% SDS; 2X 15 min. in 0.1X SSC, 1% SDS; 2X5 min. in 1X SSC). Les clones sélectionnés ont été amplifiés par PCR à l'aide des amorces T3 et T7 localisées sur le phage λ Zap II (Table 2).

Sous-clonage et séquençage de l'ADN

Les ADNc sélectionnés par PCR et les produits PCR des clones sélectionnés par hybridation ont été sous-clonés dans le plasmide Bluescript SK- selon la méthode du 'plasmide + T' [Marchuk *et al.*, 1991]. L'ADN a été séquencé grâce à un séquenceur automatique LI-COR 4000 (MWG), avec de la thermoséquénase (Amersham) et des amorces marquées à l'IRD 800 (amorces standard M13 reverse et M13 universal (-20)). L'ADNg amplifié par PCR a été

séquencé directement avec les amorces appropriées (AsRMET, Bptot5', Bp3') (Table 2). Les analyses des séquences ont été réalisées grâce au programme DNA Strider™ 1.0.1, ainsi qu'au programme Clustal W [Thompson *et al.*, 1994].

Extraction de l'ARN, synthèse des ADNc et séquençage

Aucun *Ascaris* vivant n'ayant pu être obtenu pour cette partie du travail, l'extraction d'ARN a été réalisée sur des vers stockés à -20°C. Les organes internes et la majorité des tissus musculaire ont été retirés rapidement par dissection. L'hypoderme, après avoir été séparé de la cuticule, a été soumis à une extraction au TRIzol®, selon le protocole recommandé par le distributeur (GIBCO BRL, Life Technologies). Pour la synthèse des ADNc, environ 2 µg d'ARN totaux ont été utilisés. La RT-PCR a été effectuée à 42°C selon le protocole décrit par Martin et collaborateurs [Martin *et al.*, 1995]. Le second brin a été amplifié par une PCR classique (94°C 2 min.; 35 cycles: 94°C 30 sec., Ta°C 30 sec., 72°C 1 min.; 72°C 5 min.) avec une amorce de 22-nt reconnaissant la séquence guide SL1 en 5' et une amorce spécifique à la séquence en 3' du gène étudié (Tables 2 et 3, Fig. 1). Les ADNc obtenus ont été clonés dans le plasmide Bluescript SK- et séquencés avec les amorces standards M13 reverse et universal.

'Screening' d'une banque d'ADNc de L3 de *Brugia pahangi*

Une banque construite à l'aide d'une amorce reconnaissant le 'spliced leader' SL1 a été criblée pour obtenir le gène *Bpcol-1* complet. Les phages λZap II ont été cultivés par infection de la souche d'*E. coli* XL1-Blue. Les colonies obtenues ont été transférées sur une membrane de Nylon chargé positivement. La sélection des clones a été effectuée par hybridation. Le gène *Bpcol-1* partiel, après amplification par PCR et marquage à la biotine (Kit GIBCO BRL) a été utilisé comme sonde froide. La révélation des clones positifs a été réalisée grâce à un kit chémiluminescent (Tropix, Perkin Elmer).

Résultats et discussion

Expression et immunogénicité du produit du gène *Bpcol-1*

Nous avons tout d'abord tenter d'obtenir le gène *Bpcol-1* par amplification par PCR sur une banque d'ADNc du troisième stade larvaire de *B. pahangi* [Martin *et al.*, 1996] à l'aide des amorces Bp5' et Bp3' (Table 2). La PCR ne donnant aucun résultats, nous avons utilisé le clone 19.1 du gène *Bpcol-1* partiel [Bisoffi & Betschart, 1996] pour construire et produire la protéine de fusion. Au regard des connaissances sur les collagènes de la cuticule, bien qu'incomplet, l'ADNc en question est représentatif de la protéine. En effet, la partie manquante correspond aux domaines comportant le signal de sécrétion potentiel et les sites de clivage [Kramer, 1994]. La séquence partielle décrite par Bisoffi et Betschart contient le site de clivage de type subtilisine du block d'homologie A [Ray & Hussey, 1995]. De ce fait, la protéine produite est complète.

Le *Bpcol-1* (clone 19.1) amplifié par PCR à l'aide des amorces Bp5' et Bp3' a été inséré dans le plasmide pGEX. La protéine de fusion GST-*Bpcol-1* induite avait la taille attendue de environ 50 kDa qui correspond aux 21.5 kDa du collagène additionné de 29 kDa de la GST (Fig. 2). Le rendement de la synthèse de la protéine de fusion est toujours nettement inférieur à celui de la GST seule (Fig. 2).

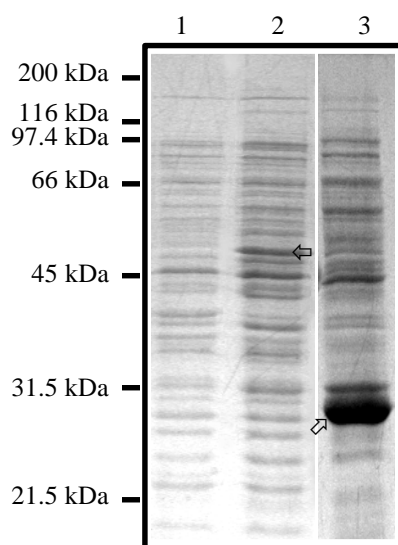


Fig. 2. Induction du collagène *Bpcol-1*. Gel SDS-polyacrylamide 12% coloré au bleu de Coomassie.

1. Extrait de bactéries transformées avec le plasmide pGEX/*Bpcol-1* avant induction; **2.** Extrait de bactéries après induction. ◻ = protéine de fusion (*Bpcol-1* + GST); **3.** Extrait de bactéries transformées avec le pGEX sans insert. ◊ = GST. Les valeurs en kDa correspondent au marqueur de poids moléculaires (Bio-Rad, Broad Range Molecular Marker).

Les collagènes de la cuticule des nématodes sont très instables dans les bactéries. En effet, la présence de régions non hélicales, sensibles aux protéases est à l'origine de dégradations rapides. Ce phénomène est illustré dans la figure 2, où plusieurs bandes supplémentaires sont présentes dans l'échantillon 2, après induction de la protéine de fusion (par exemple à ~ 47, 40 et 38 kDa). L'utilisation d'une souche déficiente en protéase, comme la souche BL21 d'*E. coli* pourrait peut-être éliminer le problème. La nature de la protéine (bande de 50 kDa) a été confirmée par une digestion totale à la collagénase (Fig.3). Dans ce but, une collagénase de *Clostridium histoloticum* a été utilisée. Cette enzyme reconnaît de façon hautement spécifique la structure répétitive (Gly-X-Y)_n typique des collagènes.

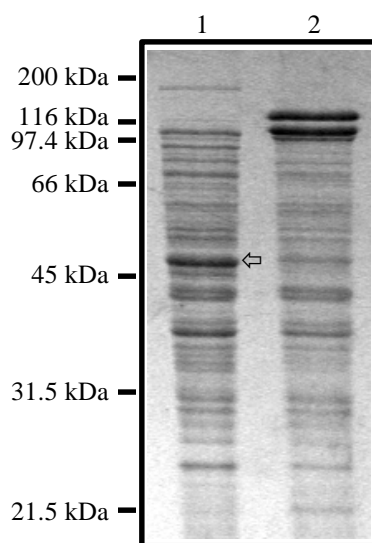


Fig. 3. Digestion de la protéine de fusion à la collagénase. Gel SDS-polyacrylamide 12% coloré au bleu de Coomassie.

1. Extrait de bactéries après induction, incubé toute une nuit à 37°C; **2.** Extrait de bactéries transformées, digéré toute la nuit à la collagénase; ⇐ = protéine de fusion. Les valeurs en kDa correspondent au marqueur de poids moléculaires (Bio-Rad, Broad Range Molecular Marker).

Contrairement aux collagènes de vertébrés qui ne sont pas immunogènes, ceux de la cuticule des nématodes le sont fortement. Les anticorps formés contre ces protéines sont spécifiques au stade et dans une certaine mesure à l'espèce de nématode et aucune reconnaissance n'est observée contre les collagènes de vertébrés (communication personnelle, Bruno Betschart). Ce résultat conduit à l'hypothèse que les épitopes correspondent aux régions non-hélicales riches en cystéines des collagènes cuticulaires.

Lors de l'invasion d'un hôte par un nématode parasite, la première mue a lieu très tôt après l'infection, ce qui implique que les collagènes de la cuticule sont rapidement accessibles au système immunitaire. L'identification des épitopes pourrait donc mener à l'élaboration de tests de diagnostic spécifiques qui permettraient de détecter les infections avant l'apparition des symptômes.

Dans le cadre de ce travail, deux souris Balb C ont été immunisées avec la protéine de fusion complète (GST+Bpcol-1) purifiée par électroélution après migration sur un gel acrylamide en présence de SDS.

Les sera des deux souris ont été testés par immunoblot sur un extrait de bactéries, après expression de la protéine de fusion GST-Bpcol-1 et sur des extraits totaux de *B. pahangi*. Mis à part une réaction faible lors d'un test avec le serum de la souris 1, les résultats étaient toujours négatifs.

La faible immunogénicité de l'extrait est peu vraisemblable, car la GST est connue pour induire une forte réponse lors des immunisations. Un extrait de bactéries exprimant la GST seule a également été testé, là encore sans succès, prouvant ainsi l'échec de l'immunisation. Une nouvelles série d'immunisation n'a pas pu être entreprise dans le cadre de ce travail, mais elle devrait être envisagée, éventuellement avec une autre souche de souris ou avec une quantité de protéine supérieure à celle utilisée ici.

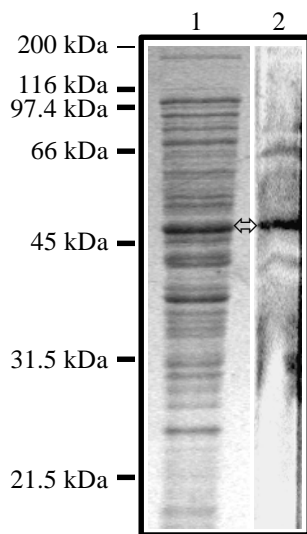


Fig. 4. Détection du collagène *Bpcol-1* par immunoblot. **1.** Extrait de bactéries après expression du gène *Bpcol-1*. Séparation sur gel d'acrylamide (12 %), coloration au bleu de Coomassie; **2.** Immunoblot après transfert sur une membrane de nitrocellulose. ⇔= protéine de fusion. Les valeurs en kDa correspondent au marqueur de poids moléculaires (Bio-Rad, Broad Range Molecular Marker).

Suite à ces résultats, un nouveau test visant à confirmer la nature collagèneuse du produit du gène *Bpcol-1* a été réalisé. Une réaction immunologique à l'aide d'un serum de lapin immunisé par un extrait de collagènes totaux de la cuticule de *B. pahangi* a donné une réaction forte sur la bande correspondant à la protéine de fusion (Fig. 4). Lors des tests visant à contrôler la spécificité du serum sur des collagènes de vertébrés, aucune réaction croisée n'a été observée. Un deuxième test à partir d'un serum de patient infecté par *Dipetalonema perstans* a également donné un signal (trop faible pour être reproduit ici). Ce résultat n'a malheureusement pas pu

être confirmé vu la faible quantité de serum à disposition. Il serait néanmoins intéressant de continuer dans cette direction à l'aide d'autres sera de patients infecté par des nématodes.

Isolation et séquençage des gènes d'*Ascaris suum* codant pour des collagènes

Deux nouveaux gènes codants pour des collagènes de la cuticule d'*A. suum* ont été obtenus à partir d'une banque d'ADNc d'*A. suum* adultes.

Le premier gène (n° d'accès: AJ243805) a été isolé par PCR à l'aide d'une amorce correspondant à une des extrémités de la région codante du *Bpcol-1* de *B. pahangi* (Bp5' ou Bp3') et une autre amorce reconnaissant une région du phage λ Zap II (T3 ou T7) proche du site d'insertion du gène (Table 2 et Fig. 1). A la suite d'un sous-clonage dans le plasmide Bluescript SK-, un fragment de 1093 bp, comprenant un cadre de lecture ouvert de 855 bp, suivie d'un codon stop et d'un site potentiel de polyadénylation a pu être séquencé à l'aide des amorces standards 'M13 universal' et 'M13 reverse'. Comme le fragment ne présentait pas de codon d'initiation (méthionine), une RT-PCR sélective a été effectuée sur de l'ARN total d'hypoderme d'*A. suum* adulte avec en 5' une amorce reconnaissant la séquence guide SL1 (spliced leader sequence) et une amorce interne (AsRmid5') en 3'. La région manquante de l'extrémité 5', longue de 33 bp, a pu être identifiée. Elle inclut le 'spliced leader' de 22 nucléotides SL1, typique des nématodes [Nilsen, 1993] et 9 bp codant pour le début du gène, incluant la méthionine initiatrice. ce nouveau gène a été nommé *Ascol-C* (*Ascaris suum* collagène C), selon les recommandations du 'WHO-sponsored *Brugia* EST project' [Blaxter *et al.*, 1997]. Une recherche d'homologie dans les banques de données ('BLAST analysis') a montré que ce gène correspond à la séquence incomplète d'*A. suum*: *col-6* (Ruiz & Kazacos, n° d'accès: AF035410).

Dans le but d'obtenir les séquences génomiques complètes de *Ascol-C* et *Bpcol-1*, nous avons également amplifié de l'ADNg extraits du muscle d'*A. suum* avec les amorces AsRMET et Bp3' et de l'ADNg de *B. pahangi* adultes (σ et ♀) avec les amorces Bptot5' et Bp3'. Les produits PCR obtenus, respectivement de 1541 et 1222 bp (n° d'accès: AJ249372 et AJ49374) ont été séquencés avec les mêmes amorces marquées à l'IRD 800. *Ascol-C* et *Bpcol-1* présentent tous deux trois introns.

Le second gène de collagène (n° d'accès: AJ249373) a été identifié par hybridation chimiluminescente. La sonde de 20 nucléotides, marquée à la biotine, reconnaissait une

séquence codant pour un fragment de triple-hélice (Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-GLy) commun au *Bpcol-1* de *B. pahangi* et au *Bmcol-2* de *B. malayi*. Le clone isolé correspond à un ADNc incomplet, comprenant une région codante de 280 acides aminés suivie d'un codon stop, ainsi qu'un signal de polyadénylation potentiel. Ce gène a été nommé *Ascol-D* (*Ascaris suum* collagène D). Une RT-PCR a été effectuée à l'aide de l'amorce SL1 et d'une amorce interne F19mid5' (Fig. 1) pour compléter la séquence en 5'. Il n'a cependant pas été possible d'obtenir le début du gène.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cet échec:

1. l'ARNm d'*Ascol-D* ne subit pas de trans-épissage.
2. la qualité de l'ARN extrait des tissus conservés à -20°C n'était pas suffisante et la transcriptase inverse n'a pas pu transcrire le gène.

Le choix d'un code alphabétique pour ces deux nouveaux gènes a été influencé par le fait que les deux seuls gènes de collagènes de la cuticule d'*A. suum* dont il est fait mention dans la nomenclature sont nommés *NEMCOLA* (= *COLA4*) et *NEMCOLB* (= *UCOLI*) [Kingston *et al.*, 1989].

Présence d'un allèle d'*Ascol-C*

Chez les nématodes, deux types d'épissages sont utilisés: le 'trans-' et le 'cis-splicing'. Une préférence pour le 'trans-splicing' a été observée chez *C. elegans* (>50% des gènes) et chez *Ascaris* (> 80%) [Nilsen, 1993]. Le 'spliced leader' de 22 nucléotides SL1 [Krause & Hirsch, 1989], a été identifié chez plusieurs espèces de nématodes [Nilsen, 1993]. Un deuxième 'spliced leader' (SL2) a été décrit chez *C. elegans* [Huang, 1989]. Nettement moins fréquent que le SL1, il semble être impliqué dans des processus de transcription d'unités polycistroniques. A ce jour, cette deuxième séquence n'a pas été mise en évidence chez d'autres nématodes.

Les nombreux gènes codants pour les collagènes, dispersés dans le génome, forment une large famille. Chacun de ces gènes est exprimé à un moment précis du développement du ver et bien que les polypeptides codés par ces gènes présentent des similarités fortes dans leur structures, le niveau d'homologie entre les différentes séquences en acides aminés varie de 54% à 99,5%. Rarement des gènes codant pour des collagènes apparaissent sous forme de tandem dans le génome. Dans le cas du tandem *col-12* et *col-13* de *C. elegans* [Park & Kramer, 1990], deux

modes d'épissages différents ont été observés. Le premier gène subit un 'cis-splicing' et le second un 'trans-splicing'. Les séquences en nucléotides de ces deux gènes sont virtuellement identiques (99.5% d'homologie). Leur proximité (1.8 Kb) et leur similarité laissent supposer qu'ils découlent de la duplication d'un gène ancestral. Park et Kramer [1990] ont montré que les deux gènes sont exprimés en même temps, et à un niveau équivalent. Ce dédoublement du gène permet probablement la production d'une protéine nécessaire en grande quantité lors de la formation de la cuticule de l'adulte (et dans une moindre mesure de la L4) [Park & Kramer, 1990].

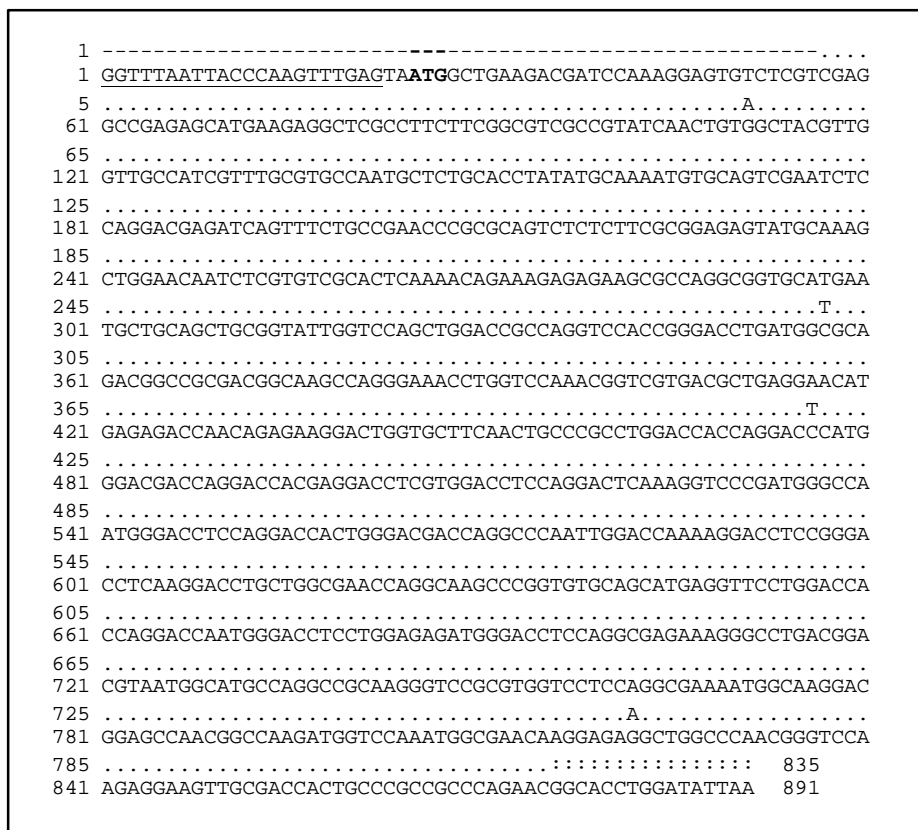


Fig. 5. Comparaison du gène *Ascol-C* (ligne inférieure) avec la séquence AsR4. Les tirets indiquent des gaps et les points les positions conservées. La séquence du spliced leader SL1 est soulignée et le codon initiateur est en gras. L'extrémité 3', marquée par une série de doubles-points, n'a pas été séquencée car elle correspond au primer utilisé pour la PCR. La troisième modification induit un changement au niveau de l'acide aminé codé (CTC=Leu; CCC=Pro).

Bien que l'hypothèse d'un artefact dû à la PCR ne puisse être écarté, la présence d'un allèle du gène codant pour *Ascol-C* devrait être testée. En effet, lors des nombreuses PCR effectuées, nous avons toujours observé une et rarement deux bases modifiées sur l'ensemble du gène. Dans un cas seulement, quatre bases étaient différentes (homologie = 99.5%), et une seule impliquait un changement de codon (Fig. 5). De plus, ce clone (AsR4) est plus court en 5' (19

bp en moins) alors que toutes les autres séquences isolées par PCR (amorces T3 + Bp3') ont la même taille. La première base de l'extrémité N-terminale correspond au 33^{ème} nucléotide du gène *Ascol-C* complet (Fig. 5).

Lors des expériences visant à obtenir le codon initiateur du gène *Ascol-C*, les séquences obtenues, correspondaient à chaque fois au gène *Ascol-C*. Ce résultat, si le deuxième gène existe réellement, pourrait être dû à une sélection fortuite. En effet, étapes de RT-PCR et de PCR ont été réalisées à l'aide d'un primer reconnaissant le 'spliced leader' SL1. Par cette technique, tous les gènes subissant un autre type d'épissage ont été écartés.

Dans le cadre de cette étude, la présence dans l'ADN génomique d'*A. suum*, d'un autre gène, identique à *Ascol-C*, n'a pas été testée.

Structure des gènes *Ascol-C* et *Ascol-D* et comparaison avec d'autres collagènes de nématodes

Les protéines déduites de la séquence en nucléotides de *Ascol-C* et *Ascol-D* présentent le profil typique de triple-hélices non-continues des collagènes de nématodes. L'organisation des cystéines dans les régions non-hélicales I, II, et III (Fig. 6) est en total accord avec les données obtenues chez *C. elegans* [Cox *et al.*, 1989]. En ce qui concerne l'organisation de leur extrémité amine les deux protéines correspondant aux gènes *Ascol-C* et *Ascol-D* sont en accord avec les résultats de Kramer [1994] sur les collagènes de *C. elegans*. La région hydrophobe, supposée être un signal de sécrétion, ainsi que les quatre zones d'homologies ('homology blocks') HB(A-D) sont présentes.

Sur la base de l'organisation des cystéines et des régions triple hélicales, les collagènes, peuvent être répartis en cinq classes [Johnstone, 1993]. La protéine déduite de la séquence de *Ascol-C* présente le schéma typique des collagènes de classe B. Les 9 derniers acides aminés de la queue carboxyle sont également en accord complet avec la classe B [Kramer, 1994]. *Ascol-C* présente avec *Bpcol-1* une homologie de 70% en ce qui concerne la séquence en nucléotides et de 77% pour les acides aminés. Les analyses de similarité dans les banques de données (NCBI) ont montré que *Ascol-C* présente également une homologie plus faible avec les gènes *colost-1* et *colost-2* du parasite du mouton *O. circumcincta* [Johnstone *et al.*, 1996]

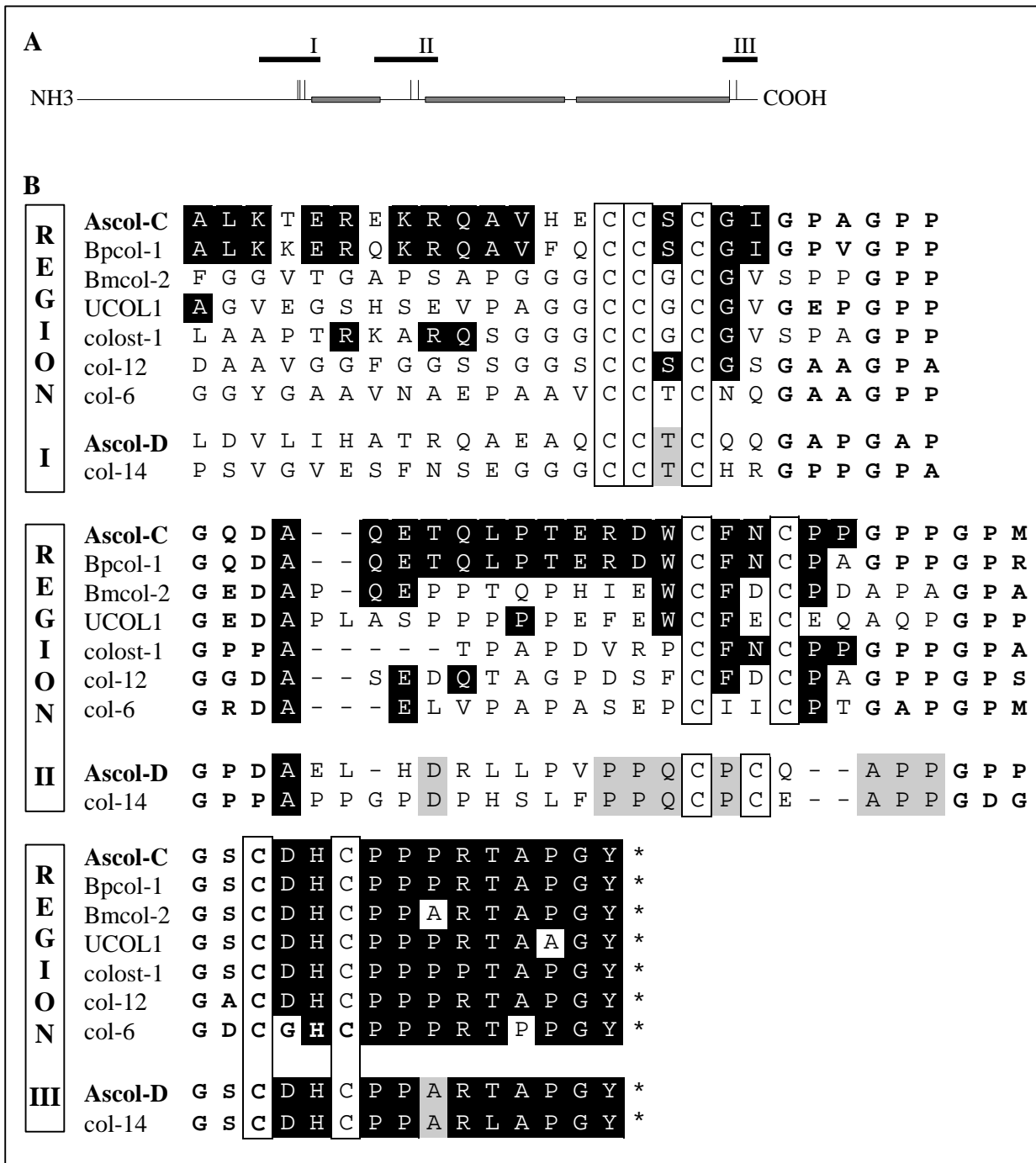


Fig. 6. (A) Localisation des régions I, II et III [Cox *et al.*, 1989]. Les zones triple-hélicales sont indiquées par des rectangles gris et les cystéines conservées par des traits verticaux. (B) Comparaison de la séquence en acides aminés des régions I, II et III de différents collagènes de nématodes. *Ascol-C* et *Ascol-D* sont comparés avec des gènes de *C. elegans* (*col-6*, *col-14* [Cox *et al.*, 1989] et *col-12* [Park et Kramer, 1990]), *O. circumcincta* (*colost-1* [Johnstone, 1996]) *A. suum* (*UCOL1* [Kingston *et al.*, 1989]), *B. malayi* (*Bmcol-2* [Scott *et al.*, 1995]) et *B. pahangi* (*Bpcol-1* [Bisoffi et Betschart, 1996]). Des 'gaps' ont été introduits afin d'améliorer l'alignement. Les cystéines conservées sont encadrées et les caractères gras indiquent le début et la fin des régions hélicales. Les positions colorées en noir correspondent aux acides aminés de *Ascol-C* conservés dans les autres gènes. Les positions hachurés indiquent les acides aminés identiques chez *Ascol-D* et *col-14*, mais différents chez *Ascol-C*. Les codons stop sont indiqués par un astérisque.

et les gènes *col-12* et *col-13* du nématode libre *C. elegans* [Park & Kramer, 1990]. Les séquences en acides aminés sont similaires, cependant le nombre d'introns diffère.

Ascol-C en a trois alors que les gènes de *O. circumcincta* et de *C. elegans* mentionnés plus haut n'en ont qu'un seul. Comme les gènes *colost-1* et *colost-2* [Johnstone *et al.*, 1996], *Ascol-C* présente deux délétions (de 15 bp chacune) de chaque côté de la région d'homologie HBA (Fig. 7). La région HBA de *Ascol-C*, en accord avec les données sur *C. elegans*, présente une séquence très proche des sites de clivage de type subtilisine 'RKARR' [Kramer, 1994; Ray & Hussey, 1995].

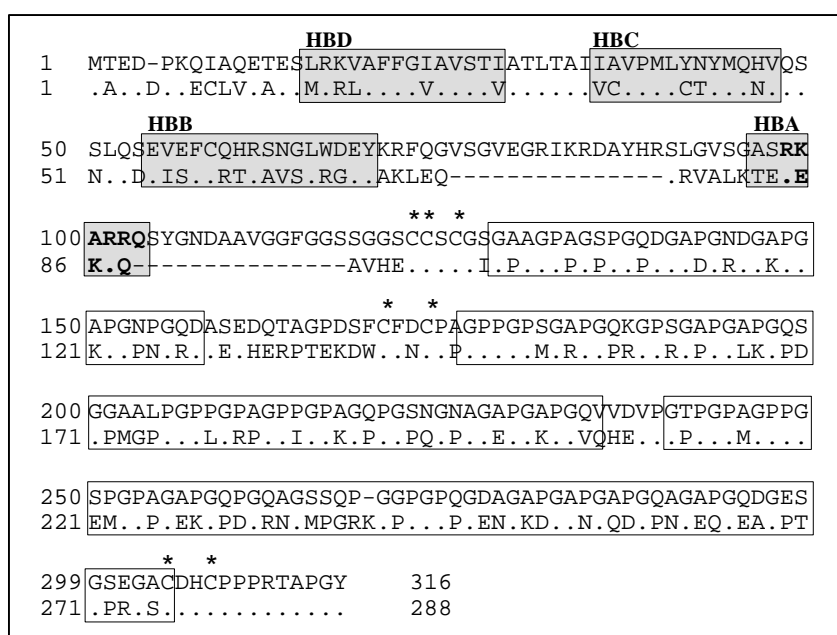


Fig. 7. Comparaison de la séquence en acides aminés du gène *col-12* de *C. elegans* [Park & Kramer, 1990] et de *Ascol-C* (ligne inférieure). Les délétions sont indiquées par des tirets et les positions conservées par des points. Les zones grises correspondent aux domaines d'homologies HB (A-D) [Kramer, 1994]. Les rectangles vides délimitent les régions (Gly-X-Y)_n. Les cystéines conservées spécifiques de la classe de collagènes B sont marquées par un astérisque. La région présentant une homologie avec le site de clivage de type subtilisine est gras [Kramer, 1994; Ray & Hussey, 1995].

Après introduction de 'gaps' afin de maximaliser l'alignement des séquences en acides aminés, les régions I, II et III [Cox *et al.*, 1989] d'*Ascol-C* se sont avérées similaires à celles des gènes *UCOL1* d'*A. suum* [Kingston *et al.*, 1989] et *Bmcol-2* de *B. malayi* [Scott *et al.*, 1995] (Fig. 6). *Ascol-C*, *UCOL1*, *Bpcol-1* et *Bmcol-2* présentent tous les quatre un tryptophane immédiatement devant la première cystéine de la région II (Fig. 6). Aucun autre collagène cuticulaire décrit à ce jour ne présente de tryptophane à cet endroit. Le tryptophane, un acide aminé volumineux, est absent des collagènes de vertébrés [Kühn, 1982] et rare chez les

collagènes de la cuticule des nématodes. Kramer [1994] mentionne un tryptophane, localisé dans le bloc HBB, qui est conservé à 84% chez les collagènes de *C. elegans*. *Ascol-C* et *Bpcol-1* ne possèdent pas ce tryptophane.

La séquence de *A. suum* similaire à *Ascol-C*, disponible dans les banques de donnée (Ruiz and Kazacos, n° d'accès: AF035410), a été décrite comme étant l'équivalent du gène *col-6* de *C. elegans* et, de ce fait, a été nommée *col-6* de *A. suum*. Bien que faisant partie de la même classe de collagène que *col-6*, le gène décrit ici présente peu d'homologie avec le *col-6* de *C. elegans* au niveau de la séquence en acides aminés, y compris dans l'organisation des régions I, II et III (Fig. 6). Le gène *Ascol-C* comprend le 'spliced leader' SL1 [Nilsen, 1993] et la région codante est 45 bp plus longue que celle du *col-6* d'*A. suum*, qui par conséquent est incomplet.

La protéine déduite du gène *Ascol-D* présente également l'organisation typique des collagènes de la cuticule des nématodes. Avec une homologie de 54%, le gène le plus proche est le *col-14* de *C. elegans* [Cox et al., 1989]. *Ascol-D* présente trois délétions de 4, 13 et 24 aa dans les régions adjacentes au domaine HBA (Fig. 8).

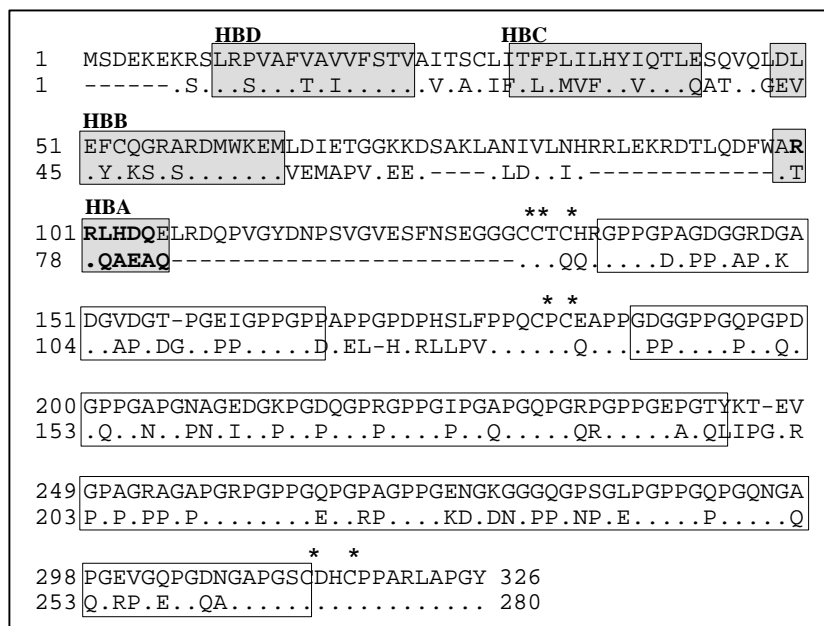


Fig. 8. Comparaison des séquences en acides aminés des gènes *col-14* [Cox et al., 1989] de *C. elegans* (ligne du haut) et de *Ascol-D*. Les tirets indiquent les 'gaps' et les points les positions conservées. Les quatre blocs d'homologie HB (A-D) [Kramer, 1994] sont marqués en gris. Les rectangles vides délimitent les zones α -hélicales. Les cystéines conservées sont marquées d'un astérisque. La région présentant une homologie avec un site de clivage de type subtilisine est en gras [Ray & Hussey, 1995].

En ignorant les zones des délétions, le pourcentage d'homologie s'élève à 61%. Lors d'analyses d'homologie de la séquence en acides aminés dans la banque de donnée TREMBL, presque toutes les protéines sélectionnées, autres que le *col-14*, correspondaient à des collagènes de vertébrés. *Ascol-D* s'apparente aux collagènes de classes B [Johnstone, 1993]. Une analyse plus approfondie des similarités entre *Ascol-D* et *col-14* ont démontré un schéma identique chez les deux protéines. Les deux cystéines de la région II de *Ascol-D* sont séparées par un seul acide aminé (Fig. 6). Ce groupement de cystéines n'a jusqu'à aujourd'hui été décrit que chez le *col-14* de *C. elegans* (Fig. 8). Ce résultat justifie qu'une sous-classe B.1 soit ajoutée à la classification de Johnstone (Table 4).

Table 4.

Classe B des collagènes cuticulaires de nématodes						
Classe	Domaine					Gène
	I	IV	II	V	III	
B	C0C1C	44	C2C	130	C2C	<i>col-12</i>
	C0C1C	44	C2C	130	C2C	<i>col-13</i>
	C0C1C	43	C2C	130	C2C	<i>col-6</i>
	C0C1C	45	C2C	130	C2C	<i>col-36</i>
	C0C1C	44	C2C	130	C2C	<i>col-40</i>
	C0C1C	44	C2C	130	C2C	<i>Bmcol-2</i>
	C0C1C	46	C2C	131	C2C	<i>UCOL1</i>
	C0C1C	44	C2C	131	C2C	<i>colost-1</i>
	C0C1C	44	C2C	131	C2C	<i>Bpcol-1</i>
	C0C1C	44	C2C	131	C2C	<i>Ascol-C</i>
B.1	C0C1C	46	C1C	130	C2C	<i>col-14</i>
	C0C1C	46	C1C	129	C2C	<i>Ascol-D</i>

Les domaines I à V correspondent à ceux décrits en page 19 du présent travail. Dans les domaines I à III, les chiffres correspondent au nombre d'acides aminés séparant les cystéines (=C). Pour les domaines IV et V, les valeurs représentent le nombre d'acides aminés.

Homologies entre *Ascol-C* et *Bpcol-1*

Une analyse (sur le serveur de NCBI) a mis en évidence un haut degré d'homologie entre *Ascol-C* et le gène incomplet *Bpcol-1*, qui a été isolé d'une banque d'ADNc de *B. pahangi* adulte [Bisoffi & Betschart, 1996]. Martin et collaborateurs ont isolé chez *B. pahangi* un fragment de 273 bp représentant 3 % des ARNm (Trans-épissés avec les SL1) de la larve 3 après infection [Martin *et al.*, 1996]. Leur clone correspond à la partie manquante du gène

Bpcol-1. Ils ont montré que l'expression de ce gène atteint un maximum trois jours après l'infection. Dans les stades suivants (L4 et adulte) l'expression présente un niveau plus bas. Le même phénomène a également été mentionné dans le cas du gène *Bmcol-2* de *B. malayi* [Scott *et al.*, 1995]. L'ARNm complet du gène *Bpcol-1*, par rapport à *Ascol-C*, comprend trois nucléotides supplémentaires (codant pour une sérine) localisé en position 4. La banque d'ADNc du troisième stade larvaire de *B. pahangi* que nous avons utilisée pour tenter d'obtenir l'ADNc complet de *Bpcol-1* pour l'expression du gène, était la même que celle utilisée par Martin et collaborateurs dans leur étude sur la différence d'expression des gènes chez les différents stades [Martin *et al.*, 1996]. Lors de la construction de la banque, en raison de la présence d'un site de restriction *EcoR I* entre les positions 208 et 214, seul le début du gène *Bpcol-1* a été inséré dans le vecteur. L'amorce Bp5' reconnaît une séquence de 23 nucléotides située entre la position 217 et 238, ce qui explique que nos essais d'hybridation et d'amplification par PCR du gène *Bpcol-1* dans cette même banque se sont toujours soldés par un échec.

En plus du taux d'identité élevé de la séquence en acides aminés (77%), des homologies fortes sont évidentes entre *Ascol-C* et *Bpcol-1*, en ce qui concerne les acides aminés potentiellement impliqués dans les liaisons intercaténares (Fig. 9). *Ascol-C* et *Bpcol-1* présentent tous deux 11 cystéines, parmi lesquelles 10 occupent exactement la même position. En règle générale, les cystéines impliquées dans des ponts disulfures sont fortement conservées alors que celle qui ne participent pas à des liaisons de ce type sont peu conservées. Dans le cas des collagènes *Ascol-C* et *Bpcol-1*, la première cystéine de chaque gène n'est pas conservée. Elles sont toutes deux situées dans la région N-terminale, en aval du site de clivage de type subtilisine et ne jouent donc probablement aucun rôle dans la cohésion des sous-unités entre elles. Dans le cas des cystéines, la troisième position du codon peut être occupée soit par une cytosine, soit par une uridine. *Ascol-C* présente une préférence évidente pour la cytosine (10/11) tandis que *Bpcol-1* présente l'uridine et la cytosine respectivement 5 et 6 fois dans la position 3 du codon.

Neuf des 14 lysines présentes chez les deux gènes sont identiques (Fig. 9). Quatre des cinq autres lysines du gène *Bpcol-1* correspondent à des arginines chez *Ascol-C*, et représentent donc une modification d'acide aminé conservative. Dans le cas de la lysine, la troisième position du codon peut-être occupée par l'adénine ou la guanine. Pour le *Bpcol-1* une préférence forte pour l'adénine (12/14) est observée et pour l'*Ascol-C*, une préférence plus faible pour la guanine (9/14).

Les deux tyrosines du *Bpcol-1* sont conservées chez *Ascol-C*, la première en position 45. Elle correspond à une tyrosine conservée à 71% chez les collagènes de *C. elegans*, localisée dans la région d'homologie HBC [Kramer, 1994]. La seconde correspond au dernier acide aminé de la protéine et représente une tyrosine conservée, typique de la classe de collagènes B [Johnstone, 1993]. *Ascol-C* présente une tyrosine supplémentaire située à la dernière position du bloc HBB (Fig. 5 et 9).

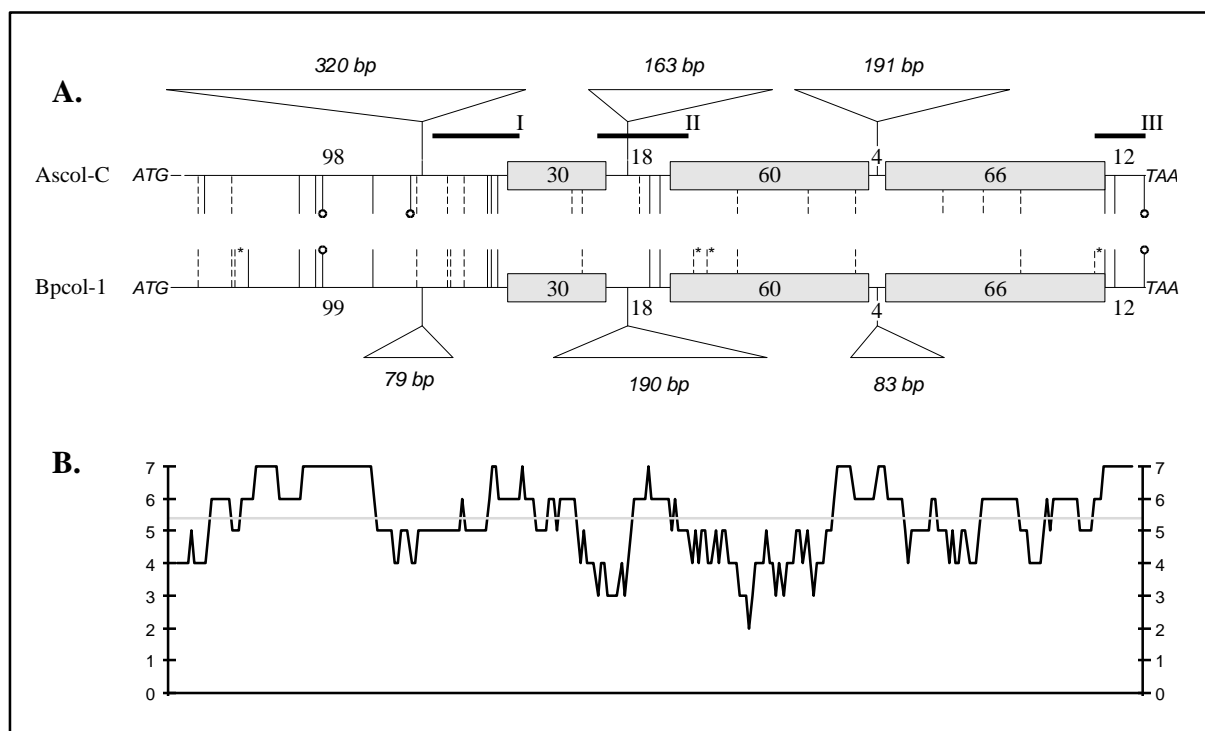


Fig. 9. (A) Représentation schématique de l'organisation des domaines d'acides aminés des collagènes *Ascol-C* et *Ascol-D*. Les chiffres indiquent le nombre d'acides aminés de chaque région. Les rectangles représentent les domaines hélicaux, les lignes verticales pleines: les cystéines, les lignes verticales discontinues: les lysines, les lignes surmontées d'un cercle: les tyrosines. Les astérisques marquent les lysines du *Bpcol-1* qui correspondent à des arginines dans l'*Ascol-C*. Le codon initiateur (ATG) et le codon stop (TAA) sont compris dans le total des acides aminés. Un 'gap' de 1-aa a été ajouté en position 4 du collagène *Ascol-C* pour améliorer l'alignement. Les régions I, II et III indiquées par un épais trait horizontal sont comparées en détails dans la figure 2. La position des introns est indiquée par un triangle et leur taille est mentionnée en italique. (B) Analyse de l'homologie entre les séquences en acides aminés des gènes *Ascol-C* et *Bpcol-1* par 'Window Stringency'. Le graphique a été construit par détermination de l'homologie de chaque acide aminé et des trois acides aminés situés immédiatement de chaque côté. Le nombre d'acides aminés homologues est reporté (0-7) sous l'acide aminé central. Les trois premières ainsi que les trois dernières positions (qui n'ont pas trois aa de chaque côté) ne sont pas incluses dans ce graphe. La ligne grise indique l'homologie moyenne (77% ou 5.4 sur 7 acides aminés).

L'importance des ponts disulfures et des liaisons covalentes de type di-tyrosine et isotri-tyrosine est connue chez les collagènes de la cuticule des nématodes [Fujimoto *et al.*, 1981;

Marti, 1991]. La présence de liaisons impliquant des tyrosines est probablement une des raisons parmi d'autres de la détection de collagènes plus grands (53 à > 200 kDa) que la taille attendue (28-35 kDa) pour des protéines codées par des gènes d'environ 1 kb. Les hydroxylysines n'ont jamais été détectées dans la cuticule d'*A. suum* [Cox, 1992], mais les positions hautement conservées des lysines dans les gènes *Ascol-C* et *Bpcol-1* pourraient indiquer la présence de liaisons covalentes de type 'base de Schiff', impliquant des résidus lysyls, semblables à celles décrites chez les collagènes de vertébrés [Kühn, 1982; Rawn, 1989]. Différentes études indiquent que les collagènes de la cuticule de nématodes contiennent 1 ou 2 introns de petites tailles (50-100 bp) chez *C. elegans* et chez le parasite du mouton *H. contortus* [Cox, 1992] et de taille nettement supérieure chez *A. suum* (jusqu'à 560 bp) [Kingston *et al.*, 1989]. Les *Ascol-C* et *Bpcol-1* génomiques présentent tous deux trois introns, situés exactement à la même position (en tenant compte des trois nucléotides en moins chez *Ascol-C*) mais présentant des variations de taille. Le premier intron (*Ascol-C*: 320 bp / *Bpcol-1*: 79 bp) est situé entre les 216 et 217^{ème} nucléotides, le deuxième (163 bp / 190 bp) entre le 402 et le 403^{ème} et le troisième (191 bp / 83 bp) entre le 624 et le 625^{ème} (Fig. 9).

Table 5 Homologies des séquences impliquées dans le 'splicing' des introns

Séquences signal de l'épissage des introns		
	'Splice donor'	'Splice acceptor'
<i>C. elegans</i> (séquence consensus) ¹	RAG/ <u>G</u> TAA <u>G</u> TT	TTTC <u>A</u> G/R
<i>Ascol-C</i>:		
Intron 1	AAG/GTACATT	TTTCAG/C
Intron 2	AGA/GTAAGTA	TTTCAG/C
Intron 3	GAG/GTAACCA	ATTTAG/G
<i>Bpcol-1</i>:		
Intron 1	AAA/GTACATT	TTTTAG/C
Intron 2	CTG/GTAAGTT	TTTCAG/C
Intron 3	GAG/GTTTGTT	TTTTAG/G

¹ R = purine; / = site d'épissage; les positions absolument conservées sont soulignées; les autres acides aminés sont présents à ces positions à 60-75 % chez les gènes de *C. elegans* codant pour des collagènes [Cox *et al.*, 1989].

Ces résultats confirment que les introns sont beaucoup plus grands chez les collagènes cuticulaires de *A. suum*. Le gène *Bpcol-1* de *B. pahangi* comporte des introns de tailles

intermédiaires (79 à 190 bp). Les introns de ces deux gènes sont localisés dans les zones non-hélicales (Fig. 9) et présentent des séquences de 'splice donor' et 'splice acceptor' en accord avec celles décrites chez *C elegans* [Cox *et al.*, 1989] (Table 5).

Kramer et collaborateurs ont comparé la région remorque ('3'-flanking region') de deux gènes de *C. elegans*, *col-1* et *col-2*, codant pour des collagènes de classe A [Kramer *et al.*, 1985]. Ces gènes présentent tous deux une région de 10 nucléotides: 5'-TTCAACTTCT-3'. *Ascol-C* présente une séquence identique pour neuf des 10 bp située 94 bp après le codon stop. Le gène *Bpcol-1* présente également une séquence, à 111-nt du codon stop, qui pourrait correspondre aux 10 nucléotides décrits chez *col-1* et *col-2*, mais avec uniquement 8 positions conservées (Fig. 10).

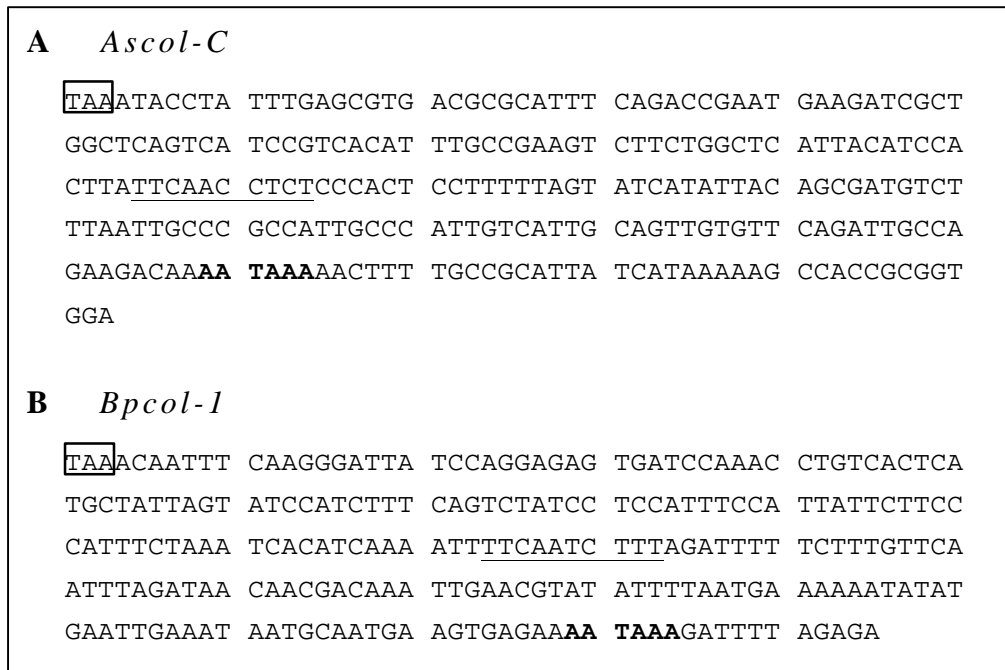


Fig. 10. Comparaison de la séquence en nucléotides des 'flanking regions' d'*Ascol-C* (A) et *Bpcol-1* (B). Les codon stop sont encadrés. Les signaux potentiels de polyadénylation sont en gras. Les 10 nucléotides correspondant à la séquence décrite par Kramer et collaborateurs [1985] chez *col-1* et *col-2* sont soulignées

Bien que la fonction de ces 10 nucléotides n'aie pas encore été établie [Cox *et al.*, 1989], ils jouent probablement un rôle important, car il est rare qu'une séquence aussi longue soit conservée dans la partie 3' non-codante. Par conséquent, un test impliquant une ou plusieurs mutations parmi ces 10 bases pourrait être envisagée afin de déterminer si cette séquence joue un rôle dans l'expression ou la régulation de collagène codé.

Les similarités de la séquence et de l'organisation entre les *Ascol-C* et *Bpcol-1* indiquent fortement que ces gènes sont orthologues et suggèrent que *A. suum*, un nématode intestinal du porc, et *B. pahangi*, une filaire lymphatique des félinés transmise par un moustique, ont un ancêtre commun qui possédait un collagène semblable avec 3 introns aux mêmes positions. Ce résultat est en accord total avec le travail de systématique moléculaire du phylum Nematoda de Blaxter et collaborateurs [1998], qui groupe le genre *Brugia* (ordre des Spirurida) et le genre *Ascaris* (ordre des Ascaridida) dans un même clade.

Ce gène semble également être présent chez une autre espèce du genre *Brugia*. Un fragment de 272 bp nommé *Bmcol-3* a été isolé chez *B. malayi* [Gregory *et al.*, 1997]. Cet ADNc partiel, abondamment transcrit chez le troisième stade larvaire, présente une homologie de plus de 99% avec le *Bpcol-1*.

Références

- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. et Struhl K. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. 3 vols. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Bisoffi M. et Betschart B. 1996. Identification and Sequence Comparison of a Cuticular Collagen of *Brugia pahangi*. Parasitol. 113, 145-155
- Blaxter M. L., De Ley P., Gareys J. R., Liu L. X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J. R., Mackey L. Y., Dorris M., Frisse L. M., Vida J. T. et Thomas W. K. 1998. A Molecular Evolutionary Framework for the Phylum Nematoda. Nature. 392, 71-75
- Blaxter M. L., Guiliano D. B., Scott A. L. et Williams S. A. 1997 A Unified Nomenclature for Filarial Genes. Parasitol. Today. 13, 416-417
- Cox G. N. 1992. Molecular and Biochemical Aspects of Nematode Collagens. J. Parasitol. 78, 1-15
- Cox G. N., Fields C., Kramer J. M., Rosenzweig B. et Hirsh D. 1989. Sequence comparisons of Developmentally Regulated Collagen Genes of *Caenorhabditis elegans*. Gene. 76, 331-344
- Cox G. N., Kusch M., DeNevi K. and Edgar R. S. 1981a. Temporal Regulation of Cuticle Synthesis during Development of *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 84, 277-285

- Di Mito C. & Betschart B. 1998. DNA Extraction from *Ascaris suum* Muscle Tissue. *Parasitol. Research.* 84, 595-597
- Fujimoto D. et Kanaya S. 1973. Cuticlin: a Noncollagen Structural Protein from *Ascaris suum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 157, 1-6
- Fujimoto D., Horiuchi K. et Hiramama M. 1981. Isotriptyrosine, a New Cross-Linking Amino Acid Isolated from *Ascaris* Cuticle Collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 99, 637-643
- Gregory W. F., Blaxter M. L. et Maizels R. M. 1997. Differentially Expressed, Abundant *Trans*-Spliced cDNAs from Larval *Brugia malayi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87, 85-95
- Huang X-Y., et Hirsh D. 1989. A Second *Trans*-Spliced RNA Leader Sequence in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 8640-8644
- Johnstone I. L. 1993. The Cuticle of the Nematode *Caenorhabditis elegans*: A Complex Collagen Structure. *BioEssays.* 16, 171-178
- Johnstone I. L., Shafi Y., Majeed A. et Barry J. D. 1996. Cuticular Collagen Genes from the Parasitic Nematode *Ostertagia circumcincta*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80, 103-112
- Josse J. et Harrington W. F. 1964. Role of Pyrrolidine Residues in the Structure and Stabilisation of Collagen. *J. Mol. Biol.* 9, 269-287
- Kingston I. B., Wainwright S. M. et Cooper D. 1989. Comparison of Collagen sequences in *Ascaris suum* and *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37, 137-146
- Kramer J. M. 1994. Structures and Functions of Collagens in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 8, 329-336
- Kramer J. M., Cox G. N. et Hirsh, D. 1985. Expression of the *Caenorhabditis elegans* Collagen Genes col-1 and col-2 Is Developmentally Regulated. *J. Biol. Chem.* 260, 1945-1951
- Kühn K. Chemical properties of collagen. In: *Immunochemistry of the Extracellular Matrix.* vol. 1, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1982
- Marchuk D., Drumm M., Saulino A. et Collins F. S. 1991. Construction of T-Vectors, a Rapid and General System for Direct Cloning of Unmodified PCR Products. *Nucl. Acids Res.* 19, 1154

- Marti S. 1991. Biochemische und immunologische Charakterisierung von Cuticlin, einem Strukturprotein aus der Kutikula von *Ascaris suum*. PhD Thesis, Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland
- Martin S. A. M., Thompson F. J. et Devaney E. 1995. The Construction of Spliced Leader cDNA Libraries from the Filaria Nematode *Brugia pahangi*. Mol. Biochem. Parasitol. 70, 241-245
- Martin S. A. M., Hunter S. J., Thompson F. J. et Devaney E. 1996. Stage Specific Gene Expression in the Post-Infective L3 of the Filarial Nematode, *Brugia pahangi*. Mol. Biochem. Parasitol. 79, 109-112
- Nilsen T. W. 1993. Trans-Splicing of Nematode Premessenger RNA. Annu. Rev. Microbiol. 47, 413-440
- Park Y. S. et Kramer J. M. 1990. Tandemly Duplicated *Caenorhabditis elegans* Collagen Genes Differ in their Modes of Splicing. J. Mol. Biol. 211, 395-406
- Pharmacia Biotech. 1997. GST Gene Fusion System. Third Edition
- Rawn J. D. 1989. Fibrous proteins. In: Biochemistry. Neil Patterson Publisher, Burlington, North Carolina. pp 75-98
- Ray C. et Hussey R. S. 1995. Evidence for Proteolytic Processing of a Cuticle Collagen in a Plant-Parasitic Nematode. Mol. Biochem. Parasitol. 72, 243-246
- Ray C., Wang T. Y. et Hussey R. S. 1996. Identification and Characterisation of the *Meloidogyne incognita coll* Cuticle Collagen Gene. Mol. Biochem. Parasitol. 83, 121-124
- Scott A. L., Yenbutr P., Eisinger S. W., et Raghavan N. 1995. Molecular Cloning of the Cuticular Collagen Gene *Bmcol-2* from *Brugia malayi*. Mol. Biochem. Parasitol. 70, 221-225
- Selkirk M. E., Nielsen L., Kelly C., Partono F., Sayers G. et Maizels R. M. 1989. Identification, Synthesis and Immunogenicity of Cuticular Collagens from the Filarial Nematodes *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. Mol. Biochem. Parasitol. 59, 229-246
- Shamanski L. M., Pratt D., Boisvenue R. J. et Cox G. N. 1989. Cuticle Collagen Genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* are Highly Conserved. Mol. Biochem. Parasitol. 37, 73-86

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science*. 282, 2012-2018

Thompson J. D., Higgins D. G. et Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acid. Res.* 22, 4673-4680

CHAPITRE 5

Discussion générale

Le but général de cette étude était de contribuer à une meilleure compréhension de la composition de la cuticule des nématodes parasites. Les expériences visaient à identifier et à caractériser sur le plan moléculaire les protéines impliquées dans les interactions entre le parasite et son hôte [Bird & Bird, 1991].

Les études portant sur la cuticule ont débuté depuis de nombreuses années déjà. Dans un premier temps elles ont été effectuées essentiellement chez le parasite intestinal *A. lumbricoides* qui, du fait de sa grande taille, était indiqué pour des études de structure. Josse et Harrington [1964] ont mis en évidence la structure collagèneuse de la cuticule. Par la suite, la présence de ponts-disulfures et la formation de molécules de collagène triple-hélicales ont été rapportées [McBride et Harrington, 1967], ainsi que la présence de liaisons impliquant des tyrosines [Fujimoto *et al.*, 1981]. En 1990, Betschart et Wyss, proposent le modèle actuellement admis de trois chaînes polypeptidiques associées en trimères, accolés bout à bout pour former les fibres de collagènes. A ce jour, des gènes codant pour des collagènes de la cuticule ont été isolés et caractérisés chez plusieurs nématodes, libres ou parasites de vertébrés ou de plantes.

La présence dans la cuticule de composants structuraux d'un autre type a été démontrée il y a plus de 50 ans [Campbell, 1942]. A l'époque, l'hypothèse selon laquelle les nématodes produisent de la kératine a été soulevée à tort, mais il faudra attendre jusqu'en 1973 pour que ces protéines soit localisées et qu'un début de caractérisation soit effectué [Fujimoto & Kanaya, 1973]. Pour la première fois, le terme de 'cuticline' est utilisé pour désigner ce nouveau type de protéine. Une analyse biochimique et des mesures par diffraction de rayons-X [Fujimoto & Kanaya, 1973] permettent de situer la cuticline dans la partie corticale externe, l'épicuticule. Actuellement, le terme 'cuticline' est également utilisé pour désigner les protéines constituant la fraction insoluble de la cuticule, dans ce cas on parle 'des cuticlins'. Le caractère insoluble de ces protéines, dû principalement à la formation de liaisons covalentes de type di- et isotryrosines [Fujimoto, 1975; Marti, 1991; Fetterer *et al.*, 1993; Lassandro *et al.*, 1994], a rendu les études difficiles voir impossibles durant des années. Ce n'est qu'en 1991 que le premier gène codant pour une cuticline est isolé chez *C. elegans* [Sebastiano *et al.*, 1991].

La première partie du présent travail visait à comparer les profils protéiques des nématodes *A. suum* et *C. elegans*. Les résultats obtenus chez le parasite du porc diffèrent fortement de ceux obtenus avec le nématode libre (Chapitre 3). *C. elegans*, par son maintien facile *in vitro* reste

cependant un bon modèle des nématodes en général. Les résultats obtenus ici nous rappellent simplement que la cuticule, bien que conservée au sein du phylum, varie fortement dans sa composition et sa structure en fonction du milieu dans lequel vit le ver, et par conséquent d'une espèce à l'autre ou d'un stade à l'autre au sein d'une même espèce. Dans un deuxième temps, une étude complémentaire sur le gène *AsCut* décrit par Bisoffi et collaborateurs [Bisoffi *et al.*, 1996] a été effectuée (Chapitre 3). L'intérêt d'*AsCut* réside dans le fait que, bien que présentant les caractéristiques des cuticlins décrites par Fujimoto et Kanaya [1973], il diffère fortement des gènes *cut-1* et *cut-2* [Sebastiano *et al.*, 1991; Lassandro *et al.*, 1994] décrits chez *C. elegans*. Pour compléter les données sur *AsCut*, une détection du gène par hybridation sur de l'ADN génomique a permis d'établir qu'une seule copie du gène est présente dans le génome de *A. suum* (Chapitre 3). Lors de ces expériences, seuls quelques *A. suum* entiers ont pu être obtenus dans un abattoir local. La majorité du matériel, qui consistait en *Ascaris* adultes dont les organes internes avaient été disséqués, nous a été offert par le Professeur Fritz Müller (Université de Fribourg). L'extraction de l'ADN a, de ce fait, été réalisée à partir des tissus musculaires, et une adaptation des protocoles s'est avérée nécessaire pour purifier efficacement l'ADN des polyphénols (di- et isotriptyrosines) et du glycogène (chapitre 2). Deux étapes d'extraction ont été réalisées:

1. Une extraction standard pour cellules animales (SDS - protéinase K) [Ausubel *et al.*, 1995]
2. Une extraction pour cellules végétales (CTAB - PolyclarAT®) [Lodhi *et al.*, 1994]

Bien que passablement plus longue que l'extraction classique à partir des gonades, cette méthode permet d'obtenir à partir du muscle une quantité d'ADN équivalente à celle obtenue avec les gonades.

En ce qui concerne les collagènes, notre but premier était de contribuer à la mise au point d'un test de diagnostic en identifiant les épitopes d'un collagène de la cuticule de *B. pahangi*. L'isolation par Bisoffi et Betschart [1996] du gène *Bpcol-1* codant pour un collagène de la cuticule de cette filaire était à la base de ce projet.

Le présent travail a permis d'identifier deux nouveaux gènes codant pour des collagènes de la cuticule du parasite intestinal *A. suum*, portant ainsi à 4 le nombre de collagènes identifiés chez ce nématode. Le premier, un gène nommé *Ascol-C*, présente un taux d'homologie élevée (77%) et une localisation des introns identiques à celles du *Bpcol-1* (Chapitre 4). Ce résultat rend une étude sur la spécificité de la réponse contre le *Bpcol-1* désuète. En effet, l'ascaridiase est une parasitose très répandue dans les régions tropicales et subtropicales, mais également dans

d'autres régions du globe. Le nombre de personnes infectées a été estimé à un milliard [WHO, 1984]. Dans les zones endémiques, une forte proportion de la population a été en contact avec le parasite et peut de ce fait présenter des anticorps anti-ascaris. Un test basé sur la protéine codée par le *Bpcol-1* présenterait un risque de réactions croisées élevé, l'utilisation de ce collagène pour le diagnostic est donc à rejeter.

Quelques tests immunologiques ont tout de même été réalisés dans le cadre de cette étude. Le gène *Bpcol-1*, amplifié par PCR à partir du clone 19.1 de Marco Bisoffi, a été inséré dans le plasmide pGEX [Pharmacia Biotech, 1997] afin d'exprimer la protéine de fusion GST-*Bpcol-1* (29 + 21.5 kDa). Dans un premier temps, deux souris Balb C ont été immunisées avec la protéine obtenue suite à une séparation par SDS-PAGE et une purification par électroélution. Les sera obtenus, testés par immunoblot, n'ont montré qu'une très faible réaction envers la protéine de fusion. Les expériences d'immunisation devraient être répétées avec une quantité de protéine de fusion plus importante afin d'établir si la réaction est réellement positive. Un deuxième test a été effectué afin de confirmer la nature immunogène du collagène *Bpcol-1*. Un serum de lapin immunisé avec un extrait total de collagènes de la cuticule de *B. pahangi* a montré une forte réaction contre la protéine de fusion GST-*Bpcol-1* et aucune réaction contre des collagènes de vertébrés, mettant ainsi en évidence la spécificité de la réaction immunitaire engendrée par les collagènes cuticulaires.

Le second gène (*Ascol-D*) codant pour un collagène de la cuticule a été isolé lors des premières expériences visant à tester la présence d'un gène identique au *Bpcol-1* chez *A. suum* grâce à une sonde de 20 nucléotides reconnaissant pour une portion du *Bpcol-1*, sise dans la première région hélicale. Ce gène, malgré son organisation hélicale non-continue et la présence de cystéines dans les zones non-collagènes typiques des collagènes de la cuticule, présente un taux d'homologie faible avec les collagènes de nématodes connus, exception faite du gène *col-14* de *C. elegans* (54 % d'homologie). Les collagènes décrits jusqu'ici peuvent être regroupés en classes, basées sur les motifs conservés de cystéines [Johnstone, 1993]. Dans la classe B, qui comprend entre autres les gènes *UCOLI* et *Ascol-C* (*A. suum*) ainsi que les gènes *Bmcol-2* et *Bpcol-1* (*Brugia* sp.), les deux cystéines qui précèdent la deuxième zone (Gly-X-Y)_n sont séparées par deux acides aminés. Dans les cas de *Ascol-D* et *col-14*, bien qu'ils présentent toutes les caractéristiques de cette classe, les deux cystéines sont séparées uniquement par un acide aminé. Nous avons donc proposé une sous-classe B.1 supplémentaire regroupant les deux gènes.

Perspectives

La cuticule est une structure complexe, constituée de protéines présentant de fortes interactions entre elles. Cette matrice extracellulaire est le siège de nombreux échanges entre le ver et son environnement et joue donc un rôle important lors de l'infection d'un hôte par un nématode parasite [Bird & Bird, 1991]. Les données sur le nématode libre *C. elegans* sont nombreuses, y compris concernant la cuticule [Wood, 1988; Cox, 1992], mais à ce jour, peu d'informations sont disponibles sur les espèces parasites. *C. elegans*, dont le génome a été entièrement séquencé [The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998], est un modèle qui permet une première approche lors d'études sur les nématodes, en particulier sur la structure et les fonctions de la cuticule. D'autre part, *Ascaris*, en raison de sa grande taille, est lui aussi un modèle potentiel pour l'étude de la cuticule. Cependant, bien que cette matrice extracellulaire soit caractéristique de tous les nématodes, il faut toujours garder à l'esprit que des différences importantes ont été décrites en fonction du stade et de l'espèce étudiée. Par conséquent des études portant sur la cuticule des différentes espèces parasites sont encore nécessaires afin de décrypter les mécanismes qui permettent au ver d'infecter puis de se maintenir dans son hôte.

En ce qui concerne les collagènes, la présence du gène orthologue (*Ascol-C*) de *Bpcol-1* chez *A. suum* est en accord avec l'essai de systématique moléculaire du Phylum Nematoda effectuée par Blaxter et collaborateurs [Blaxter *et al.*, 1998] qui groupe les Ascaridida et les Spirurida dans un même clade. Cependant, l'intestin et le système lymphatique étant des milieux très différents, des variations importantes dans la composition et la structure de la cuticule d'*Ascaris* et de *Brugia* peuvent raisonnablement être envisagées. La présence de deux gènes orthologues chez *B. pahangi* et *A. suum* remet en question l'utilisation du collagène *Bpcol-1* pour un test diagnostique. En effet le risque de réaction croisées lors d'infections due à *Ascaris* est élevé. Néanmoins, sur le plan scientifique, il serait intéressant de déterminer et de comparés les épitopes des protéines codées par les deux gènes: *Bpcol-1* et *Ascol-C*.

Une approche plus ciblée des gènes codant pour des protéines uniquement présentes chez les filaires *B. pahangi* et *B. malayi* pour établir un test de diagnostic peut être entreprise. Dans ce but, un double screening d'une banque d'ADNc de *Brugia* pourrait être réalisé après expression des protéines directement sur la culture de phages:

1. à l'aide d'un sérum de patient infecté par *Ascaris*
2. à l'aide d'un sérum de patient infecté par *Brugia*.

Les clones négatifs pour *Ascaris* et positifs pour *Brugia* mériteraient une étude approfondie, qu'ils codent ou non pour des collagènes. Pour une étude portant sur les collagènes, une expérience analogue peut être effectuée avec des sera de souris immunisées avec des extraits totaux de collagènes cuticulaires (1) d'*Ascaris* et (2) de *Brugia*.

Les gènes codant pour les collagènes de la cuticule de *C. elegans* forment une famille de 170 gènes répartis dans le génome. Quelques couples de gènes, comme *col-12* et *col-13* de *C. elegans* [Park & Kramer, 1990], sont toutefois présents en tandem. Le même phénomène a également été décrit pour les gènes *colost-1* et *colost-2* du nématode parasite du mouton *Ostertagia circumcincta* [Johnstone *et al.*, 1996]. Dans le cadre de ce travail, un clone présentant un taux d'homologie de 99.5% avec le gène *Ascol-C* a été isolé. La présence d'une deuxième copie du gène *Ascol-C* reste cependant une hypothèse à vérifier. Une première étape simple consiste à hybrider de l'ADN génomique d'*A. suum* digéré par différentes endonucléases avec une sonde reconnaissant le gène *Ascol-C*. Si la présence d'un deuxième gène devait être confirmée, un travail visant à isoler l'allèle d'*Ascol-C* pourrait être effectuée. Deux options seraient envisageables:

1. Isolation de l'ADNc complet dans une banque produite après une RT-PCR visant à obtenir les ARNm complets (par exemple Smart™, PCR cDNA Synthesis Kit, Clontech)
2. Isolation des deux allèles dans une banque d'ADNg et caractérisation des 'flanking-regions' en 5' et en 3'. Dans le cas où les deux gènes seraient en tandem: un séquençage par GPS™ I System (New England BioLabs® Inc.) ou primer-walking et une caractérisation de la région les séparant.

Le deuxième gène de collagène (*Ascol-D*) est incomplet. L'utilisation d'une banque produite de façon à avoir les ADNc complets (par exemple Smart™, PCR cDNA Synthesis Kit, Clontech) permettrait de compléter la séquence N-terminale manquante et par là d'obtenir des informations sur le mode d'épissage que subit l'*Ascol-D*. En effet, lors d'essais visant à obtenir le gène sur des ARN messagers totaux obtenus à partir de l'hypoderme d'*Ascaris* adultes le gène n'a jamais pu être amplifié. Pour cette expérience une amorce reconnaissant le spliced leader SL1 a été utilisée. Le résultat négatif pourrait être dû à un autre mode de splicing utilisé pour le gène *Ascol-D*.

Une étude recherchant la présence de ce gène chez d'autres espèces de nématodes pourrait également être envisagée, par exemple par screening de banques d'ADNc à l'aide d'une sonde reconnaissant le gène en question.

Actuellement les données sur la cuticule ne permettent pas encore de cerner entièrement les mécanismes de régulations des gènes, de sécrétion et d'assemblage des protéines, ainsi que les différenciations cellulaires impliquées dans la formation de cette matrice extracellulaire. Bien que fondamentales, ces différentes études à long terme trouvent également un écho sur le plan médical. En effet, les médicaments utilisés actuellement, comme dans le cas d'autres parasites, ont une efficacité limitée en raison de l'adaptation rapide des parasites à leur environnement qui leur permet de développer des résistances. Une meilleure compréhension de la formation et de la structure de la cuticule permettrait d'envisager une nouvelle palette de moyens de lutte contre les nématodes parasites. Les molécules formant la cuticule ainsi que les mécanismes impliqués dans leur synthèse pourraient être de nouvelles cibles pour un contrôle thérapeutique chez l'Homme, le bétail et les plantes [Fetterer & Rhoads, 1993; Pritchard et al., 1988].

Références

- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. et Struhl K. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. 3 vols. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Betschart B. et Wyss K. 1990. Analysis of the Cuticular Collagens of *Ascaris suum*. Acta Trop. 47, 297-305
- Bird A. F. et Bird J. 1991. In: The Structure of Nematodes, pp 44-77. Academic Press, San Diego
- Bisoffi M. et Betschart B. 1996. Identification and Sequence comparison of a Cuticular Collagen of *Brugia pahangi*. Parasitol. 113, 145-155
- Bisoffi M., Marti S. et Betschart B. 1996. Repetitive Peptide Motifs in the Cuticlin of *Ascaris suum*. Mol. Biochem. Parasitol. 80, 55-64
- Blaxter M. L., De Ley P., Gareys J. R., Liu L. X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J. R., Mackey L. Y., Dorris M., Frisse L. M., Vida J. T. et Thomas W. K. 1998. A Molecular Evolutionary Framework for the Phylum Nematoda. Nature. 392, 71-75
- Campbell D. H. 1942. Experimental Eosiniphilia with Keratin from *Ascaris suum* and other sources. J. Infectious Diseases. 71, 270-276
- Cox G. N. 1992. Molecular and Biochemical Aspects of Nematodes Collagens. J. Parasitol. 78, 1-15

- Fetterer R. H. et Rhoads M. L. 1993. Biochemistry of the Nematode Cuticle: Relevance to Parasitic Nematodes of Livestock. *Vet. Parasitol.* 46, 103-111
- Fetterer R. H., Rhoads M. L. et Urban Jr. J. F. 1993. Synthesis of Tyrosine-Derived Cross-Links in *Ascaris suum* Cuticular proteins. *J. Parasite.* 79, 160-166
- Fujimoto D. 1975. Occurrence of Dityrosyne in Cuticlin, a Structural Protein from *Ascaris* Cuticle. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 51B, 205-207
- Fujimoto D. et Kanaya S. 1973. Cuticlin: a Noncollagen Structural Protein from *Ascaris suum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 157, 1-6
- Fujimoto D., Horiuchi K. et Hiramama M. 1981. Isotritirosine, a New Cross-Linking Amino Acid Isolated from *Ascaris* Cuticle Collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 99, 637-643
- Johnstone I. L., Shafi Y., Majeed A. et Barry J. D. 1996. Cuticular Collagen Genes from the Parasitic Nematode *Ostertagia circumcincta*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80, 103-112
- Josse J. et Harrington W. F. 1964. Role of Pyrrolidine Residues in the Structure and Stabilisation of Collagen. *J. Mol. Biol.* 9, 269-287
- Lassandro F., Sebastiano M., Zei F. et Bazzicalupo P. 1994. The Role of Dityrosine Formation in the Crosslinking of CUT-2, the Product of a Second Cuticlin Gene of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 147-159
- Lodhi M. A., Ye G-N, Weedwn N. F. et Reisch B. I. 1994. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 12, 6-13
- Marti S. 1991. Biochemische und immunologische Charakterisierung von Cuticlin, einem Strukturprotein aus der Kutikula von *Ascaris suum*. PhD thesis, Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland
- McBride O. W. et Harrington W. F. 1967. *Ascaris* Cuticle Collagen: On the Disulfide Cross-Linkages and Molecular Properties of the Subunits. *Biochemistry.* 6, 1484-1498
- Park Y. S. et Kramer J. M. 1990. Tandemly Duplicated *Caenorhabditis elegans* Collagen Genes Differ in their Modes of Splicing. *J. Mol. Biol.* 211, 395-406
- Pharmacia Biotech. 1997. GST Gene Fusion System. Third Edition

- Pritchard D. I., McKean P. G. et Rogan M. T. 1988. Cuticular Collagens - a Concealed Target for Immune Attack in Hookworms. *Parasitol. Today*. 4 (9), 239-241
- Sebastiano M., Lassandro F. et Bazzicalupo P. 1991. *Cut-1* a *Caenorhabditis elegans* Gene Coding for a Dauer-Specific Noncollagenous Component of the Cuticle. *Dev. Biol.* 146, 001-0012
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science*. 282, 2012-2018
- WHO. Intestinal Parasitic Infections and how best to Prevent them. In: World Health, WHO. March 1984. pp16-17
- Wood W. B. 1988. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

CHAPITRE 6

Remerciements

Je tiens à remercier ici toutes celles et ceux qui d'une façon ou d'une autre se sont trouvés impliqués dans ce travail.

Je remercie le Professeur Bruno Betschart, directeur de thèse, de m'avoir donné la possibilité de faire un travail de recherche sur les nématodes dans son laboratoire. Il a investi beaucoup d'énergie dans l'achèvement de cette thèse.

J'exprime ma gratitude aux autres membres du jury:

à Jean-Marc Neuhaus (Département de Biochimie, Institut de Botanique, Université de Neuchâtel, Suisse)

à Fritz Mueller (Université de Fribourg, Suisse)

à Paulo Bazzicaluppo (Université de Naples, Italie)

pour avoir accepté de corriger le mémoire et de juger ce travail

Je suis reconnaissante au Professeur Peter-Alan Diehl de m'avoir permis de partager avec lui et ses collègues l'expérience de l'enseignement universitaire en m'engageant comme assistante.

Je remercie le groupe du Professeur Fritz Mueller à Fribourg de ses conseils concernant la culture de *C. elegans*.

Je remercie vivement Véronique Douet, Albert Spielmann, Yves Balmer et Peter Schürmann de leur disponibilité et de leurs conseils, ainsi que tout le laboratoire de biochimie du Professeur Jean-Marc Neuhaus, à Neuchâtel.

Merci à tous les collègues du groupe de Parasitologie,

et surtout à Barbara Riegler, Frédéric Ganapamo et Roger Bellet-Edimo pour leur amical soutien.

Un grand merci à Yves Cheminade.

Un merci très spécial à Marc Zehnder et Eric Grueter.

Une pensée amicale pour Pierre Eoné et Yvan Lorimier.

Ce projet (n° 31-47194.96) a été soutenu par le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique.

ANNEXES

SHORT COMMUNICATION

Carmela Di Mito · Bruno Betschart

DNA extraction from *Ascaris suum* muscle tissue

Received: 16 October 1997 / Accepted: 15 January 1998

Abstract A new method for the extraction of DNA from *Ascaris suum* muscle has been developed. It combines a standard SDS-based extraction with a plant DNA extraction procedure. The use of SDS and proteinase K allows the elimination of proteins, while CTAB and polyclar AT eliminate glycogen and polyphenols. The DNA thus obtained can easily be digested by endonucleases and amplified by PCR.

Due to improved breeding conditions in many industrialised countries, pigs are now less infected by *A. suum*. This drastically limits the availability of *Ascaris*. DNA for molecular studies is usually isolated from visceral tissues like gonads and intestine, whereas muscle and hypodermis are normally not used. Muscle tissues are relatively rich in glycogen and poor in DNA, whereas polyphenols are found in the cuticle to which the hypodermis is attached. DNA extraction has been difficult in some plant species such as grapevine (Lodhi et al. 1994), due to the presence of contaminants such as polyphenols and polysaccharides. Such DNA is not susceptible to digestion with endonucleases and cannot be used for PCR amplification. These problems were solved using acetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-based extraction and a Polyclar AT (water-insoluble polyvinylpyrrolidone) purification (Lodhi et al. 1994). We used this technique and combined it with classical extraction procedures (Ausubel et al. 1995) to obtain reasonably pure DNA from *Ascaris* muscles and hypodermis.

The gonads and gut were removed from two adult *A. suum*, and the remains of the body were cut into pieces of 5 cm. The cuticle was eliminated as described by Betschart et al. (1990). Muscle and hypodermis were placed in a 50 ml tube and 10 ml of SDS-extraction buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS) and 10 µl of proteinase K (Boehringer; 0.5 mg/ml) were added. The sample was incubated at 55 °C for 18 h, inverting the tube three or four times during the first 2 h. Then, 10 ml of phenol was added and mixed by inverting the tube gently for 10 min. After centrifugation at 3500 g for 15 min, the aqueous phase containing the DNA was extracted a second time with 10 ml of phenol:chloroform:isoamyl-alcohol (49.5:49.5:1). The white aqueous phase was transferred into a new tube and an equal volume of cold (–20 °C) 100% ethanol was added. The DNA was precipitated for 20 min at –80 °C, and spun at 3500 g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet washed with cold 70% ethanol. The ethanol was removed and the pellet resuspended in 5 ml of TE buffer (10 mM Tris-Cl pH8, 1 mM EDTA pH 8). Then 15 ml of prewarmed (60 °C) CTAB-extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-Cl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1.4 mM NaCl, 0.2% of β-mercaptoethanol) and 50 mg of Polyclar AT (Serva, Heidelberg Germany) was added. After incubation for 30 min at 60 °C, cooling at room temperature and extraction with chloroform (v/v), the sample was spun for 5 min at 3500 g, the pellet was resuspended with 5 ml TE buffer and a second CTAB extraction was performed. TE buffer was added (about 30 ml), and a ultracentrifugation at 90 000 g for 1 h was carried out in order to sediment glycogen. The supernatant was transferred into a new tube and 2 vol cold (–20 °C) 100% ethanol were added. The DNA was precipitated for 20 min at –80 °C, the pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in 300 µl TE buffer. The sample was then treated with RNase (Boehringer, Mannheim Germany) for 30 min at room temperature and the DNA was quantified in a spectrophotometer. DNA was stored at –70 °C.

C. Di Mito · B. Betschart (✉)
Parasitologie, Institut de zoologie, Université de Neuchâtel,
CH-2007 Neuchâtel, Switzerland
Fax: +41-32-7183 001; e-mail: bruno.betschart@zool.unine.ch

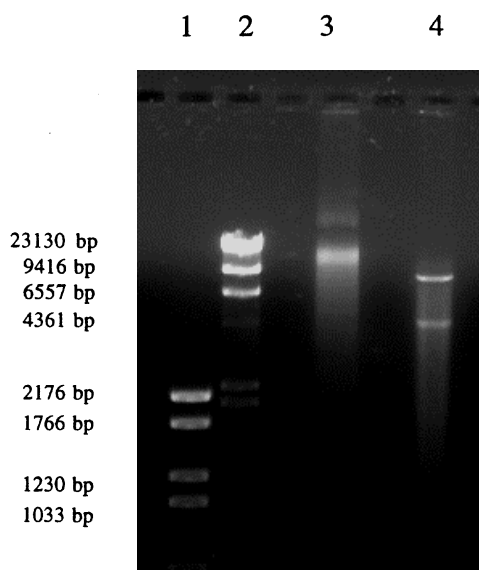


Fig. 1 *EcoRI* digestion of *Ascaris suum* DNA from muscle lanes 1, 2 markers (Boehringer: markers VI and II), lane 3 DNA from muscle, lane 4 DNA from muscle digested with *EcoRI*. Approximately 1 µg DNA was used in each case. Samples were separated by electrophoresis (1% agarose, 0.5 × TBE) and stained with ethidium bromide

DNA extracted from muscle tissue was compared to DNA isolated from gonads. The yield of DNA per worm was ~406 µg for muscle tissue and ~600 µg for gonads. DNA from muscle showed a strong band around 20 000 bp. DNA digested with *EcoRI* separated into two fragments of approximately 9000 and 6000 bp, indicating the absence of blocking substances (Fig. 1). The quality of DNA isolated from muscle tissues was compared with that isolated from gonads by PCR amplification using random primers (Fig. 2). The amplification products after electrophoresis on agarose could

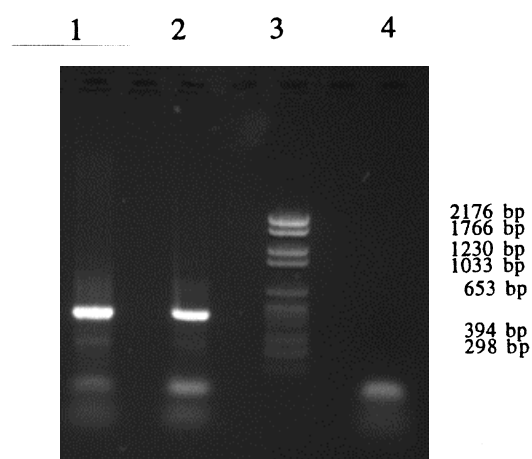


Fig. 2 PCR amplification of DNA from *A. suum*. DNA from gonads (lane 1) and muscle (lane 2) amplified with the following 23- and 21-base nucleotides: 5'-CAGTAGTCATATGCTTGTCTCAG-3'; 5'-TCCTTTAAGTTTCAGCTTTGC-3'. Lane 3 DNA marker (Boehringer: marker VI). Lane 4 negative control. Approximately 1 µg DNA was amplified in each case. Samples were separated by electrophoresis (0.8% agarose, 0.5 × TBE) and stained with ethidium bromide

not be distinguished and showed an identical quantity and quality.

Acknowledgements This work was supported by the Swiss National Science Foundation (project number 31-47194.96). We acknowledge fruitful discussions with Marc Zehnder.

References

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1995) Current protocols in molecular biology. Wiley, New York
- Lodhi MA, Ye G-N, Weedwn NF, Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol Biol Rep 12: 6-13
- Betschart B, Marti S, Glaser M (1990) Antibodies against the cuticlin of *Ascaris suum* cross-react with epicuticular structures of filarial parasites. Acta Trop 47: 331-338

Identification of Two Collagen Genes from the Cuticle of *Ascaris suum*

Carmela Di Mito and Bruno Betschart*

University of Neuchâtel, Institute of Zoology, Department of Parasitology, 2007 Neuchâtel, CH

Submitted 9 december 1999, to Molecular and Biochemical Parasitology

Abstract

The nematodes cuticle is a specialised extracellular matrix acting as an exoskeleton and a protective barrier between the animal and its environment; in parasitic species, it plays an important role in the establishment of the parasite in its host. The cuticle is composed to 80% of small collagen-like proteins only found in nematodes. Most of data concern the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, and there are few data on parasitic species. Nevertheless, all species studied so far, although presenting rather different life cycles, have cuticular collagens encoded by a multigene family. The proteins have a similar organisation, including non-collagen and collagen regions. They may be grouped in classes, according to their cysteine organisation. The complete sequencing of the genome of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* revealed the presence of 170 different genes. A similar family seems to be present in the intestinal round worm *Ascaris suum*, but only 2 genes have so far been described. We have isolated 2 new collagen genes of *A. suum* showing the typical structure of cuticular collagen genes. One of them is orthologous to the *Bpcol-1* gene, a cuticular collagen of the filarial nematode *Brugia pahangi*. The other has a cysteine organisation only found so far in *col-14* of *C. elegans*.

Keywords: cuticular collagen genes; *A. suum*; *B. pahangi*; *C. elegans*; nematode

1. Introduction

The cuticle is essential in the life span of nematodes. This extracellular multilayer proteinaceous structure acts as a rigid exoskeleton, defining the shape of the worm and providing a counteracting structure to the muscle movement [1]. It forms a protective barrier against unfavourable environmental conditions. In free-living species, the cuticle prevents the invasion of bacteria and fungi, and provides resistance to desiccation. Parasitic species, in addition to the barrier effect of the cuticle against environmental condition, are often well protected against the immunological response of their host due to

the molecular characteristics of this host-parasite interface [2].

Josse & Harrington [3] showed that the largest part of the cuticle of nematodes consists of collagens. Like the collagens found in vertebrates, those found in the cuticle of nematodes are defined by a (Gly-X-Y)_n sequence, where X and Y may be any amino acid, but are often proline or hydroxyproline [4]. The gene products are small nematode-specific proteins (~ 30 kDa), and consist of 3 to 5 blocks of collagenous regions,

interrupted by non-(Gly-X-Y)_n cysteine-rich regions. Due to the presence of di- and/or isotri-tyrosines [5] and cysteine-cysteine disulphide links, cuticular collagens are highly cross-linked [6; 7]. Most of the data describing these nematode specific proteins concern studies on *Caenorhabditis elegans*. Cuticular collagens of this free-living nematode form a multigene family of 170 genes [8]. Although exceptions exist [9; 10],

Abbreviations: aa, amino acid; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; SL1, 22-nt spliced leader sequence

* Corresponding author. Tel.: +41-32-7183045; fax: +41-32-7183001; e-mail: bruno.betschart@zool.unine.ch

* *Note:* Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL data base and are available under the accession numbers: AJ243805, AJ249372, AJ249373 and AJ249374.

they are dispersed in the genome [11]. They can be grouped into classes, which are defined by the precise organisation of collagen blocks and the localisation of cysteine residues [6; 12]. Data on parasitic species have shown that the formation and structure of the cuticle are highly conserved within the phylum. Intestinal parasites (*Haemonchus contortus*, *Ascaris suum*, *Ostertagia circumcincta*) [10; 13; 14], lymphatic filariae (*Brugia malayi*, *B. pahangi*) [15; 16] and also plant parasites (*Meloidogyne incognita*) [17], possess collagens similar to some described in the free-living *C. elegans*.

In parasitic nematodes, the cuticle represents the host-parasite interface and is essential for a successful implantation of the worm in its host. As the cuticle of the free-living nematode *C. elegans* has already been the subject of many studies, but data on parasitic species are few, we investigated the presence of cuticular collagen genes in *A. suum*, a nematode parasitic in the small intestine of swine. Despite developmental similarities, *A. suum*, *C. elegans* and *B. pahangi*, the filarial parasite of Malaysian felidae, are taxonomically distinct and belong to three different orders [18; 19]. We have identified two new genes in *A. suum*. One is highly homologous with the *Bpcol-1* gene of *Brugia pahangi* [16] and the other one, according to its incomplete amino acid sequence and cysteine organisation, is closer to the *col-14* of *C. elegans* [20], with nevertheless some differences in its organisation.

2. Materials and methods

2.1 Parasitic material

A. suum was obtained from a local slaughterhouse and stored at -20°C . *B. pahangi* worms were stored at -20°C after recovery from the peritoneal cavity of jird, previously infected with 3rd-stage larvae (received from Dr. E. Devaney, Department of Veterinary Parasitology, University of Glasgow, UK).

The cDNA library was made of mRNA isolated from the hypodermis of adult *A. suum* and cloned into the bacteriophage λ ZapII. This library was a kind gift of Dr. T. Geary and Dr. R. Klein (The Upjohn Company Kalamazoo, USA).

2.2 Genomic DNA isolation and PCR amplification

A. suum DNA was prepared from muscle tissues by an overnight SDS based digestion with proteinase K (1 mg/ml), followed by a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) based extraction [21]. *B. pahangi* DNA was extracted from whole worms by overnight digestion with proteinase K in the presence of 2-mercaptoethanol, SDS and EDTA [22].

Genomic DNAs were amplified by PCR, using sequence-specific primers, with the following cycling conditions: 94°C x 2min, 30 times: 94°C x 30 sec, T_{a} x 30 sec, 72°C x 1 min, and 72°C x 5 min. *A. suum* gDNA was amplified using the AsRMET and Bp3' primers. *B. pahangi* gDNA was amplified with the Bptot5' and Bp3' primers. Primer sequences and annealing temperatures (T_{a}) are listed in Table 1 and primer localisations appear in Fig. 1.

2.3 cDNA selection by PCR

cDNA libraries of adult *A. suum* and adult *B. pahangi* were amplified using the Taq DNA polymerase (QIAGEN) according to manufacturer's recommendations. They were used at a concentration of 0.1 mM. Bp3'

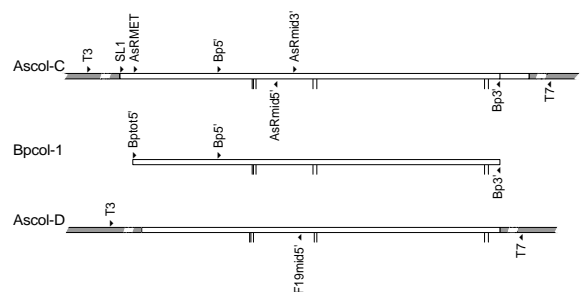


Fig. 1. Schematic map of primers used in polymerase chain reactions. Vertical lines indicate conserved cysteines. Vector regions are shaded. For a detailed description of the primers, see Table 1.

and Bp5' primers corresponded to the 3' and 5'-ends of the region of the collagen gene of *B. pahangi* *Bpcol-1* [16]. The T3 and T7 primers recognised the T3 and T7 promoter regions of the M13 vector. Cycling conditions included an initial denaturation step of 94°C x 2 min, a 30 round cycling step of 94°C x 30 s; Ta°C x 30 s; 72°C x 1 min, and a final extension step of 72°C x 5 min (Table 1, Fig. 1).

2.4 cDNA library screening

λ ZapII phages grown in XL1-Blue *E. coli* strain, were lifted on positively charged nylon membranes, according to standard protocols [23]. A 20-nt biotinylated DNA probe, 5'-CCACCAGGACCA CAAGG-3', recognising a collagen region and a chemiluminescent (Biotin-Streptavidin) kit (Tropix) were used for screening. Hybridisation was carried out at 51°C. Washes were performed exactly as recommended in the kit protocol (2X5 min in 2X SSC, 1% SDS; 2X 15 min in 1X SSC, 1% SDS; 2X5 min in 1X SSC). The selected cDNA was amplified by PCR using primers localised on the λ ZAP II vector: the T3 and T7 primers (Table 1).

2.5 Subcloning and DNA sequencing

cDNA inserts selected by PCR and PCR products from cDNAs selected by hybridisation were subcloned into Bluescript plasmide SK- using the "plasmide + T" method [24]. DNA was sequenced with a LICOR 4000 automatic sequencer (MWG), using the Thermosequenase (Amersham), and M13 reverse or universal (20-nt) and sequence-specific dye primers (IRD 800). gDNA PCR products were directly sequenced with the appropriate primers. Sequence analysis and comparison were performed with DNA Strider™ 1.0.1, programme for DNA and protein sequences analysis, and Clustal W programme [25].

2.6 RNA extraction, cDNA synthesis and sequencing

No live *A. suum* were available at the time, therefore worms stored at -20°C were used for RNA extraction. Internal organs were promptly removed and the hypodermis was exposed to a TRIzol® extraction procedure according to manufacturer's instructions (GIBCO BRL, Life Technologies). Approximately 2µg of total RNA were used as template for the synthesis of the first strand cDNA. RT-PCR was performed at 42°C as described by Martin and co-workers [26], using reverse transcriptase and an oligo-dT primer. The second strand was amplified by performing a classic PCR (94°C 2 min; 35 times: 94°C 30 sec, Ta°C 30 sec, 72°C 1 min; 72°C 5 min) using the 22-nt spliced

Table 1. A. Primers used in PCR and RT-PCR; italics indicate restriction sites which were added to primer sequences to aid subsequent manipulations. B. Annealing temperatures (Ta) of primer pairs used in PCR amplifications.

A.		B.				
Primers 5'-3'		5' \ 3'	Bp3'	T7	F19mid5'	AsRmid5'
AsRMET: -ATGGCTGAAGACGATCCAAAGG-		SL1	--	50°C	66°C	63°C
AsRmid3': -TGTGCAGCATGAGGTTCTCTGG-		T3	50°C	--	60°C	--
AsRmid5': -GTTGGGAATTCATGTTCTCAGAG-		Bp5'	60°C	50°C	--	--
BP5': -GGATCCACCAAACCTCGAATCACGCGTTCA-		AsRMET	60°C	--	--	--
BP3': -GAATTCCTTAATAGCCTGGAGCTGTTCTGGG-		AsRmid3'	--	55°C	--	--
Bptot5': -ATGGTTGATTCTGATGATCCA-		Bptot5'	53°C	--	--	--
F19mid5': -ACAGGGAATTCGTGGTGGTACGGG-						
SL1: -GCCGGAATTCGGTTAATTACCCAAGTTTGAG-						

leader sequence SL1 as 5'-end primer and a sequence-specific nucleotide as 3'-end primer. Primer sequences and annealing temperatures (Ta) are listed in Table 1 and primer localisations appear in Fig. 1. The cDNAs we obtained were cloned into the Bluescript plasmid SK- and sequenced with M13 forward and reverse primers.

3. Results and discussion

3.1 Isolation and sequence analysis of *Ascaris suum* collagen genes

To this date, only two incomplete collagen genes from the cuticle of *A. suum* have been sequenced [14]; the *UCOL1* gene encoding almost the entire collagen and *COLA4* encoding mainly the 3' end. The deduced collagen polypeptides of these two genes were similar to those described in *C. elegans* [4].

Using PCR or hybridisation screening, two new collagen genes were obtained from a λ ZapII cDNA library of adult *A. suum*.

The first gene was isolated by PCR, using a primer corresponding to one end of the coding region of the *Bpcol-1* of *B. pahangi* (Bp5' or Bp3') and another primer recognising a region on the phage's arm (T7 or T3) (Table 1). After subcloning of the PCR products into Bluescript plasmid SK- a 1093 bp fragment, comprising an open reading frame of 855 bp along with a stop codon and a potential polyadenylation sequence (EMBL accession number: AJ243805), was sequenced with the standard M13 universal and reverse primers. No in-frame initiator methionine was detected. A selective RT-PCR was performed on total RNA extracts from the hypodermis of adult *A. suum* in order to identify the 5'-end of mRNA. A missing 5'-end of 33 bp was found by RT-PCR using the SL1 spliced leader sequence as 5'-end primer and the AsRmid5' as 3'-end primer (Table 1). The 33 additional bases included the nematode 22-nt spliced leader sequence (SL-1) [27] and 9 bp coding for the beginning of the gene, including the initiator methionine. This new gene was named *Ascol-C* (*Ascaris suum* collagen C),

following the recommendations of the 'WHO-sponsored *Brugia* EST project' [28]. The alphabetic listing was made in following the nomenclature already used for *A. suum* genes: *NEMCOLA* (=COLA4) and *NEMCOLB* (=UCOL1) [14]. BLAST analyses showed that *Ascol-C* corresponds to the incomplete sequence *col-6* of *A. suum* (Ruiz & Kazacos, accession number: AF035410).

In order to obtain the complete sequence of genomic *Ascol-C* and *Bpcol-1*, we also amplified gDNA from muscle tissue of *A. suum* adults with AsRMET and Bp3', and gDNA from *B. pahangi* adults (mixed sexes) with the Bptot5' and Bp3' primers. The PCR products, 1541 and 1222 bp respectively long (EMBL accession numbers: AJ249372 and AJ249374), were directly sequenced with AsRMET or Bptot5' and Bp3' dye primers. *Ascol-C* and *Bpcol-1* both presented three introns.

The second collagen gene was identified using non-radioactive hybridisation techniques. The 20-nt probe, based on *Bpcol-1* and *Bmcol-2* sequences, was labelled with biotin and recognised a sequence encoding a (Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly) collagen stretch. The selected incomplete cDNA of 1204 bp, comprising a coding sequence along with a stop codon, encoded a cuticular collagen gene of 280 amino acids. A potential polyadenylation signal was present in the 3' flanking sequence (EMBL accession number AJ249373). This gene was named *Ascol-D* (*Ascaris suum* collagen D). In order to obtain the missing 5'-end, RT-PCR was performed using SL1 and the internal F19mid5' primers. It was not possible to get the sequence due either to the quality of the RNA or to the fact that the *Ascol-D* gene is not trans-spliced or to a possibly poor expression of this gene in the adult stage.

3.2 Structure of the *Ascaris suum* *Ascol-C* and *Ascol-D* and comparison with other nematode collagen genes

The deduced proteins of *Ascol-C* and *Ascol-D* (Fig. 2) presented the interrupted (Gly-X-Y)_n

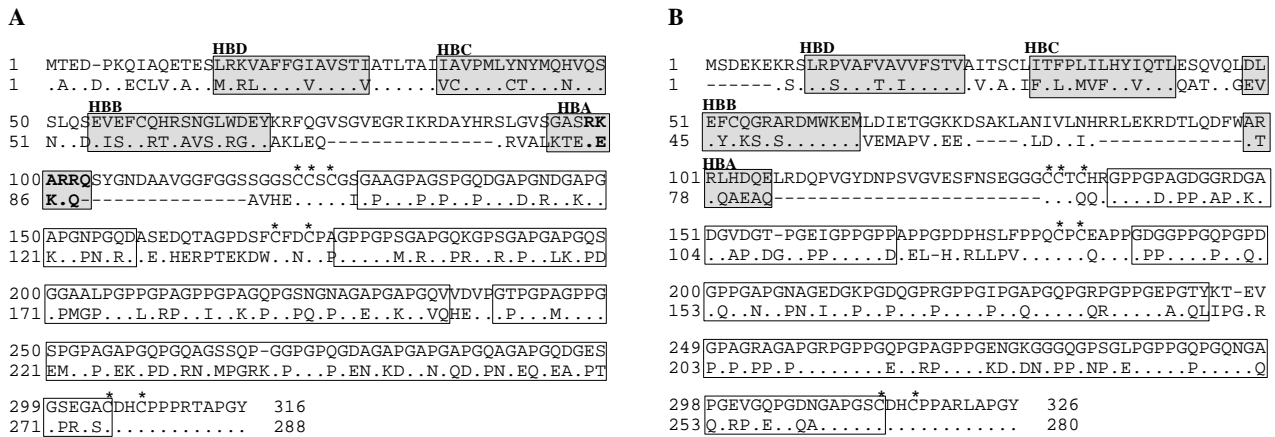


Fig. 2. (A) Comparison of the predicted amino acid sequence of the amino side of *Ascol-C* (bottom line) with *col-12* of *C. elegans* (top line) [9]. (B) Comparison of the predicted amino acid sequence of the *Ascol-D* gene of *A. suum* (bottom line) with the *col-14* gene of *C. elegans* (top line). Dashes indicate deletions and dots conserved positions. The grey boxes indicate homology blocks HB(A-D) [12]. The open boxes indicate the Gly-X-Y regions. Conserved cysteines are indicated with *. The regions with homology to subtilisin-like protease cleavage site are bold [12; 29].

residues of non triple-helical regions I, II and III (Fig. 3) was in good agreement with data of *C. elegans* [22]. To date, all collagens of the cuticle of nematodes, present in the amino terminal region a strong hydrophobic domain, followed by a hydrophilic region, that probably acts as a signal peptide for targeting to the endoplasmic reticulum. Four conserved stretches have also been described in the amino side of the collagen genes of *C. elegans* [12]. These short sequences, called homology blocks HB(A-D), are present in most or all of the cuticular collagens. The 14 amino acids long HBD is hydrophobic and located within the signal peptide. The HBC (13 aa) contains the predicted signal peptidase cleavage site. HBB, which is 16 aa long, presents a tryptophan conserved at 84%. The 11 aa HBA block contains conserved arginines and functions as a subtilisin-like endoprotease cleavage site 'RKARR' [12; 29]. The amino terminal region of *Ascol-C* and *Ascol-D* (Fig. 2) presented strong similarities with the data of *C. elegans*. As already described in *colost-1* and *colost-2* of *O. circumcincta* [10], both *Ascol-C* and *Ascol-D* presented deletions on either part of the HBA block (Fig. 2). The remaining domain of 13 amino acids of *Ascol-C* included the 'REKRQ' cleavage site (Fig.

2A). In *Ascol-D*, three deletions of 4, 13 and 24 aa occurred in this region (Fig. 2B), and the HBA domain, as well of that of the *C. elegans col-14*, did not contain the typical 'RKARR' domain, but a potential 'RQAEAQ' cleavage site.

As described by Johnstone [30], collagen genes of the cuticle are classified in five classes. The predicted protein sequence of *Ascol-C* presented the organisation of cysteines and of triple helical regions typical of the class B collagens. The last nine amino acids of the carboxyl end were also in total agreement with class B collagens [12]. The overall nucleotide homology between *Ascol-C* and *Bpcol-1* coding sequences was 70%, and the overall amino acid homology was 77%. Amino acid sequence similarity searches in NCBI data bases showed that *Ascol-C* presented a lower identity with the couple of genes *colost-1* and *colost-2* of the sheep parasite *O. circumcincta* [10] and *col-12* and *col-13* of *C. elegans* [9]. Although the amino acid sequences were similar, the number of introns differed. *Ascol-C* had three, whereas the above mentioned *O. circumcincta* and *C. elegans* genes had only one. If gaps were introduced into the amino acid sequences in order to maximise the alignment, the regions I, II and III [20] of

REGION I

Ascol-C	A L K T E R E K R Q A V H E C C S C G I G P A G P P
Bpcol-1	A L K K E R Q K R Q A V F Q C C S C G I G P V G P P
Bmcol-2	F G G V T G A P S A P G G G C C G C G V S P P G P P
UCOL1	A G V E G S H S E V P A G G C C G C G V G E P G P P
colost-1	L A A P T R K A R Q S G G G C C G C G V S P A G P P
col-12	D A A V G G F G G S S G G S C C S C G S G A A G P A
col-6	G G Y G A A V N A E P A A V C C T C N Q G A A G P P
Ascol-D	L D V L I H A T R Q A E A Q C C T C Q Q G A P G A P
col-14	P S V G V E S F N S E G G G C C T C H R G P P G P A

REGION II

Ascol-C	G Q D A - - Q E T Q L P T E R D W C F N C P P G P P G P M
Bpcol-1	G Q D A - - Q E T Q L P T E R D W C F N C P A G P P G P R
Bmcol-2	G E D A P - Q E P P T Q P H I E W C F D C P D A P A G P A
UCOL1	G E D A P L A S P P P P E F E W C F E C E Q A Q P G P P
colost-1	G P P A - - - - T P A P D V R P C F N C P P G P P G P A
col-6	G R D A - - - E L V P A P A S E P C I I C P T G A P G P M
col-12	G G D A - - S E D Q T A G P D S F C F D C P A G P P G P S
Ascol-D	G P D A E L - H D R L L P V P P Q C P C Q - - A P P G P P
col-14	G P P A P P G P D P H S L F P P Q C P C E - - A P P G D G

REGION III

Ascol-C	G S C D H C P P P R T A P G Y *
Bpcol-1	G S C D H C P P P R T A P G Y *
Bmcol-2	G S C D H C P P A R T A P G Y *
UCOL1	G S C D H C P P P R T A A G Y *
colost-1	G S C D H C P P P P T A P G Y *
col-6	G D C G H C P P P R T P P G Y *
col-12	G A C D H C P P P R T A P G Y *
Ascol-D	G S C D H C P P A R T A P G Y *
col-14	G S C D H C P P A R L A P G Y *

Fig. 3. Comparison of the amino acid sequences of different collagens, in region I, II and III [20]. The localisation of the three regions is mentioned in Fig. 5. *Ascol-C* and *Ascol-D* are compared with genes of *C. elegans* (*col-6*, *col-14* [20], and *col-12* [9]), *Ostertagia circumcincta* (*colost-1* [10]), *Ascaris suum* (*UCOL1* [14]), *Brugia malayi* (*Bmcol-2* [15]) and *B. pahangi* (*Bpcol-1* [16]). Gaps have been introduced to maximise alignment. Conserved cysteyl residues are boxed, and bold amino acids indicate the beginning or end of triple-helical domains. Black-coloured amino acids indicate positions of *Ascol-C*, outside of the triple helical domains, which are conserved in other genes. Hatched positions indicate *Ascol-D* amino acids which are identical with *col-14* but differ from *Ascol-C*. Asterisks indicate termination codons.

Ascol-C were similar to those of the *UCOL1* gene of *A. suum* [14] and the *Bmcol-2* of *B. malayi* [15] (Fig. 3). *Ascol-C*, *UCOL1*, *Bpcol-1* and *Bmcol-2* shared a common conserved tryptophan immediately before the first conserved cysteine of region II (Fig. 3). Tryptophan is a voluminous amino acid, which is absent from vertebrate collagens [31], and rare in cuticle collagens. Kramer [12] mentioned a conserved tryptophan located in the homology block HBB (Fig. 2), found in most of the collagens from the cuticle of *C. elegans*. *Bpcol-1* and *Ascol-C* did not have it. The sequence from *A. suum*, similar to that of *Ascol-C* (Ruiz and Kazacos, accession number: AF035410) was described as being equivalent to the *col-6* of *C. elegans* and was thus called *col-6* from *A. suum*. The collagen gene described here belongs in fact to the same class of collagens (class B), but has little similarity with the *C. elegans col-6* on the amino acid sequence level, including the organisation of regions I, II and III (Fig. 3). *Ascol-C* contained the SL1 spliced leader sequence and the coding region was 45 bp longer than *col-6*.

The predicted protein of the *Ascol-D* gene presented the typical feature of cuticular collagens of nematodes, and the closest gene was the *col-14* of *C. elegans* [22], with 54% homology for the total amino acid sequence and 61% if deletions on either side of the HBA block are ignored (Fig. 2B). In spite of that, when we performed homology searches in the TREMBL data base, almost all the selected proteins were vertebrate collagens. The number and spacing of cysteines, as well as the amino sequence of the carboxyl end, showed a scheme identical with that of *col-14*. Therefore *Ascol-D* belonged to class B, according to the classification of Johnstone [30]. The two cysteines of the region II of *Ascol-D* were one single aa apart. This cluster of cysteine was to this date only described in *col-14* of *C. elegans* (Fig. 3), we propose therefore to add a B.1 sub-class (Fig. 4).

3.3 Homologies between *Ascol-C* and *Bpcol-1*

BLAST analysis (on the NCBI server) demonstrated a high degree of homology between *Ascol-C* and the incomplete *Bpcol-1* gene, which was isolated from a cDNA library prepared from adult worms of *B. pahangi* [16]. Martin and co-workers [32] isolated a 273 bp fragment which represented 3% of SL1 mRNAs of the post-infective L3. Their clone corresponds to the missing 5'-end of the *Bpcol-1* gene. They showed that the expression of this gene reached a maximum at day 3 post-infection. In the fourth larval stage and adult parasite, the expression was reduced. The same phenomenon was also

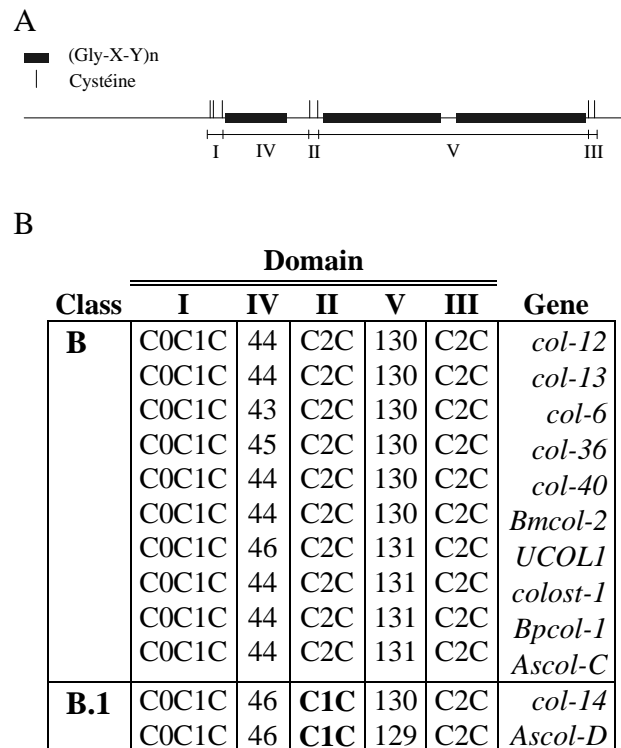


Fig. 4. Comparison of cysteine clusters of *Ascol-C* and *Ascol-D* with other class B collagens. As described by Johnstone [30], domains I, II and III represent the conserved clusters of cysteine residues, where cysteine residues are indicated by C and numerals indicate the number of amino acids between adjacent cysteines; domains IV and V contain collagen region plus additional non-Gly-X-Y sequences. *Col-14* and *Ascol-D* both present a C1C scheme in the domain II. In that way, they differ from the other genes of class B, which justifies grouping them together in sub-class B.1.

described in the *Bmcol-2* gene of *B. malayi* [15]. The *Bpcol-1* total mRNA had one more amino acid (serine) than *Ascol-C*, localised at position 4.

In addition to the percentage of amino acid identity (77%), several striking homologies were evident between *Ascol-C* and *Bpcol-1* (Fig. 5). Both *Ascol-C* and *Bpcol-1* presented eleven cysteines with ten in exactly the same position. The first cysteine of each gene was not conserved. The third position of the cysteine codon may be occupied either by cytosine or uridine. *Ascol-C* showed an extreme preference for cytosine in third position (10/11) whereas *Bpcol-1* presented uridine and cytosine 5 and 6 times in the third position.

Nine of 14 lysines in *Ascol-C* and *Bpcol-1* were identical (Fig. 5). Four of the five other

lysines in *Bpcol-1* corresponded to arginines in *Ascol-C*, and therefore represented conservative amino acid modifications. *Bpcol-1* presented an extreme preference for adenine in third position of the codon (12/14) and *Ascol-C* a light preference for guanidine (9/14).

The two tyrosines of *Bpcol-1* were conserved in *Ascol-C*; the first one, at position 45, corresponded to a tyrosine localised in the HBC homology block that is conserved at 71% in *C. elegans* collagens [12]. The other tyrosine was the last amino acid of the protein, representing a conserved tyrosine position typical of class B collagens [30]. *Ascol-C* had one more tyrosine residue located at the last position of the HBB homology block.

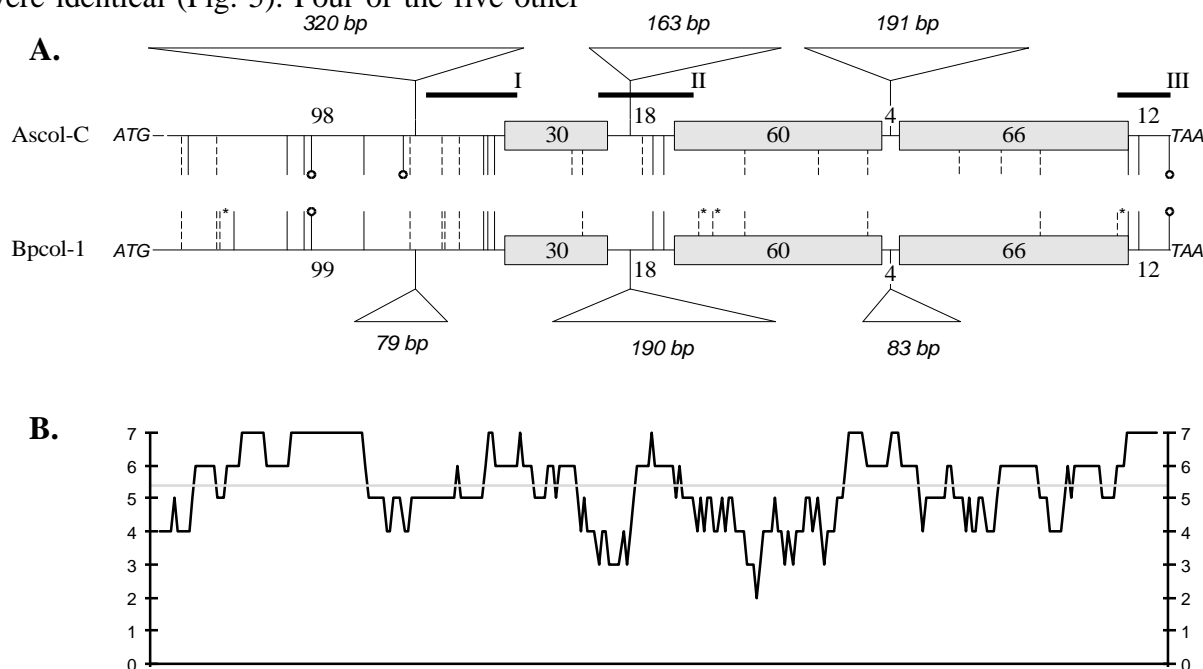


Fig. 5. (A) Schematic representation of the domain organisation of the collagen polypeptides *Ascol-C* and *Bpcol-1*, based on the nucleotide sequence. Numerals indicate the number of amino acids in each region. The boxed areas represent (Gly-X-Y)_n domains, solid vertical lines cysteyl residues, dashed vertical lines lysyl residues and circles tyrosines. Asterisks indicate the *Bpcol-1* lysines that correspond to arginine in *Ascol-C*. The initiator methionines are included in the amino acid totals of the N-terminal regions. A 1-aa gap was introduced at position 4 of *Ascol-C*, in order to maximise the alignment. Regions I, II and III [20] are indicated by thick horizontal lines, and are compared in detail in Fig. 2. The position of introns is indicated by a triangle, and the bp length is mentioned in italics. (B) Window stringency analysis of the homology between *Ascol-C* and *Bpcol-1*. The graph was constructed by examining the homology of each amino acid and the three amino acids of either side. The number of homologous amino acids is plotted (0-7) under the central amino acid. The first three and last three positions of the gene, which do not have three amino acids on either side, are not included in the graph. The average homology (77% or 5.4 of 7 amino acids) is indicated by a horizontal grey line.

The occurrence of di- and isotri-tyrosine covalent bonds is well known in the collagen of the cuticle of nematodes [5; 33]. The presence of such cross-links might be among other responsible for the detection, in SDS-PAGE after full restriction of the disulphide bonds, of collagens (53 to > 200 kDa) larger than the predicted proteins (28-35 kDa) coded by the approximately 1 kb genes. Hydroxylysines were not detected in *A. suum* cuticle [4], but the highly conserved position of lysines in *Ascol-C* and *Bpcol-1* may indicate the presence of 'Schiff base' covalent bonds involving lysyl residues, as described in vertebrate collagens [31, 34].

The data indicate that the small collagen-like genes of the cuticle of nematodes contain 1 or 2 introns which are short (50-100 bp) in *C. elegans* and the parasitic nematode of sheep *H. contortus* [4] and much larger (> 260-560 bp) in *A. suum* [14]. The genomic *Ascol-C* and *Bpcol-1* both presented three introns, at exactly the same positions (including the one-aa gap of *Ascol-C*) but with variations in size. The first (*A. suum* : 320 bp / *B. pahangi* : 79 bp) was localised between amino acids 73 and 74, the second (163 bp / 190 bp) between 135 and 136 and the third (191 bp / 83 bp) between 209 and 300 (Fig. 5). These results confirm that introns are much longer in *A. suum* collagen genes. The *Bpcol-1* gene of *B. pahangi* shared an intermediate introns size (79 to 190 bp). Introns were localised within non-helical regions and presented sequences in good agreement with the splice donor and acceptor consensus sequences described in *C. elegans* [20].

Kramer and co-workers compared the 3'-flanking region of two collagen genes of *C. elegans*: *col-1* and *col-2* [35]. These two genes, belonging to class A [30], presented a string of 10 identical nucleotides, 5'-TTCAACTTCT-3'. *Ascol-C* had a 10-nt sequence which was identical for nine of the 10 bp described in *col-1* and *col-2*, 94 nucleotides downstream of the termination codon. The *Bpcol-1* gene also presented a 111-nt distant region from the TAA stop codon, that could correspond to this 10-nt

A *Ascol-C*

```

TTAAATACCTA TTTGAGCGTG ACGCGCATTT CAGACCGAAT
GAAGATCGCT GGCTCAGTCA TCCGTCACAT TTGCCGAAGT
CTTCTGGCTC ATTACATCCA CTTATTCAAC CTCTCCCACT
CCTTTTGTAGT ATCATATTAC AGCGATGTCT TTAATTGCCC
GCCATTGCCC ATTGTCTATTG CAGTTGTGTT CAGATTGCCA
GAAGACAAA TAAAAACTTT TGCCGCATTA TCATAAAAAG
CCACCGCGGT GGA

```

B *Bpcol-1*

```

TTAAACAATTT CAAGGGATTA TCCAGGAGAG TGATCCAAAC
CTGTCACTCA TGCTATTAGT ATCCATCTTT CAGTCTATCC
TCCATTTCCA TTATTCTTCC CATTCTAAA TCACATCAAA
ATTTTCAATC TTTAGATTTT TCTTTGTTCA ATTTAGATAA
CAACGACAAA TTGAACGTAT ATTTTAATGA AAAAAATATAT
GAATTGAAAT AATGCAATGA AGTGAGAAA TAAAGATTTT
AGAGA

```

Fig. 6. Comparison of the nucleotide sequence of the 3' flanking regions of *Ascol-C* (A) and *Bpcol-1* (B). The stop codons are boxed. Potential polyadenylation signals are bold. The 10-nt sequences corresponding to the sequence described by Kramer and co-workers [35] in *col-1* and *col-2* are underlined.

sequence, but with only eight conserved bp (Fig. 6). This 10-nt pattern was mentioned only in *col-1* and *col-2* of *C. elegans* so far, and its function is unknown.

The sequence and organisational similarities between *Ascol-C* and *Bpcol-1* genes strongly indicate that these genes are orthologous, suggesting that *A. suum*, a nematode parasitic in swine intestine and *B. pahangi*, a filarial nematode which is transmitted by a mosquito and lives in lymphatic vessels of felidae, have a common ancestor which had a collagen gene with introns at the same positions. This result is in total agreement with the molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda established by Blaxter and co-workers [19], which groups *Brugia sp.* (Spirurida) and *Ascaris sp.* (Ascaridida) in a same clade. This collagen gene seemed also to be present in another species: *B. malayi*. Gregory and co-workers [36] isolated a 272 bp fragment, called *Bmcol-3*. This partial gene, which is abundantly expressed in the third larval stage, shares more than 99% homology with the *Bpcol-1* gene.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the help of Yves Cheminade for part of the laboratory work.

This work was supported by a grant from the Swiss National Science Research Foundation (No. 31-47194.96).

References

- [1] Warton DA. In: A functional biology of nematodes (Calow P., ed), Croom Helm London and Sydney 1986
- [2] Olgivie BM, Philipp M, Jungery M, Maizels RM, Worms MJ, Parkhouse RME. The surface of nematodes and the immune response of the host. In: The host invader interplay (Van den Bossche, H, ed.). Elsevier, Amsterdam. 1980; pp 99-104
- [3] Josse J, Harrington WF. Role of pyrrolidine residues in the structure and stabilization of collagen. J Mol Biol 1964;9:269-287.
- [4] Cox GN. Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. J Parasitol 1992;78:1-15.
- [5] Fujimoto D, Horiuchi K, Hiramama M. Isotriptyrosine, a new crosslinking amino acid isolated from *Ascaris* cuticle collagen. Biochem. Biophys Res Comm 1981;99:637-643.
- [6] Cox GN, Kusch M, Edgar RS. Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterisation. J Cell Biol 1981;90:7-17.
- [7] Ouazana R, Herbage D. Biochemical characterisation of the cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biophys Acta 1981;669:236-243.
- [8] The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. Science 1998;282:2012-2018
- [9] Park YS, Kramer JM. Tandemly duplicated *Caenorhabditis elegans* collagen genes differ in their modes of splicing. J Mol Biol 1990;211:395-406.
- [10] Johnstone IL, Shafi Y, Majeed A, Barry JD. Cuticular collagen genes from the parasitic nematode *Ostertagia circumcincta*. Mol Biochem Parasitol 1996;80:103-112.
- [11] Cox GN, Kramer JM, Hirsh D. Number and organisation of collagen genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. Mol Cell Biol 1984; 4:2389-2395.
- [12] Kramer JM. Structures and functions of collagens in *Caenorhabditis elegans*. FASEB J 1994;8:329-336.
- [13] Shamansky LM, Pratt D, Boisvenue RJ, Cox GN. Cuticle collagen genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* are highly conserved. Mol Biochem Parasitol 1989;37:73-86.
- [14] Kingston IB, Wainwright SM, Cooper D. Comparison of collagen sequences in *Ascaris suum* and *Caenorhabditis elegans*. Mol Biochem Parasitol 1989;37:137-146.
- [15] Scott AL, Yenbutr P, Eisinger SW, Raghavan N. Molecular cloning of the cuticular collagen gene *Bmcol-2* from *Brugia malayi*. Mol Biochem Parasitol 1995;70:221-225.
- [16] Bisoffi M, Betschart B. Identification and sequence comparison of a cuticular collagen of *Brugia pahangi*. Parasitol 1996;113:145-155.
- [17] Ray C, Wang TY, Hussey RS. Identification and characterisation of the *Meloidogyne incognita col 1* cuticle collagen gene. Mol Biochem Parasitol 1996;83:121-124.
- [18] Mehlhorn H. Parasitology in focus. Facts and trends. (Mehlhorn H., ed.), Springer-Verlag, Heidelberg. 1988.
- [19] Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. Nature 1998; 392:71-75.
- [20] Cox GN, Fields C, Kramer JM, Rosenzweig B, Hirsh D. Sequence comparisons of developmentally regulated

- collagen genes of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 1989;76:331-344.
- [21]Di Mito C, Betschart B. DNA extraction from *Ascaris suum* muscle tissue. *Parasitol Res* 1998;84:595-597.
- [22]Sulston J, Hodgkin J. Methods. In: Wood WB. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988; pp 587-606.
- [23]Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al*. Current Protocols in Molecular Biology. 3 vols. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1995
- [24]Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucl Acids Res* 1991;19:1154
- [25]Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res* 1994;22:4673-4680.
- [26]Martin SAM, Thompson FJ, Devaney E. The construction of spliced leader cDNA libraries from the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Mol Biochem Parasitol* 1995;70:241-245.
- [27]Nilsen TW. Trans-splicing of nematode premessenger RNA. *Annu Rev Microbiol* 1993;47:413-440.
- [28]Blaxter ML, Guiliano DB, Scott AL, Williams SA. A unified nomenclature for filarial genes. *Parasitol Today* 1997;13:416-417.
- [29]Ray C, Hussey RS. Evidence for proteolytic processing of a cuticle collagen in a plant-parasitic nematode. *Mol Biochem Parasitol* 1995;72:243-6.
- [30]Johnstone IL. The cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: a complex collagen structure. *BioEssays* 1993;13:171-178.
- [31]Kühn K. Chemical properties of collagen. In: Immunochemistry of the extracellular matrix. vol. 1, Furthmayr H.,CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1982
- [32]Martin SAM, Hunter SJ, Thompson FJ, Devaney E. Stage specific gene expression in the post-infective L3 of the filarial nematode, *Brugia pahangi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;79:109-112.
- [33]Marti S. Biochemische und immunologische Charakterisierung von Cuticlin, einem Strukturprotein aus der Kuticula von *Ascaris suum*. 1991, PhD thesis, Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland.
- [34]Rawn JD. Fibrous proteins. In: Biochemistry. (Neil Patterson Publisher, Burlington, North Carolina). 1989. pp 75-98.
- [35]Kramer JM, Cox GN, Hirsh D. Expression of the *Caenorhabditis elegans* collagen genes *col-1* and *col-2* is developmentally regulated. *J Biol Chem* 1985;260:1945-1951
- [36]Gregory WF, Blaxter ML, Maizels RM. Differentially expressed, abundant trans-spliced cDNAs from larval *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;87:85-95.