LE CLONAGE DES SCHISTOSOMES : ses applications aux recherches modernes sur la biologie des Schistosomes

J. JOURDANE, C. COMBES

RÉSUMÉ. Ce travail constitue une mise au point sur le clonage de Schistosomes et sur les applications récentes de cette technique aux recherches sur la biologie des Schistosomes. Après avoir décrit la technique de clonage et le processus ontogénique de réplication des sporocystes, les auteurs indiquent les domaines de recherche dans lesquels le clonage des Schistosomes peut apporter une contribution importante : sélection et maintien de souches définies et stabilisées, constitution de banques génomiques, génétique des Schistosomes et immunologie des Mollusques.

Mots-clés : Schistosomes. Clonage. Transplantation microchirurgicale de sporocystes. Réplication des sporocystes fils. Maintenance des Schistosomes.

Cloning of Schistosomes: its applications to modern researches on Schistosome biology.

SUMMARY. This work is a review of the cloning of Schistosomes and of the new applications of the technique to the Schistosome biology. The authors first describe the technique of cloning and the ontogenetic process of sporocyst replication and then the mean research fields in which the method may represent an important step: selection and maintenance of pure and stabilized strains, constitution of genomic banks, Schistosome genetic and Mollusc immunology.

Key-words : Schistosomes. Cloning. Microsurgical transplantation of sporocysts. Replication of daughter sporocysts. Schistosome maintenance.

Un Mollusque et un Vertébré étant indispensables dans le cycle des Schistosomes, la maintenance du parasite en laboratoire ne pouvait se faire, avant la mise au point du clonage, que d'une seule façon : entretenir le cycle complet du parasite, c'est-à-dire assurer la transmission régulière du parasite du Mollusque au Vertébré, puis du Vertébré au Mollusque et ainsi de suite sans interruption (les Vertébrés utilisés en laboratoire sont le plus souvent des Rongeurs).

Département de Biologie Animale, URA CNRS 698, Université, avenue de Villeneuve, F 66025 Perpignan Cedex.

Accepté le 16 décembre 1988.

Le clonage du parasite chez le Mollusque, par transplantation indéfinie du parasite larvaire de Mollusque à Mollusque, permet d'éviter totalement l'étape Vertébré. L'histoire des recherches qui ont abouti au clonage des Schistosomes remonte à 1966 ; à cette date, l'Américain Chernin montre que des sporocystes greffés sur un Mollusque sain sont capables de survivre. Quelques années plus tard, les Américains, Lie (1969), Diconza et Hansen (1972) et Hansen *et al.* (1974) font état de la possibilité de réplication des sporocystes fils dans certaines situations expérimentales. Dans toutes ces expériences cependant, le développement d'une génération surnuméraire de sporocystes est considérée par les auteurs comme une potentialité ne s'exprimant que de façon exceptionnelle. Il a fallu attendre presque dix ans pour que le développement des techniques, notamment en ce qui concerne l'anesthésie des Mollusques et le protocole opératoire, autorise un plein développement des transplantations chez les Schistosomes. En 1978, Jourdane réussit pour la première fois deux transplantations en succession de sporocystes fils de *S. mansoni*, avec émission intermédiaire de cercaires infestantes puis, en 1980, Jourdane et Théron annoncent le succès de six transplantations successives à partir d'un seul individu initial, toujours avec conservation de l'infectivité des cercaires. A partir de 1981, nous avons commencé à cloner séparément des sporocystes mâles et femelles de *Schistosoma mansoni*, et ces clones ont été maintenus par la technique de transplantation jusqu'à ce jour après 35 transplantations en série. Précisons qu'en 1980, les Japonais Nojima *et al.* rapportaient aussi le succès de transplantations successives de *S. mansoni* en utilisant une technique opératoire différente.

Après avoir décrit la technique de clonage des Schistosomes et le processus ontogénique qui en est le support, nous analyserons les perspectives de recherche ouvertes par cette technique de maintenance.

La technique de clonage

1 — TECHNIQUE OPÉRATOIRE

Les expériences *princeps* ont été réalisées sur le couple *Schistosoma mansoni*-*Biomphalaria glabrata* (souche albinos) originaire du Brésil, classiquement utilisé dans les laboratoires. Une description détaillée de la technique de transplantation est donnée dans le travail de Jourdane et Théron (1980). Nous résumons ci-dessous celle-ci. Les explants servant à l'infestation, constitués de greffons de glande digestive de 1 mm³ parasités par des sporocystes fils, sont prélevés chez des Planorbes infestés depuis 30 jours. Les greffons sont lavés plusieurs fois avant transplantation dans la solution physiologique de Chernin (1963), additionnée de pénicilline. Ils sont implantés dans l'heure qui suit le prélèvement. Un Mollusque donneur de 15 mm permet d'infester 30 Mollusques receveurs en moyenne. L'infestation est réalisée par transplantation microchirurgicale de l'explant dans les tissus de Planorbes receveurs indemnes, selon une technique opératoire inspirée de celle de Chernin. L'implantation des greffons se fait sous anesthésie générale

dans le sinus céphalo-pédieux à l'aide d'une micro-aiguille en verre, montée sur une seringue de 1 ml. Le sinus céphalo-pédieux est atteint après une incision des téguments, pratiquée juste en arrière de l'orifice génital mâle, le Planorbe étant maintenu en extension à l'aide d'un microrétracteur. Toutes les phases de la transplantation sont réalisées en ambiance rigoureusement stérile, dans une chambre de culture cellulaire. Un soin particulier est aussi apporté à la désinfection de la coquille et des téguments des Mollusques avant transplantation. Les Mollusques implantés sont conservés pendant 48 heures dans une eau très aérée, aseptisée par addition de nitrofurantaine, afin de prévenir tout risque de septicémie post-opératoire.

En ce qui concerne les *Bulinus* et les *Oncomelania*, la technique de transplantation microchirurgicale utilisée est, dans ses grandes lignes, très proche de celle que nous venons de rapporter. Les seules différences concernent l'extension du Mollusque, qui met en œuvre un microrétracteur en forme de crochet non contondant, inséré dans la bouche chez les *Bulinus* ou dans l'opercule chez les *Oncomelania*.

2 — ONTOGÉNÈSE DE L'EXPLANT APRÈS TRANSPLANTATION

L'analyse du devenir du greffon chez le Mollusque receveur montre la disparition progressive dans les sporocystes de toute forme larvaire identifiable à des stades cercariens. Leur lumière est occupée exclusivement par des larves vermiformes dont l'organisation correspond sans aucun doute possible à celle de sporocystes. Après transplantation, il apparaît donc que les sporocystes cessent rapidement de produire des cercaires. La morphogénèse larvaire s'engage dans la production d'une génération des sporocystes en tous points semblables aux sporocystes fils formés au cours du cycle normal. Le résultat en est la mise en place d'une génération additionnelle de sporocystes qui essaient progressivement dans tous les organes du Mollusque receveur, principalement dans la glande digestive, et y produisent des cercaires. Les premiers sporocystes de rang III sont visibles dans les espaces interlobulaires de la glande digestive 30 jours après la transplantation.

Au plan ontogénique, il s'avère que le schéma de multiplication traditionnellement admis pour les Digènes à cercariogénèse intrasporocystique, selon lequel les cellules germinatives des sporocystes fils ont une destinée rigoureusement orientée dans la voie de la différenciation cercarienne, n'a pas une valeur générale. Dans notre expérimentation, on assiste à un processus de régulation, puisque la morphogénèse larvaire s'engage dans la production d'une génération additionnelle de sporocystes. Il convient de noter que chez les Digènes à multiplication asexuée par rédies, les potentialités répliquatives des rédies cercariogènes sont connues chez plusieurs espèces. Cette potentialité a d'ailleurs permis à Donges (1971) de cloner deux espèces d'*Echistomatidae* par transplantation en série des rédies chez le Mollusque.

Nous avons obtenu, après transplantation de sporocystes prélevés chez les

Mollusques receveurs, une évolution identique à celle décrite, avec production d'une nouvelle génération de sporocystes qui colonisent à leur tour le Mollusque et produisent des cercaires. La réplication des sporocystes s'observe à chaque transplantation, ce qui autorise le maintien du parasite chez le Mollusque de façon indéfinie par repiquages successifs. Si le premier Mollusque donneur est infesté avec un seul miracidium, toutes les cercaires obtenues par la suite sont issues de ce miracidium, sans qu'aucune reproduction sexuée ne soit jamais intervenue. Il y a donc bien eu clonage de l'individu initial.

La technique de clonage a été appliquée jusqu'ici avec succès chez quatre autres espèces de Schistosomes : *S. haematobium*, *S. bovis*, *S. japonicum* et *S. mekongi*. Le clonage de *S. haematobium* a été réalisé pour la première fois par Jourdane *et al.* (1981) chez le Mollusque vecteur *B. truncatus*. Le clonage a aussi été réussi pour les souches de *S. haematobium* se développant chez *B. globosus*. L'espèce *S. bovis* a été clonée pour la première fois par Jourdane *et al.* (1984) chez le Mollusque *B. truncatus*. Notre laboratoire a également mis au point le clonage de *S. japonicum* chez *Oncomelania hupensis* (Jourdane *et al.*, 1985) et plus récemment celui de *S. mekongi* chez *O. hupensis* aussi. Pour toutes les espèces de Schistosomes autres que *S. mansoni*, pour lesquelles la maîtrise de la technique de clonage est beaucoup plus récente, nous n'avons pas encore l'expérience d'une maintenance à long terme. Il y a tout lieu de croire cependant que la technique de maintenance par clonage offre la même fiabilité que pour *S. mansoni*.

Applications du clonage

1 — ENTRETIEN DU CYCLE

La maintenance des Schistosomes par la technique du clonage offre un intérêt évident au plan pratique : elle permet de diminuer considérablement les coûts et le temps de travail par rapport à un entretien classique, puisque l'étape Ver-tébré est supprimée. Les repiquages dans le cas de *S. mansoni* et *S. haematobium* sont réalisés tous les 60 jours environ, dans le cas de *S. japonicum* tous les 90 jours. Un Mollusque donneur permet de transplanter de 25 à 30 Mollusques receveurs. Les données portant sur une maintenance à long terme (Jourdane, 1984) montrent que cette technique se révèle d'une très grande fiabilité : la survie post-opératoire est comprise entre 75 et 85 % suivant les espèces, le taux moyen d'infestation est de 75 %, la production cercarienne est très proche de celle des Mollusques infestés par voie miracidiale, l'infectivité des cercaires n'est pas modifiée.

2 — NOUVELLES PERSPECTIVES DE RECHERCHE

a — Sélection et maintien de génotypes définis.

Le clonage des Schistosomes rend possible la sélection et le maintien de façon permanente de génotypes définis, la recombinaison génétique n'étant plus possible

en l'absence de reproduction sexuée. A partir d'une population initiale polymorphe, la sélection de génotypes est obtenue par infestation monomiracidiale de Mollusques et maintenue par clonage des génotypes ainsi ségrégués. Cette technique a déjà été appliquée pour la sélection et le maintien de phénotypes aussi divers que :

- des patterns enzymatiques caractérisés par des morphes électrophorétiques définis (Imbert-Establet *et al.*, 1984) ;
- des lignées offrant des indices très élevés de compatibilité vis-à-vis des Mollusques ;
- des lignées résistantes à certaines classes d'antihelminthiques ;
- des phénotypes chronobiologiques définis (Théron et Combes, 1988).

b — *Maintien de souches stabilisées.*

De nombreux auteurs ont mis en évidence que les passages successifs obligatoires du parasite chez le Vertébré au cours de l'entretien classique entraînaient une modification des souches de parasites (on dit que la souche dérive) : après quelques passages sur un Rongeur de laboratoire, une souche déterminée peut avoir perdu certains de ses caractères initiaux. Le caractère de compatibilité Mollusques-Schistosomes peut notamment être très rapidement modifié surtout pour l'espèce *S. haematobium* : un isolat de Schistosomes, extrait à partir d'urines humaines, qui offre une compatibilité de 100 % peut, après un 1^{er} passage chez le Mériion, voir sa compatibilité chuter à 50 %. On peut même assister à une stérilisation de la souche après quelques passages seulement sur Rongeur. D'autres caractères tels que la résistance aux drogues, l'antigénicité des adultes, sont susceptibles aussi d'être très rapidement modifiés au cours d'un entretien classique. Or, les recherches modernes en génétique ou en immunologie s'accommodent assez mal d'un matériel biologique dont certains caractères se modifient de façon incontrôlable. L'entretien par clonage permet d'éliminer cette dérive des souches qui ne peut se produire en l'absence de passage du parasite chez les Rongeurs de laboratoire.

c — *Constitution de banques génomiques.*

Le clonage des Schistosomes, qui permet à la fois de sélectionner et de maintenir des génotypes définis tout en assurant leur stabilité à long terme, autorise la constitution de véritables banques génomiques. Il est ainsi possible de garder côte à côte, sans difficultés techniques majeures, autant de souches différentes, sélectionnées en fonction de l'intérêt de certains de leurs caractères (fécondité, compatibilité, pattern enzymatique, déterminants antigéniques).

d — *Génétique des Schistosomes.*

Les expériences de génétique chez les Schistosomes se sont toujours avérées très difficiles pour deux raisons au moins :

- le succès des infestations monomiracidiales imposées pour isoler les sexes est souvent très faible ;

— le sexe des cercaires ne peut être précisé qu'au terme du développement des Schistosomes adultes chez le Rongeur, soit au minimum 60 jours après l'infestation des Mollusques ; or, la survie des Mollusques parasités est souvent inférieure à ce délai.

Ces deux impératifs rendent très difficile la conduite à leur terme des expériences de génétique ou d'hybridation interspécifiques des Schistosomes, ce qui a constitué jusqu'ici un frein certain aux études sur la biologie des populations de Schistosomes. Le clonage des Schistosomes permet d'obvier à ces inconvénients, puisqu'il permet de conserver côte à côte autant de clones mâles et femelles de phénotypes définis ou d'espèces différentes. Des résultats très intéressants ont déjà été acquis grâce au clonage dans l'étude de l'hérédité de certains génotypes biochimiques et dans le domaine des hybridations interspécifiques (Brémond, 1987).

e — *Immunologie des Mollusques.*

La technique de transplantation microchirurgicale, mise au point pour le clonage des Schistosomes, fournit un protocole expérimental de choix pour l'analyse des mécanismes de défense des Mollusques, puisqu'on peut suivre de façon très précise la réaction du Mollusque à l'introduction d'explants étrangers (allo- et xéno-greffes, parasites). Cette technique a déjà été appliquée avec succès à l'étude de l'immunité à médiation cellulaire chez les Mollusques (Morona *et al.*, 1985). Elle s'est révélée aussi d'une très haute fiabilité dans les études de compatibilité Mollusque-Schistosome, la compatibilité pouvant être testée au niveau immunitaire en 24 heures par la présence ou non d'une capsule hémocytaire autour de l'explant greffé (Jourdan, 1982 ; Jourdan et Xia Mingyi, 1986).

Conclusion

Si la technique de clonage apparaît comme un progrès indéniable dans la maintenance des Schistosomes au laboratoire, son apport à la connaissance de ces parasites ne peut aussi que s'intensifier dans les années à venir. Nous avons en effet vu que cette technique ouvre des perspectives de recherche très prometteuses dans de nombreux domaines. La technique de clonage devrait à l'avenir constituer un outil de travail courant dans beaucoup d'approches expérimentales.

Sur un plan strictement embryologique, la technique de clonage a permis de révéler que les Trématodes constituent aussi un des rares groupes de métazoaires chez lesquels certaines cellules embryonnaires offrent une potentialité de régulation morphogénétique totale ; le modèle biologique Trématode devrait se révéler un matériel d'étude tout à fait intéressant dans la compréhension de certains problèmes passionnants de biologie cellulaire.

RÉFÉRENCES

- BREMOND Ph. : Contribution à la biologie des populations de Schistosomes : polymorphisme enzymatique de *S. mansoni* en Guadeloupe ; caractérisation électrophorétique (I. E. F.) d'hybrides expérimentaux, 1987, Thèse ès Sciences, Université de Montpellier, 187 p.
- CHERNIN E. : Transplantation of larval *Schistosoma mansoni* from infected to uninfected snails. *J. Parasitol.*, 1966, *52*, 473-482.
- DI CONZA J. J., HANSEN E. L. : Multiplication of transplanted *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts. *J. Parasitol.*, 1972, *58*, 181-183.
- DONGES H. : The potential number [of redial generations in Echinostomatids (*Trematoda*). *Int. J. Parasitol.*, 1971, *1*, 51-59.
- HANSEN E. L., PEREZ-MENDEZ G., YARWOOD E., BUECHER E. J. : Second-generation daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni* in axenic culture. *J. Parasitol.*, 1974, *60*, 371-372.
- IMBERT-ESTABLET D., ROLLINSON D., ROSS G. : Sélection des génotypes de *Schistosoma mansoni* et leur maintenance par transplantations sporocystiques. *C. R. Acad. Sc., Paris*, 1984, *299*, Sér. III, n° 11, 459-462.
- JOURDANE J. : Perspectives de maintenance de *Schistosoma mansoni* exclusivement chez le Mollusque vecteur par l'utilisation des techniques de transplantation. *Fourth International Congress of Parasitology*, 1978, *100*, 100-101.
- JOURDANE J. : Étude des mécanismes de rejet dans les couples Mollusque-Schistosome incompatibles à partir d'infestations par voie naturelle et par transplantations microchirurgicales de stades parasitaires. *Acta tropica*, 1982, *39*, 325-335.
- JOURDANE J. : Maintenance d'un clone mâle et d'un clone femelle de *Schistosoma mansoni* par transplantation microchirurgicale de sporocystes fils. Fiabilité de la méthode. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1984, *59*, 361-367.
- JOURDANE J., KECEMIR N., COMBES C. : Mise en évidence d'une répllication des sporocystes fils de *Schistosoma haematobium* après transplantation microchirurgicale chez *Bulinus truncatus*. *C. R. Acad. Sc., Paris*, 1981, *293*, Sér. III, 531-533.
- JOURDANE J., LIANG Y. S., BRUCE J. I. : Transplantation of *Schistosoma japonicum* daughter sporocysts in *Oncomelania hupensis*. *J. Parasitol.*, 1985, *71*, 244-247.
- JOURDANE J., MOUAHID A., TOUASSEM R. : Évolution des sporocystes de *Schistosoma bovis* après transplantation microchirurgicale chez *Bulinus truncatus*. *Ann. Parasitol.*, 1984, *59*, 459-466.
- JOURDANE J., THÉRON A. : *Schistosoma mansoni* : cloning by microsurgical transplantation of sporocysts. *Exper. Parasitol.*, 1980, *50*, 349-357.
- JOURDANE J., XIA Mingyi : Étude de la compatibilité schistosome-mollusque vecteur par la technique de transplantation microchirurgicale de sporocystes chez deux couples *Schistosoma japonicum-Oncomelania hupensis* originaires de Chine continentale. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1986, *61*, 559-564.
- LIE K. J. : Role of immature rediae in antagonism of *Paryphostomum segregatum* to *Schistosoma mansoni* and larval development in degenerative sporocysts. *Z. Parasitenkunde*, 1969, *32*, 316-323.
- MORONA D., JOURDANE J., AESCHLIMANN A. : Étude ultrastructurale de la formation d'un capsule hémocytaire lors de la transplantation de glande digestive parasitée par des sporocystes de *Schistosoma mansoni* chez *Biomphalaria glabrata*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1985, *60*, 133-146.
- NOJIMA H¹, NODA S., SATO A. : Serial implantations of larval *Schistosoma mansoni* from infected snails. *J. Parasitol.*, 1980, *66*, 478-482.
- THÉRON A., COMBES C. : Genetic analysis of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma mansoni*. *Behavior Genetics*, 1988, *18*, 201-209.