HAL
open science

Bases moléculaires du polymorphisme de compatibilité dans l'interaction Schistosoma mansoni / Biomphalaria glabrata

Yves Moné

To cite this version:

Yves Moné. Bases moléculaires du polymorphisme de compatibilité dans l'interaction Schistosoma mansoni / Biomphalaria glabrata. Ecologie, Environnement. Université de Perpignan, 2011. Français. NNT : . tel-00608477

HAL Id: tel-00608477

https://theses.hal.science/tel-00608477

Submitted on 13 Jul 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE VIA DOMITIA

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Ecologie - Génétique - Biologie moléculaire - Biochimie
Spécialité : Biologie
Ecole Doctorale : Energie et Environnement

présentée et soutenue publiquement par

Yves MONÉ

Le 15 mars 2011

Bases moléculaires du polymorphisme de compatibilité dans l'interaction *Schistosoma mansoni* / *Biomphalaria glabrata*

Devant le jury composé de :

Mme Christine COUSTAU, Chargée de Recherche CNRS, Nice	Rapporteur
Mme Elisabeth HUGUET, Maître de Conférences, Université de Tours	Rapporteur
Mme Evelyne BACHERE, Cadre IFREMER, Montpellier	Examinateur
M. André THERON, Directeur de recherche CNRS, Perpignan	Examinateur
M. Guillaume MITTA, Professeur, Université de Perpignan	Directeur de thèse
M. Benjamin GOURBAL, Maître de Conférences, Université de Perpignan	Co-directeur de thèse

A mes parents.

A ma famille.

A tous ceux qui m'ont soutenu et accompagné.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de doctorat.

Tout d'abord, je remercie très sincèrement mes deux directeurs de thèse Monsieur Guillaume Mitta et Monsieur Benjamin Gourbal pour leur encadrement pendant ces six années depuis le master. Je les remercie également pour leurs conseils, leur disponibilité, leur soutien, et leur gentillesse. Merci beaucoup à tous les deux.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté de consacrer une partie de leur temps précieux afin d'évaluer ce travail : Madame Christine Coustau et Madame Elisabeth Huguet pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs ainsi que Madame Evelyne Bachère et Monsieur André Théron pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie vivement Monsieur David Duval pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils et son aide précieuse.

Je remercie sincèrement toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ma thèse au laboratoire Ecologie et Evolution des Interactions pour leur disponibilité, leur compétence, et leur sympathie. Merci à Anne M., Anne R., Bernard, Betty, Carmen, Cécile, Céline, Christoph, Déborah, Diane, Gabriel, Gaël, Hélène, Irma, Jean-François, Jérôme, Jocelyne, Juliette, Nathalie, Olivier, Rémi et Richard.

Merci également à tous les anciens et nouveaux thésards : Rodrigue, Sophie, Nicolas, Jérémie, Guilhem, Pauline, Julie, et Julien.
Un grand merci à Manu pour m'avoir fait part de son expérience depuis mon master et pour notre collaboration.

Je tiens à remercier tous mes proches pour leurs encouragements, leur soutien et leur aide. Je remercie tous mes amis, notamment Willfried, Anne-Cécile, Cédric, Mathieu, Audrey C., Georges, Audrey M., Dorothée. Je remercie enfin toute ma famille, en particulier mes parents ainsi qu'Olivier, Anne, Frédérique, Jean et Etiennette.

Sommaire

INTRODUCTION **1**

1. Reconnaissance immunitaire et diversification : des Vertébrés aux Invertébrés **5**

1.1. Polymorphisme et diversification des récepteurs immunitaires des Vertébrés **5**

1.1.1 Les Gnathostomes **5**

a) Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) 6

b) Les récepteurs des antigènes du système adaptatif : diversification des immunoglobulines (Ig) et des récepteurs des lymphocytes T 8

• *Réarrangements somatiques* 9

• *Hypermutations somatiques* 13

• *Commutation de classe* 14

1.1.2 Les Agnathes : une forme alternative d'immunité adaptative **15**

a) L'immunité adaptative existe-t-elle chez les Agnathes 15

b) Un nouveau type de récepteur : les Variable Lymphocytes Receptors (VLR) 16

1.2 Polymorphisme et diversification des récepteurs immunitaires chez les Invertébrés **19**

1.2.1 La conception traditionnelle de l'immunité des Invertébrés : le «paradigme de Medzhitov et Janeway» et ses limites **19**

1.2.2 Molécules hypervariables et réponse immunitaire chez les Invertébrés **21**

a) Les « Variable Chitin-binding Proteins » (VCBP) 21

b) Les « Scavenger receptor cystein-rich » (SRCR) 23

c) Les protéines Sp185/333 25

d) Les Down syndrom cell adhesion molecules (Dscam) des arthropodes 28

e) *Les Fibrinogen-related proteins (FREPs) de* B. glabrata 30

2. La phase effectrice de la réponse immunitaire dans les interactions hôte-parasite : le rôle des espèces réactives de l'oxygène **33**

2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) chez l'hôte **33**

2.2 Les systèmes enzymatiques antioxydants des parasites **35**

2.2.1 La superoxyde dismutase (SOD) **36**

2.2.2 Les peroxydases **36**

2.2.3 Les glutathione S-transférases (GST) **37**

2.2.4 Les Peroxyrédoxines **38**

3. Le modèle *Biomphalaria glabrata / Schistosoma mansoni* **40**

3.1 Généralités **40**

3.2 Le cycle de vie de *Schistosoma mansoni* **41**

3.3 L'interaction *B. glabrata / S. mansoni* **42**

3.3.1 Spécificité et multiplication clonale **42**

3.3.2 Le polymorphisme de compatibilité **43**

Partie 1. Reconnaissance immunitaire et course aux armements dans l'interaction *B. glabrata / S. mansoni* **45**

Publication n°1 : Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata* / *Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomic approach 49

Publication n°2 : A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model 61

Partie 2. Effecteurs immunitaires et course aux armements dans l'interaction *B. glabrata / S. mansoni* **79**

Publication n°3 : Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* 81

Publication n°4 : An example of molecular coevolution: ROS and ROS scavenger levels in *S. mansoni/B. glabrata* interactions 87

DISCUSSION **97**

1. Lectines et glycoprotéines actrices de la reconnaissance immunitaire **99**

1.1 Le complexe immun *Sm*PoMuc-FREP-TEP **100**

1.1.1 Les FREPs de *B. glabrata*, molécules partenaires des *Sm*PoMucs **101**

1.1.2 La Thioester-containing protein de *B. glabrata* (BgTEP) **102**

1.2 Le complexe *Sm*PoMuc-FREP-TEP au cœur du polymorphisme de compatibilité **106**

2. Coévolution et effecteurs de l'immunité dans le modèle *B. glabrata / S. mansoni* **109**

2.1 ROS et ROS scavengers : des acteurs essentiels de l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni* **111**

2.2 La coévolution entre ROS et ROS scavengers dans l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni* **113**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **115**

BIBLIOGRAPHIE **124**

Annexe 1 ..... **137**

Guillou F, Roger E, Moné Y, Rognon A, Grunau C, Théron A, Mitta G, Coustau C, Gourbal BE. (2007). Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. Molecular and Biochemical Parasitology, 155(1). 161

Table des Figures

Figure 1. Structure des gènes humains d'immunoglobulines et des TCR dans la lignée germinale **11**

Figure 2. Réarrangement des segments géniques V(D)J et expression des gènes codant les chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines **12**

Figure 3. Représentation schématique du réarrangement de l'ADN conduisant à la formation d'un gène VLR (« Variable Lymphocyte Receptor ») fonctionnel chez la lamproie **18**

Figure 4. Structure des 7 types de protéines SRCR de *S. purpuratus* **24**

Figure 5. Diversité des transcrits et structure du précurseur des Sp185/333 de *S. purpuratus* **27**

Figure 6. Structure et diversification des Dscam de Diptères et de Crustacés **29**

Figure 7. Représentation schématique de la structure du précurseur des FREPs de *B. glabrata* **31**

Figure 8. Schéma simplifié des voies de synthèse des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) **35**

Figure 9. Réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la peroxyrédoxine (2-Cys Prx) **38**

Figure 10. Cycle de vie de *Schistosoma mansoni* **41**

Figure 11. Propriétés de la liaison thioester **104**

Figure 12. Représentation schématique du rôle des différents composants du complexe immun dans le cas d'une interaction incompatible et compatible **108**

Figure 13. Histoire évolutive de *S. mansoni* et de ses hôtes intermédiaires du genre *Biomphalaria* **117**

Figure 14. Histoire co-évolutive de l'interaction *Biomphalaria sp./S. mansoni* et bases moléculaires du polymorphisme de compatibilité **119**

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'intègre dans un projet sur l'étude de la compatibilité dans les interactions hôte-parasite, et plus particulièrement dans l'interaction entre le mollusque *Biomphalaria glabrata* et le trématode *Schistosoma mansoni*. Un parasite est un organisme qui vit aux dépens d'un autre être vivant, l'hôte, qui constitue un véritable milieu biologique : habitat protégé, couveuse ou nursery, moyen de transport et source d'énergie. L'association est obligatoire et seul le parasite en tire avantage pendant tout ou partie de son cycle de vie. Durant cette association, l'hôte et le parasite s'influencent réciproquement sans que l'existence de l'un ou de l'autre soit en règle générale menacée, et un équilibre dynamique s'établit entre eux (Cassier *et al.* 1998).

L'interaction hôte-parasite est qualifiée d'interaction durable (Combes 1995) cela veut dire que l'hôte et le parasite sont en interaction sur de longues périodes et que le parasite pour survivre et se développer chez son hôte influence celui-ci et réciproquement. Ces pressions sélectives réciproques conduisent les deux protagonistes à acquérir sans cesse de nouvelles adaptations afin ne pas être distancé par l'autre. C'est ce qu'on appelle la co-évolution de l'hôte et du parasite. En effet les parasites sont responsables d'un certain nombre d'effets délétères sur leurs hôtes (pathologie, coût énergétique, modifications physiologiques et comportementales …). Ainsi, les parasites représentent une des forces sélectives principales de l'évolution des hôtes (Howard 1991). Réciproquement, les hôtes doivent éviter le parasite ou l'éliminer afin de réduire ces effets délétères. Dans ce contexte, le système immunitaire de l'hôte représente une pression de sélection forte qui fait de l'hôte un environnement hostile pour le parasite. Ainsi, le parasite doit évoluer et s'adapter en permanence afin de contourner les mécanismes de reconnaissance et les mécanismes effecteurs de l'immunité de l'hôte (Combes 2000; Mackinnon & Read 2004; Maizels 2009).

Ces adaptations et contre-adaptations sont donc le résultat d'une véritable course aux armements à laquelle se livrent l'hôte et le parasite et dans laquelle le maintien de la diversité génétique en tant que générateur de polymorphisme phénotypique va jouer un rôle clé (Haldane 1949; May & Anderson 1983; Berenos *et al.* 2010). Cette coévolution réciproque et antagoniste est l'illustration de l'hypothèse théorique de la Reine Rouge (Van Valen 1974) appliquée au système hôte-parasite. Elle implique en effet le maintien de la diversité

génétique des organismes en interaction et sous-tendrait un certain nombre de processus biologiques tels que la recombinaison génétique (Salathe *et al.* 2009), le maintien de la reproduction sexuée (Lively 2001), l'extraordinaire diversité des gènes associés aux fonctions immunitaires (Salathe *et al.* 2008), ainsi que le phénomène d'adaptation locale observé dans le cadre d'interaction proie-prédateur ou hôte-parasite (Gandon 2002).

La course aux armements qui a lieu entre les deux protagonistes joue donc à différents niveaux et ce aussi bien sur les mécanismes de reconnaissance de l'hôte et les molécules support de cette reconnaissance chez le parasite, que sur les mécanismes effecteurs de l'immunité de l'hôte et de modulation ou contournement de cette immunité chez le parasite.

En ce qui concerne la reconnaissance, il est prédit un haut niveau de diversité et/ou de polymorphisme des molécules impliquées. Ce phénomène est bien connu dans le cas des interactions entre hôtes vertébrés et parasites. Dans ce cas, le système immunitaire adaptatif des Vertébrés représente un système particulièrement abouti puisqu'il est capable de générer aléatoirement et somatiquement un vaste répertoire de récepteurs immunitaires (jusqu'à plusieurs milliards de molécules différentes) capable de reconnaître l'ensemble des antigènes susceptibles de se présenter à un organisme. C'est le cas par exemple des récepteurs des cellules B et T des Gnathostomes ou encore des protéines de la famille des Leucine Rich repeats (LRR) des Agnathes (Variable Lymphocyte Receptor (VLR)) (Du Pasquier 2005). Parallèlement, les parasites qui interagissent avec ces hôtes vertébrés sont capables également de générer des antigènes de surface diversifiés et/ou polymorphes pour contrecarrer la réponse adaptative de l'hôte. Cette stratégie de variation/polymorphisme antigénique existe chez les virus et les bactéries, mais elle est prédominante chez les parasites eucaryotes comme *Plasmodium falciparum* par l'intermédiaire des « *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 » (PfEMP1) ou bien chez *Trypanosoma brucei* avec les « Variant Surface Glycoprotein » (VSG) (Lopez-Rubio *et al.* 2007).

Dans le cas des interactions entre hôte invertébré et parasite, la vision qui prévalait était celle d'un système peu spécifique, basé uniquement sur un nombre limité de récepteurs (Pattern Recognition Receptors ou PRR) codés par la lignée germinale et capables de reconnaître un nombre limité de motifs moléculaires spécifiques des pathogènes (Pathogen-Associated Molecular Patterns ou PAMPs). Cependant, des travaux récents ont mis en évidence chez différentes espèces d'invertébrés l'existence de molécules diversifiées et/ou polymorphes, très variables d'un individu à l'autre, et potentiellement impliquées dans la reconnaissance immunitaire telles que les « Scavenger Receptor Cysteine-Rich » (SRCR) chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, les « Down syndrome cell adhesion molecule » (Dscam) chez

les diptères *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, et le crustacé *Daphnia magna*, les « Variable Chitin-Binding Protein » (VCBP) chez l'amphioxus *Branchiostoma floridae*, ou bien encore les « Fibrinogen-Related Protein » (FREP) du gastéropode *B. glabrata*. Ces résultats suggèrent l'existence d'un répertoire individuel de récepteurs immunitaires diversifiés et/ou polymorphes chez des Invertébrés, constituant ainsi les prémices d'un système adaptatif, bien que jusqu'à présent aucune interaction entre ces récepteurs potentiels et des antigènes parasitaires n'ait été mise en évidence.

La course aux armements entre hôtes et parasites joue également sur les effecteurs de la réponse immunitaire de l'hôte. Les mécanismes immunitaires effecteurs des Invertébrés incluent la phagocytose ou l'encapsulation, la coagulation de l'hémolymphe, la synthèse de cytokines, de peptides antimicrobiens ou encore la production d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) ou de l'azote (Reactive Nitrogen Species, RNS) (Nappi *et al.* 2009). Dans le cas de l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni*, les hémocytes du mollusque (cellules immunitaires circulantes) adhèrent au parasite et l'encapsulent en formant des couches concentriques. Les hémocytes sont ensuite capables de produire des RNS et des ROS particulièrement toxiques pour le parasite. Tous les organismes aérobies produisent des dérivés oxygénés qui sont en fait des sous-produits du métabolisme. Ces dérivés oxygénés sont très réactifs et très dangereux pour les cellules en provoquant l'oxydation des composants cellulaires (lipides, protéines et acides nucléiques). Ces organismes disposent donc de systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (« ROS scavengers ») pour détoxifier ces ROS. La production de ROS dans le cadre d'une réponse immunitaire est une voie évolutivement ancienne et partagée par les plantes et les animaux (Nappi *et al.* 2009). Les hémocytes produisent des ROS grâce à l'activité de la NADPH oxydase qui catalyse la transformation de l'oxygène O_2 en anion superoxide $O_2^{\bullet -}$, précurseur des autres ROS : H_2O_2 et $HO^{\bullet}$. La synthèse de RNS est permise par l'activité de la NO Synthase (« Nitric Oxyde Synthase », NOS) qui catalyse l'oxydation de l'arginine pour produire du monoxyde d'azote (NO), ce dernier peut réagir avec $O_2^{\bullet -}$ et produire l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$) très oxydant et qui peut induire la peroxydation des lipides membranaires des parasites. Comme leurs hôtes, les parasites possèdent également des ROS scavengers qui leur permettent non seulement de lutter contre le stress oxydant issu de leur propre métabolisme aérobie mais également contre celui provenant de la réponse de l'hôte. C'est donc à cet autre niveau que peut jouer la course aux armements entre les ROS de l'hôte et les ROS scavengers du parasite.

Pour pouvoir étudier cette course aux armements de façon complète, il faut un modèle dans lequel la coévolution est accessible expérimentalement. C'est le cas de l'interaction entre le mollusque *Biomphalaria glabrata* et son parasite trématode *Schistosoma mansoni*. Dans ce modèle, la course aux armements entre le parasite et son hôte s'illustre par un polymorphisme de compatibilité. Ainsi, en populations naturelles, certains couples hôte-parasite sont compatibles, le parasite se développe normalement dans l'hôte, alors que d'autres sont incompatibles, le parasite est immédiatement reconnu, encapsulé par les hémocytes et éliminé. Ce polymorphisme de compatibilité a permis la sélection de souches de parasites compatible et incompatible vis-à-vis de la même souche de mollusque.

Au cours de ce travail de thèse, il a donc été possible d'étudier la course aux armements entre un parasite et son hôte invertébré tant au niveau des mécanismes de reconnaissance que des effecteurs immunitaires. Ce travail a permis (1) l'identification des déterminants moléculaires du parasite clé dans l'interaction avec l'hôte invertébré, les antigènes hautement polymorphes (*Sm*PoMucs) (Partie 1, publication n°1) ; (2) la mise en évidence de l'interaction entre les antigènes polymorphes du parasite (*Sm*PoMucs) et des récepteurs immunitaires diversifiés de l'hôte invertébré (FREPs) (Partie 1, publication n°2) ; (3) la mise en évidence de l'importance des ROS dans le succès d'infestation du parasite et d'une concordance phénotypique entre les capacités oxydantes de l'hôte et les capacités anti-oxydantes du parasite (Partie 2, publications n° 3 et 4).

1. Reconnaissance immunitaire et diversification : des Vertébrés aux Invertébrés

Depuis des décennies, il est admis que l'immunité des Invertébrés est basée uniquement sur une réponse innée peu spécifique, non-adaptative et qui implique des récepteurs codés en nombre limité dans la lignée germinale. L'immunité adaptative basée sur un polymorphisme et/ou une diversification des récepteurs immunitaires serait, elle, propre aux Vertébrés. Pourtant, des études récentes menées sur diverses espèces d'Invertébrés mettent à mal ce paradigme et suggèrent l'existence d'un répertoire individuel de récepteurs immunitaires diversifiés, à la manière de ce qui existe chez les Vertébrés.

1.1 Polymorphisme et diversification des récepteurs immunitaires des Vertébrés

Le système immunitaire des Vertébrés possède deux composantes, une composante innée et une composante adaptative. La composante innée (également présente chez les Invertébrés) constitue une première ligne de défense contre les pathogènes, elle repose sur un nombre très limité de récepteurs appelés PRR pour «Pattern Recognition Receptors» qui reconnaissent des motifs moléculaires très conservés et typiques des pathogènes nommés PAMP pour «Pathogen Associated Molecular Patterns» (cet aspect de la réponse des Vertébrés ne sera pas détaillé ici). La composante adaptative (ou spécifique) permet une reconnaissance spécifique du pathogène et donc la mise en place d'une réponse ciblée. Cette composante spécifique repose sur un large répertoire de molécules hautement polymorphes et/ou diversifiées qui confère aux individus une grande capacité de reconnaissance des pathogènes.

1.1.1 Les Gnathostomes

Les molécules de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) représentent les récepteurs immunitaires majeurs des Vertébrés. Leur grande variabilité est le résultat soit d'un

polymorphisme génétique s'exprimant au niveau de la population (cas du complexe majeur d'histocompatibilité) ou bien de mécanismes générateurs de diversité s'exprimant à l'échelle de l'individu tels que des recombinaisons ou des hypermutations somatiques comme dans le cas des récepteurs des cellules T (« T Cell Receptor » ou TCR) et les récepteurs des cellules B (« B Cell Receptors » ou BCR).

a) Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

Le CMH est un complexe de gènes qui codent des glycoprotéines transmembranaires capables de lier des peptides issus de la fragmentation d'antigènes du non-soi et de les transporter jusqu'à la surface de la cellule présentatrice des antigènes. Ceci permet la présentation des antigènes aux lymphocytes T qui seront alors activés pour combattre l'infection. Ce complexe est présent chez tous les Gnathostomes, bien que son organisation puisse être différente entre les espèces (Flajnik & Kasahara 2001). Chez l'homme, le CMH est une région d'environ 4 Mpb située sur le bras court du chromosome 6 (locus 6p21.3) et comptant 260 gènes étroitement liés et organisés en clusters, ce qui en fait une des régions du génome où la densité de gènes est la plus élevée (environ 1 gène pour 15 kbp) (Trowsdale 2001; Kelley *et al.* 2005). Les glycoprotéines transmembranaires présentatrices d'antigènes codées par les gènes du CMH sont réparties en 2 classes : les classes I et II. Les protéines de classe I (CMH-I) sont exprimées par toutes les cellules nucléées somatiques. Elles se lient aux peptides issus de la dégradation des protéines synthétisées par la cellule et/ou présentes dans le cytosol. Le complexe CMH-I-peptide ainsi formé est ensuite exposé à la surface de la cellule et présenté aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques qui lysent les cellules infectées présentant des peptides du non-soi. Les protéines de classe II (CMH-II) ne sont exprimées que par les cellules présentatrices d'antigènes du système immunitaire, telles que les macrophages, les cellules dendritiques ou les lymphocytes B (Bernatchez & Landry 2003). Les peptides associés au CMH-II proviennent de la dégradation de protéines extracellulaires internalisées par endocytose ou phagocytose. Le complexe CMH-II-peptide est présenté aux lymphocytes T CD4 qui s'engagent alors dans une coopération avec les lymphocytes B pour la production d'anticorps (Janeway *et al.* 2001).

La capacité des molécules CMH-I et CMH-II de lier une grande variété de peptides antigéniques résulte de leur grande diversité. Cette diversité est la résultante d'une polygénie associée à une polyallélie. En effet chaque classe du CMH contient de nombreux gènes, chaque individu dispose par conséquent de nombreuses molécules du CMH différentes qui

augmentent le potentiel de liaison aux peptides antigéniques. A cette polygénie se superpose une polyallélie, il existe un très grand nombre d'allèles pour chacun des gènes de classe I ou II du CMH, parfois même plusieurs centaines. Le maintien de ce polymorphisme est le résultat des pressions de sélection exercées par les pathogènes sur leurs hôtes (Bernatchez & Landry 2003).

La polygénie du CMH est due à des évènements de duplication répétés. Les gènes du CMH semblent évoluer selon le modèle de « birth and death », de nouveaux gènes (dits paralogues) sont créés par duplication des gènes préexistants, puis le gène original et son paralogue évoluent indépendamment l'un de l'autre et divergent. Le nouveau gène peut alors, soit devenir un pseudogène (perte de fonction), soit partager la fonction avec le gène dont il est issu (complémentation fonctionnelle entre les deux paralogues), soit enfin acquérir une nouvelle fonction (néo-fonctionnalisation) (Nei & Rooney 2005). Souvent les gènes sont dupliqués en cis et reste donc localisés à proximité le long du chromosome en formant des clusters.

Dans cette course aux armements, disposer d'un répertoire génique étendu est un avantage pour l'hôte car il augmente ainsi sa capacité de reconnaissance (Trowsdale & Parham 2004). Cependant, même si la pression imposée par les pathogènes entraîne l'évolution des hôtes vers une capacité de reconnaissance toujours plus grande, le nombre de gènes ne peut pas être augmenté de manière illimité car cela risquerait de surcharger le génome et de poser des problèmes de contrôle de l'expression de ces gènes. Une solution pour étendre le répertoire de récepteurs, et donc augmenter la capacité de reconnaissance au sein de la population d'hôte sans augmenter le nombre de gènes, consiste à superposer du polymorphisme à la polygénie (Du Pasquier 2006). Les *loci* du CMH ont le plus haut niveau de polymorphisme pour des *loci* codant. Par exemple, chez l'homme les 3 *loci* de classe I les plus variables *HLA-A*, *HLA-B*, et *HLA-C* possèdent 616, 913, et 446 allèles respectivement (Gaudieri *et al.* 2000; Robinson *et al.* 2003; Marsh *et al.* 2010). Deux processus sont responsables de ce haut niveau de polymorphisme, d'une part des recombinaisons fréquentes et d'autre part la sélection balancée (« balancing selection »). Les échanges génétiques par recombinaison à la fois inter- et intralocus permettent la genèse de nouveaux allèles au cours de l'ontogenèse des cellules germinales, de tels échanges génétiques ont lieu par exemple au niveau des gènes *HLA-A*, *B*, et *C* (Parham *et al.* 1988). Ces recombinaisons peuvent aussi concerner les pseudogènes qui peuvent alors être considérés comme des « réservoirs » de séquences et participer à la création de nouveaux allèles (Doxiadis *et al.* 2006). Ces *loci* polymorphes sont soumis à une sélection positive qui favorise les mutations non synonymes, source de nouveaux allèles, et donc de

polymorphisme. En effet, un excès de mutations non synonymes est détecté au niveau des codons qui codent les acides aminés présents dans le domaine impliquée dans la liaison au peptide antigénique (Bernatchez & Landry 2003).

La polygénie du CMH associée à une grande polyallélie permet de générer une très grande variété de récepteurs au sein d'une population, chaque individu ayant une capacité de reconnaissance différente due aux multiples combinaisons d'allèles possibles. Ce polymorphisme peut évoluer au cours du temps du fait des mutations et des évènements de recombinaison, fournissant ainsi à la population une certaine flexibilité dans sa capacité de reconnaissance de pathogènes qui sont eux-mêmes variables (Du Pasquier 2005). Cependant si cette stratégie alliant polygénie et polyallélie s'avère efficace au niveau populationnnel, elle n'est pas idéale pour assurer une protection immunitaire au niveau individuel. Une autre solution a été sélectionnée pour générer un répertoire de molécules de reconnaissance permettant à chaque individu de s'adapter aux pathogènes qu'il peut rencontrer au cours de sa vie.

b) Les récepteurs des antigènes du système adaptatif : diversification des immunoglobulines (Ig) et des récepteurs des lymphocytes T.

Cette autre solution pour accroître le nombre de récepteurs immunitaires sans accroître le nombre de gènes est de produire un nombre de récepteurs très supérieur au nombre de gènes hérités par diversification somatique et assemblage combinatoire de segments de gènes codant les récepteurs immuns (Du Pasquier 2009). C'est cette stratégie qui a été retenue en ce qui concerne les immunoglobulines (anticorps ou récepteurs des cellules B) et les récepteurs des cellules T (TCR). L'immunité adaptative des Vertébrés s'appuie sur la sélection clonale de lymphocytes B et T portant des récepteurs spécifiques des épitopes du pathogène. Après activation, ces lymphocytes prolifèrent et se différencient en cellules effectrices pour éliminer le pathogène. Ces cellules sont unipotentielles, c'est-à-dire que chaque cellule ne porte qu'un seul variant récepteur d'antigène. C'est un mécanisme complexe qui permet la formation de ce répertoire individuel de récepteurs hautement diversifiés (10^{12} récepteurs différents par individu) permettant ainsi au système immunitaire de reconnaître l'ensemble des épitopes des pathogènes susceptibles d'être confrontés à un individu. Ces récepteurs ne sont pas les produits de gènes complets présents dans la lignée germinale et hérités ; ils sont générés de manière somatique suite au réarrangement d'un ensemble de segments géniques séparés dans le génome (Cooper & Alder 2006). Ainsi,

chaque individu naît avec un « do-it-yourself kit » qui est mis en œuvre au cours de la différenciation des lymphocytes pour que chacun puisse exprimer un récepteur immun spécifique à sa surface (Du Pasquier 2001).

- *Réarrangements somatiques*

Les immunoglobulines (Ig ou anticorps ou BCR) sont exprimées en surface des cellules B matures et des cellules B mémoires ou sont sécrétées par les plasmocytes (cellules B différenciées sécrétant les Ig). Les Ig se composent de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes identiques (H) associées à deux chaînes légères identiques (soit kappa κ, soit lambda λ). Les gènes codant les chaînes H, κ et λ sont localisés sur trois *loci* (chez l'homme sur les chromosomes 14, 2 et 22 respectivement). Les TCR sont exprimés en surface des lymphocytes T, ils sont composés de deux chaînes polypeptidiques soit α et β, soit γ et δ codées par des gènes situés sur quatre *loci* (chez l'homme ces *loci* sont localisés sur deux chromosomes, β et γ sur le chromosome 7, α et δ sur le chromosome 14) (Lefranc 2001).
Au niveau génomique, les *loci* des Ig et des TCR sont organisés de la même manière (Figure 1). De 5' vers 3', il y a une succession de trois clusters de segments géniques : V (variable), D (diversité) et J (jonction) qui codent le domaine variable des Ig ou des TCR. En aval de ces clusters, se trouvent les segments géniques C (Cμ, Cγ, Cε et Cα) qui codent les différents domaines de la partie constante des Ig/TCR. Les *loci* qui codent les chaînes κ, et λ des Ig et les chaînes α et γ des TCR sont dépourvus des segments géniques D (Figure 1) (Gellert 2002).

Pendant la différenciation et la maturation des lymphocytes dans la moelle osseuse, les segments géniques V (D) J sont réarrangés par recombinaison somatique pour former les gènes fonctionnels codant les Ig ou les TCR (Figure 2). Le segment V-J ou V-D-J ainsi formé constitue alors l'exon codant la région variable du récepteur. Il est ensuite transcrit et lors de l'épissage de l'ARN pré-messager, l'exon de la partie variable est lié à ceux codant la partie constante. Ce processus appelé recombinaison V(D)J est à l'origine du premier niveau de diversité des Ig et TCR, c'est la diversité combinatoire. Les nombreux segments géniques V, D, J permettent de générer un grand nombre de combinaisons différentes qui conduisent à une grande diversité de récepteurs. Par exemple chez l'homme, le locus codant le domaine variable de la chaîne lourde des Ig compte 65 segments V, 27 segments D et 6 segments J ce qui permet de générer 10 530 chaînes H différentes (Janeway *et al.* 2001).

Ce réarrangement génomique est dû à l'action des enzymes RAG1 et RAG2 qui sont des recombinases. Les réarrangements somatiques exigent la présence de séquences signaux, les Recombination Signal Sequence (RSS). Elles sont localisées à l'extrémité 3' des segments V, à l'extrémité 5' des segments J et de part et d'autre des segments D. Elles sont constituées de deux motifs hautement conservés, un heptamère palindromique et un nonamère riche en A et T, séparés par un espaceur de 12 ou 23 nucléotides non conservés. Ces signaux de recombinaison sont reconnus par RAG1 et RAG2 qui se lient au niveau des espaceurs 12 et 23 des RSS. Les protéines RAG se rapprochent et s'associent pour former le complexe recombinase. Ce dernier clivera ensuite l'ADN entre le segment codant et la séquence RSS, laissant libre cependant quelques bases d'ADN qui formeront une structure en épingle à cheveux avec le brin opposé. Ces épingles à cheveux vont être reconnues et clivées aléatoirement par une nucléase. Cette excision de nucléotides est suivie de l'addition de nucléotides par la Terminal deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) formant la région N. Cette addition de nucléotides se fait au hasard et indépendamment de toute matrice. De plus, selon la localisation du site de coupure on peut observer de courts palindromes (1 à 3 nucléotides) formant la région P. Ils résultent de l'ouverture dissymétrique de l'épingle à cheveux. Cette variabilité au niveau du site de jonction constitue un deuxième niveau de diversité, c'est la diversité de jonction (Fugmann *et al.* 2000; Gellert 2002; Jackson *et al.* 2004). Ce phénomène contribue substantiellement à la diversité des récepteurs en augmentant la diversité de la région hypervariable des Ig et des TCR qui impliquée dans la reconnaissance des antigènes.

Une fois synthétisées, les chaînes polypeptidiques sont assemblées pour former le récepteur fonctionnel. Chaque récepteur d'antigène est constitué d'une combinaison de deux types de chaînes (chaînes H et κ ou λ pour les Ig et chaînes α et β ou γ et δ pour les TCR) contenant des régions variables différentes. Cette combinaison de régions variables différentes forme des sites de combinaison antigéniques différents et participent ainsi à la diversité des récepteurs (Gellert 2002; Du Pasquier 2006).

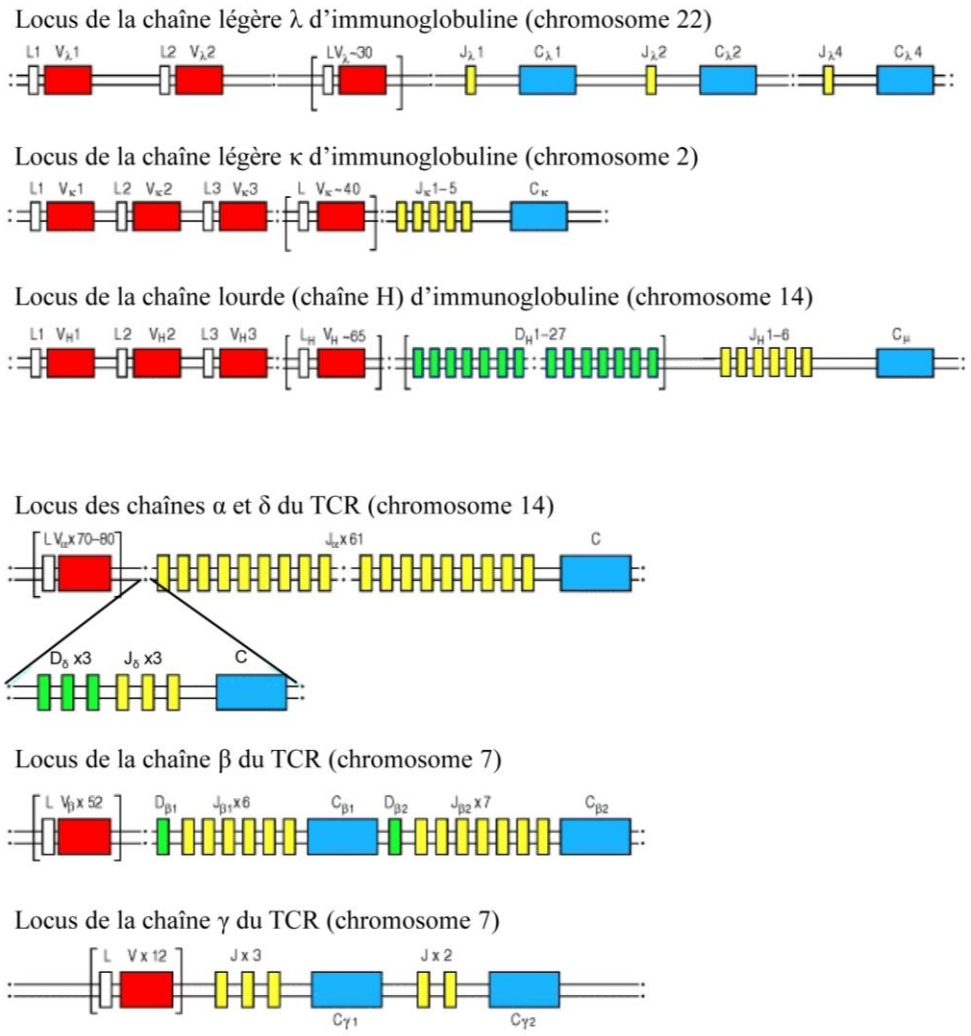


Figure 1. Structure des gènes humains d'immunoglobulines et des TCR dans la lignée germinale (modifié d'après Janeway *et al.* 2001).

Les gènes codant les immunoglobulines et les TCR (récepteur des cellules T) ont une organisation similaire. Ils sont constitués d'une succession de groupes de segments géniques V (rectangles rouges), D (rectangles verts) et J (rectangles jaunes) qui codent les régions variables des Ig et des TCR et de segments géniques C (rectangles bleu) qui codent les régions constantes. En amont de chaque segment V se trouve l'exon L (rectangle blanc) qui code la séquence signal. Le nombre de segments est indiqué sur la figure.

Les *loci* codant les chaînes légères κ et λ des immunoglobulines ne contiennent pas de segments D. Le locus de la chaîne lourde (H) compte 4 segments C_H (Cμ, Cγ, Cε et Cα), cependant par souci de clarté un seul segment (Cμ) est représenté sur la figure.

Le locus TCRδ est situé dans le locus TCRα. Les segments D_δ, J_δ et C_δ sont situés entre les groupe de segments V_α et J_α, alors que les segments V_δ se trouvent parmi les segments V_α. Le nombre de segments V_δ n'est pas connu avec exactitude, il y en aurait au moins quatre. Les *loci* codant les chaînes β et γ des TCR sont organisés de manière similaire, ils contiennent un groupe de segments V et deux clusters de segments D, J, C pour TCRβ et J,C pour TCRγ.

Le schéma n'est pas à l'échelle. Le symbole : indique que les différentes régions ne sont pas contiguës.

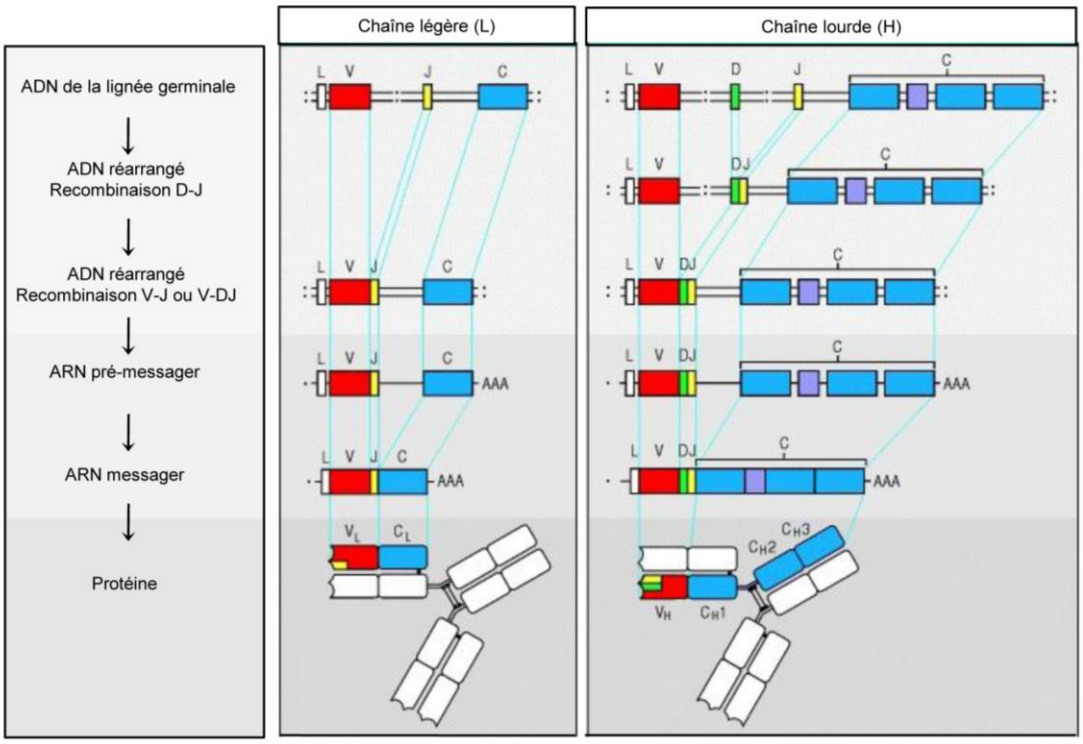


Figure 2. Réarrangement des segments géniques V(D)J et expression des gènes codant les chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines (modifié d'après Janeway *et al.* 2001).

Le gène fonctionnel codant la chaîne légère des immunoglobulines est issu d'un réarrangement par recombinaison somatique des segments géniques V et J. Un des segments géniques J recombine avec un des segments V pour former l'exon codant la partie variable de la chaîne légère. Le gène fonctionnel codant la chaîne légère est alors constitué d'un exon codant la séquence signal (rectangle blanc noté L), de l'exon VJ codant la région variable (V_L) et de l'exon C codant la région constante (C_L). Ce gène est ensuite transcrit en ARN pré-messager qui subit un épissage pour éliminer les séquences introniques. L'ARN messager mâture est enfin traduit.

Le locus codant la chaîne lourde des Ig contient les segments géniques V, D et J. Dans un premier temps, un des segments génique D recombine avec un des segments J. Ensuite, un des segments géniques V recombine avec la séquence recombinée DJ. L'exon VDJ ainsi formé code la partie variable de la chaîne lourde. Le gène codant la chaîne lourde d'Ig est donc consitué par un exon codant la séquence signal, l'exon VDJ codant la partie variable et les exons C codant la partie constante qui comporte 3 domaines notés C_H1, C_H2, C_H3 et une région charnière représentée en violet. Ce gène est ensuite transcrit en ARN pré-messager, les introns sont éliminés au cours de l'épissage pour former un ARN messager mâture.

Les Ig sont constituées de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques reliées par des ponts disulfures. Le site de liaison à l'antigène est constitué par les régions variables des chaînes lourdes et légères.

Le schéma n'est pas à l'échelle. Par souci de clarté un seul segment V, D et J est représenté au niveau de l'ADN des cellules germinales (l'organisation des segments V, D et J dans la lignée germinale est décrite dans la figure 1).

En ce qui concerne les Ig, d'autres mécanismes générateurs de diversité interviennent lors de la réponse immunitaire et augmentent encore la diversité des récepteurs. Lorsque les lymphocytes B naïfs se lient à un antigène ils s'engagent dans une prolifération rapide et forment une structure appelée centre germinatif dans les organes lymphoïdes secondaires. Deux modifications des gènes d'Ig interviennent alors : des hypermutations somatiques (HMS) qui augmentent la diversité de spécificité des Ig et la commutation de classe («class switch recombination» CSR) qui ajoute une diversité fonctionnelle au répertoire d'Ig, chaque classe d'Ig ayant des propriétés particulières.

- *Hypermutations somatiques (HMS)*

Les HMS constituent le mécanisme majeur de génération de la diversité des domaines variables des anticorps. Les HMS consistent à introduire avec une fréquence très élevée des mutations ponctuelles (substitutions nucléotidiques) dans les séquences des gènes réarrangés V-(D)-J et la région codant la partie constante. La fréquence des HMS estimée est de 10^{-3} par base par génération, soit environ 10^{6} fois plus fréquent que les mutations spontanées dans les autres cellules. Les HMS commencent à environ 150 pb en aval du promoteur des gènes V et s'étendent sur une distance de 2 kb. La fréquence des mutations atteint son maximum dans les gènes réarrangés V-J ou V-D-J notamment au niveau des « Complementarity-Determining Region » (CDR) qui sont impliquées dans le contact avec l'antigène (Di Noia & Neuberger 2007). Une seule enzyme est responsable de l'initiation du processus, il s'agit d'une cytidine Deaminase (Activation-Induced Deaminase ou AID). Elle catalyse la déamination de la cytosine (C) en uracile (U) sur un des deux brins de l'ADN, ce qui engendre un mésappariement U:G. Ce mésappariement est reconnu par le système de réparation des mésappariements nucléotidiques («mismatch repair» ou MMR) qui induit l'excision des nucléotides entourant l'uracile, le gap ainsi formé est ensuite réparé par des ADN polymérases de faible fidélité à l'origine de la restitution de la cytosine initiale ou bien à l'origine de transitions ou de transversions (Goodman 2002; Di Noia & Neuberger 2007; Maul *et al.* 2010).

Dans d'autres modèles Vertébrés (poulet et lapin), le mécanisme principal de génération de la diversité des domaines variables des anticorps est la conversion génique, c'est-à-dire l'échange non réciproque d'information entre séquences similaires ou homologues. Le poulet n'a qu'un seul exemplaire fonctionnel des gènes V de la chaîne lourde (V_H) et de la chaîne légère (V_L), mais il possède une centaine de pseudogènes (notés ΨV_H et

ΨV_L). De courtes séquences d'un pseudogène servent de matrice pour remplacer les séquences correspondantes du gène V fonctionnel et réarrangé. Cette diversification a lieu avant la stimulation par l'antigène (Reynaud *et al.* 1994; Weill *et al.* 2004). La même stratégie de diversification du répertoire est retrouvée chez le lapin (Knight & Barrington 1998).

- *Commutation de classe*

Les lymphocytes B produisent 5 classes d'Ig (IgM, IgG, IgD, IgA, IgE). Les lymphocytes B issus de la moelle osseuse expriment seulement des IgM à leur surface qui ont subit la recombinaison V(D)J. Suite à une stimulation antigénique, les cellules B passent d'une production d'IgM à la synthèse d'IgG, IgD, IgA, IgE. Ce sont les segments géniques codant les chaînes lourdes qui déterminent les classes d'anticorps. C'est le processus de commutation de classe (« class switch recombination » CSR) qui permet de changer la région constante de la chaîne lourde tout en maintenant l'expression de la même spécificité anticorps. Le remplacement du segment génique Cμ par un des trois autres segments (Cγ, Cε ou Cα) codant la région constante s'effectue par recombinaison somatique. Chaque segment Cμ, Cγ, Cε et Cα possède en 5' une séquence particulière appelée séquence de commutation S (« Switch region »). Ces séquences ont une longueur d'environ 2kb et sont composées de 20 à 80 bases répétées en tandem. La commutation de classe est dépendante de l'AID selon un processus similaire à l'HMS. C'est AID qui va générer une lésion de l'ADN (via le mésappariement U:G) au niveau des séquences S du segment Cμ et de l'un des trois autres segments (Cγ, Cε et Cα). Cette cassure du double brin de l'ADN permet la recombinaison entre les deux séquences S et conduit au rapprochement d'un des trois segments Cγ, Cε et Cα avec le segment V(D)J et à la délétion des autres segments C (Honjo *et al.* 2002; Chaudhuri *et al.* 2007; Di Noia & Neuberger 2007). Cette commutation de classe permet d'ajouter une diversité fonctionnelle à la diversité de spécificité du répertoire d'Ig. En effet, les différentes classes d'Ig ont des propriétés différentes. Les IgM sécrétées, forment des pentamères et peuvent activer le complément (ensemble de protéines du sérum activées par les anticorps pour détruire les pathogènes). Les IgG sont toujours monomériques, c'est la classe d'anticorps prépondérante dans le sang et les fluides extracellulaires. Elles ont la capacité d'activer le complément et ont également un rôle d'opsonine (elles se lient au pathogène et facilitent son internalisation par les phagocytes). Les IgA sont souvent dimériques et présentes au niveau des muqueuses et dans les sécrétions. Elles ont une faible capacité d'activation du complément et d'opsonisation, elles sont plutôt impliquées dans la liaison au pathogène et sa

neutralisation. Enfin les IgE sont monomériques et principalement responsables de l'activation des mastocytes pour engager les fonctions effectrices (Janeway *et al.* 2001).

Enfin, un autre niveau de diversification des récepteurs d'antigènes a été mis en évidence. Il s'agit d'une diversité conformationnelle. En effet, il a été montré qu'une même structure primaire peut adopter des conformations spatiales différentes correspondant à autant de paratopes différents et capables de lier des antigènes différents. Ces travaux ont ainsi montré qu'un même anticorps peut adopter jusqu'à six structures différentes (James *et al.* 2003).

1.1.2 Les Agnathes : une forme alternative d'immunité adaptative

a) L'immunité adaptative existe-t-elle chez les Agnathes ?

Lamproies et myxines sont aujourd'hui les seuls représentants vivants des Agnathes (souvent qualifiés de « Vertébrés sans mâchoires » bien que les myxines n'appartiennent pas au clade des Vertébrés). Aucun des éléments cardinaux du système adaptatif des Vertébrés (segments V(D)J réarrangeables, RAG1 et RAG2, gènes du CMH) n'avait pu être identifié dans ce groupe situé à la base des Vertébrés. Pourtant il existait un faisceau d'évidences qui laissait supposer l'existence d'une réponse immunitaire de type adaptatif chez ces organismes. En effet, des expériences anciennes avaient montré que suite à une immunisation par des antigènes particulaires et solubles, les lamproies produisent des agglutinines spécifiques apparentées à des anticorps (Marchalonis & Edelman 1968; Hagen *et al.* 1985). De plus, des réactions d'hypersensibilité retardée (allergie) et des rejets d'allogreffes furent également mis en évidence (Finstad & Good 1964). Cependant l'implication de molécules de type immunoglobuline dans ces phénomènes n'avait pas été prouvée et leurs bases moléculaires restaient non élucidées (Litman *et al.* 1970; Herrin & Cooper 2010).

Les réponses furent apportées récemment, ces réponses immunitaires sont dues à des cellules morphologiquement proches des lymphocytes de Gnathostomes et qui partagent certaines caractéristiques avec ceux des mammifères telles qu'une sensibilité accrue aux irradiations, une capacité à proliférer et à s'agréger en réponse à une stimulation antigénique (Mayer *et al.* 2002b; Pancer *et al.* 2004), ainsi que l'expression de facteurs de transcription (PU.1/Spi-B et Ikaros) connus pour être spécifiquement impliqués dans la différenciation des lymphocytes

des Vertébrés (Shintani *et al.* 2000; Mayer *et al.* 2002a). Des travaux récents se sont donc attachés à rechercher la base moléculaire de cette réponse adaptative chez les Agnathes.

b) Un nouveau type de récepteur : les Variable Lymphocytes Receptors (VLR)

L'étude du transcriptome de lymphocytes immunostimulés de Lamproie a conduit à l'identification d'un grand nombre de séquences uniques correspondant à des molécules contenant des répétitions riches en leucine (Leucine-Rich Repeats ou LRR). Ces protéines ont été nommées récepteurs lymphocytaires variables (Variable lymphocytes Receptors ou VLR) car elles sont exprimées principalement ou exclusivement dans les lymphocytes et chaque transcrit code une protéine différente des autres. La structure du précurseur de ces VLR se compose d'un peptide signal conservé, d'un module LRR N-terminal de 27 à 34 résidus (LRRNT), puis d'un nombre variable de différents modules LRR (LRR1, LRRV et LRRVe), d'un peptide de connexion (connecting peptide) suivi d'un module LRR C-terminal (LRRCT) et d'une région C-terminale conservée qui est composée d'un domaine riche en thréonine et en proline, d'une ancre GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) et d'une queue hydrophobe. La région de la molécule qui porte la diversité de séquence correspond aux modules LRR, seuls les 7 premiers acides aminés du module LRRNT et les 20 derniers du module LRRCT sont presque invariables. Ces récepteurs sont présents à la surface des lymphocytes, mais ils peuvent également être sécrétés. Comme les lymphocytes de Gnathostomes, il semble que les lymphocytes d'agnathes soient unipotentiels c'est-à-dire que chaque cellule n'exprime individuellement qu'un seul variant VLR (Pancer *et al.* 2004).

Chez la myxine comme chez la lamproie, il existe deux gènes *VLR* (*VLRA* et *VLRB*), situés sur deux *loci* différents. Cependant, dans la lignée germinale, ces *loci* (notés gVLR) ne permettent pas la synthèse de VLR fonctionnels (Figure 3). Leur structure génomique générale est semblable, même s'il existe de petites différences entre myxines et lamproies (Saha *et al.* 2010). Le locus gVLR comprend quatre exons : l'exon 1 contient une partie du 5'UTR, l'exon 2 contient le reste du 5'UTR, le peptide signal et la moitié 5' du module LRRNT, l'exon 3 contient la moitié 5' du module LRRCT, et l'exon 4 contient la moitié 3' de LRRCT, la partie C-terminale du VLR et le 3'UTR. Une séquence intermédiaire non codante («intervening sequence») sépare les exons 1, 2 et 3 de l'exon 4. Les séquences codant les autres parties des modules LRRNT et LRRCT ainsi que les modules LRR1, LRRV et LRRVe sont absentes de ce locus. En fait, ces séquences sont situées en amont et en aval du gVLR, elles s'organisent en cluster (Rogozin *et al.* 2007). Pendant la différenciation des

lymphocytes, un réarrangement de l'ADN a lieu pour permettre l'insertion des modules manquants dans le locus gVLR pour former le locus mature (mVLR) codant un récepteur fonctionnel unique pour chaque lymphocyte (Figure 3). Le répertoire diversifié et individuel des VLR implique donc une recombinaison somatique (Alder *et al.* 2005).

Les modules LRR qui flanquent le gène sont incorporés de manière séquentielle remplaçant ainsi la séquence intermédiaire par un processus complexe de conversion génique par choix de copie («copy-choice gene conversion») qui semble finement régulé (Nagawa *et al.* 2007). L'assemblage par recombinaison du gène complet fonctionnel peut être initié aux extrémités 5' (LRRNT) ou 3' (LRRCT) et semble être guidé par la présence de courtes séquences homologues (10 à 30 pb). Ces séquences homologues vont permettre tout d'abord la recombinaison entre un module LRRNT ou LRRCT avec un module LRR1 ou LRRVe respectivement. Ensuite des recombinaisons successives, toujours guidées par les courtes séquences homologues, permettent l'insertion des autres modules LRR (Herrin & Cooper 2010). La découverte de gènes codant deux cytosine-deaminases (AID-APOBEC) chez la lamproie suggère que la conversion génique pourrait être initiée par une cassure de l'ADN consécutive au mésappariement U:G au niveau des séquences homologues (Rogozin *et al.* 2007). Ainsi un seul gène *VLR* peut générer une diversité combinatoire comparable à celle des Ig/TCR (10^{14} combinaisons différentes).

Les lamproies ont deux gènes *VLR*, *VLRA* et *VLRB* et les deux sont exprimés dans les lymphocytes qui sont unipotentiels, c'est-à-dire qu'ils n'expriment qu'un seul type (variant) de récepteur. Suite à une stimulation par des antigènes, les lymphocytes exprimant les VLRB spécifiques prolifèrent de façon clonale et sécrètent les VLRB de manière analogue à la sécrétion des Ig par les lymphocytes B (Pancer *et al.* 2004; Alder *et al.* 2005). Les VLRB sécrétés s'associent en paire de tétramères ou en pentamères (comme les IgM) (Herrin & Cooper 2010) ce qui leur permet de lier les antigènes avec une grande spécificité et une grande affinité, ces structures multimériques leur confèrent également des capacités d'agglutination. Les VLRA sont exprimés uniquement en surface des lymphocytes qui présentent des analogies fonctionnelles avec les lymphocytes T de Gnathostomes. Ainsi les lamproies possèdent deux populations de lymphocytes fonctionnellement analogues aux lymphocytes B et T de Gnathostomes (Guo *et al.* 2009).

Les Agnathes possèdent donc bien un système immunitaire adaptatif qui partage les principales caractéristiques du système adaptatif des Gnathostomes, même si les acteurs moléculaires sont de nature différente. Les deux systèmes reposent sur un vaste répertoire de récepteurs diversifiés, générés de manière somatique par des processus de recombinaison à

partir de segments géniques présents dans la lignée germinale et assemblés de manière unique dans chaque lymphocyte conférant à chacun une spécificité de reconnaissance propre.

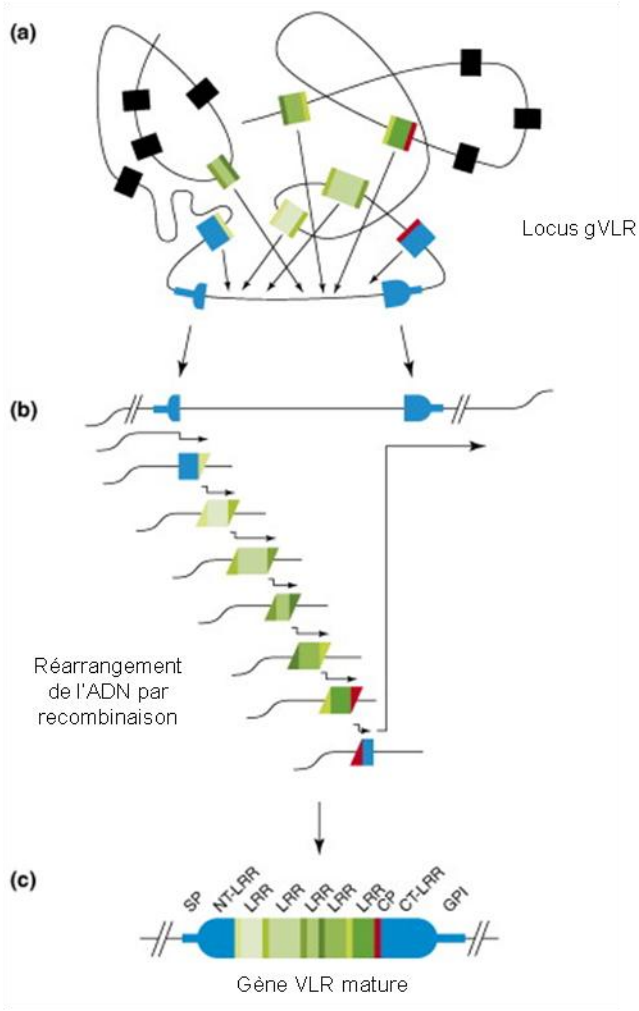


Figure 3. Représentation schématique du réarrangement de l'ADN conduisant à la formation d'un gène VLR (« Variable Lymphocyte Receptor ») fonctionnel chez la lamproie (modifié d'après Litman *et al.*, 2007).

(a) Les gènes VLR de la lignée germinale (gVLR) sont incomplets et ne permettent pas la synthèse de VLR fonctionnels. Le locus gVLR ne contient que les exons codant les régions N-terminale et C-terminale des VLR (en bleu), séparés par une région non codante. Les séquences codant les modules LRR (« Leucine-Rich Repeat ») différents (en vert et en noir), sont regroupées en clusters situés en amont et en aval de gVLR. (b) Lors de la différenciation des lymphocytes, le réarrangement de l'ADN par recombinaison va permettre l'insertion d'un nombre variable de modules LRR dans le gène gVLR pour former un gène mature (mVLR). (c) Chaque lymphocyte possède alors un gène mVLR qui code un récepteur portant une région variable unique.

NT-LRR : module LRR N-terminal ; CT-LRR : module LRR C-terminal ; CP : peptide de connexion ; SP : peptide signal ; GPI : glycosyl-phosphatidyl-inositol.

1.2 Polymorphisme et diversification des récepteurs immunitaires chez les Invertébrés

Traditionnellement, l'immunité adaptative est considérée comme l'apanage des seuls Vertébrés, l'immunité des Invertébrés s'appuyant exclusivement sur des mécanismes immunitaires innés. Pourtant les Invertébrés comme les Vertébrés sont soumis à des spectres de pathogènes tout aussi larges (virus, bactéries, champignons, parasites eucaryotes protozoaires et métazoaires). Les pressions de sélection exercées par les pathogènes sur les invertébrés sont donc comparables à celles exercées sur les Vertébrés (Loker *et al.* 2004). Par conséquent, les Invertébrés sont engagés dans une course aux armements avec leurs pathogènes comparable à celle qui a lieu dans les interactions Vertébrés/pathogènes et selon les hypothèses théoriques, ces contraintes co-évolutives devraient générer du polymorphisme et/ou de la diversification des molécules clés au cœur de l'interaction. L'immunité adaptative reposant sur l'existence d'un répertoire individuel de récepteurs immunitaires hautement diversifiés qui reconnaissent spécifiquement le pathogène, l'affirmation selon laquelle les Invertébrés sont dépourvus de réponse adaptative provient du défaut d'identification chez ces organismes des mécanismes moléculaires essentiels de cette réponse (Ig, TCR, RAG). Toutefois cette conception est fragilisée depuis une dizaine d'années par des travaux menés sur différentes espèces d'Invertébrés, travaux qui ont mis en évidence des molécules de nature variée potentiellement impliquées dans la reconnaissance immunitaire et présentant de haut degré de diversification générée selon différentes modalités.

1.2.1 La conception traditionnelle de l'immunité des Invertébrés : le «paradigme de Medzhitov et Janeway» et ses limites

L'article de Ruslan Medzhitov et Charles Janeway publié en 1997 dans la revue Cell pose le paradigme selon lequel l'immunité des Invertébrés repose uniquement sur l'immunité innée et que celle-ci est basée sur un nombre limité de PRR codés dans la lignée germinale, qui ne reconnnaissent que des structures moléculaires invariables spécifiques des pathogènes, les PAMPs (Medzhitov & Janeway 1997). Ces PAMPs sont absents chez l'hôte et permettent aux Invertébrés de distinguer le soi du non-soi, par exemple les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif ou bien les peptidoglycanes des

bactéries à Gram positif constituent des PAMPs. En effet, chacune de ces molécules est partagée par un grand nombre de bactéries et leur structure est conservée permettant ainsi leur reconnaissance par un nombre limité de récepteurs.

L'argument majeur pour expliquer l'absence d'immunité spécifique chez les Invertébrés repose sur les différences de stratégie de sélection r ou K entre Vertébrés et Invertébrés. En général les espèces de Vertébrés se caractérisent par une stratégie de sélection K c'est-à-dire basée sur une durée de vie longue, une reproduction tardive et un nombre limité de descendants, au contraire les espèces d'Invertébrés ont plutôt une stratégie r basée sur une durée de vie courte, une reproduction précoce et une fertilité importante. Dans ce contexte, la stratégie K favoriserait l'établissement d'une immunité adaptative plus favorable à l'allongement de la durée de vie et à la survie après des rencontres multiples avec des pathogènes. Au contraire, pour des espèces à stratégie r, (donc à durée de vie courte) une immunité adaptative ne serait pas nécessaire (Medzhitov & Janeway 1997; Bowden *et al.* 2007).

Cependant, les stratégies r et K ne distinguent pas aussi nettement Invertébrés et Vertébrés. En effet, les deux stratégies sont présentes dans les deux taxons. Chez les Invertébrés comme chez certains bivalves, certains gastéropodes ou encore certains crustacés décapodes des durées de vie très longues ont été observées de l'ordre de plusieurs décennies voire dans certains cas une centaine d'années, dans ce cas ces organismes ont clairement une stratégie K (Powell & Cummins 1985). Réciproquement, certains Gnathostomes ont une durée de vie très courte et une forte fécondité (Depczynski & Bellwood 2005). De plus, beaucoup d'Invertébrés occupent des niches qui les exposent à un large spectre de pathogènes (comme par exemple certains arthropodes qui vivent et/ou se nourrissent de matières en décomposition) ou bien sont organisés en sociétés comptant une grande densité d'individus (comme les termites ou les fourmis) ce qui favorise la transmission des infections et des pathogènes au sein des populations (Bowden *et al.* 2007). Des travaux réalisés cette dernière décennie suggèrent que certains insectes seraient capables de mettre en place une réponse spécifique et suggèrent même l'existence probable d'une mémoire immunitaire (Kurtz & Franz 2003; Schmid-Hempel & Ebert 2003; Kurtz 2005; Sadd & Schmid-Hempel 2006; Pham *et al.* 2007). Par exemple, le bourdon *Bombus terrestris* développe une réponse dont la spécificité permet de différencier deux espèces de bactéries appartenant au même genre *Paenibacillus alvei* et *Paenibacillus larvae* (Sadd & Schmid-Hempel 2006). Des travaux récents ont reconsidéré la question de l'immunité spécifique des Invertébrés d'un point de vue évolutif et montrent que malgré une stratégie r, l'acquisition d'une immunité spécifique

constituerait bien un avantage sélectif pour ces organismes (Rolff & Siva-Jothy 2003; Little *et al.* 2005; Schulenburg *et al.* 2007). Enfin, des molécules hypervariables potentiellement impliquées dans la reconnaissance immunitaire ont été récemment mises en évidence dans différentes espèces d'invertébrés et pourraient constituer la base moléculaire de cette immunité spécifique.

1.2.2 Molécules hypervariables et réponse immunitaire chez les Invertébrés

Une immunité basée uniquement sur une réponse innée et non spécifique ne permet pas « d'expliquer » que les Invertébrés soient capables de répondre à la grande diversité de pathogènes à laquelle ils sont confrontés. En effet, leur capacité codante via leur génome semble insuffisante pour générer les récepteurs nécessaires à la reconnaissance de tous les pathogènes qui les menacent (Hauton & Smith 2007). C'est dans ce contexte, que des molécules qui pourraient jouer un rôle de récepteurs immunitaires diversifiés ont été recherchées et mises en évidence chez divers Invertébrés. Il s'agit des Variable Chitin-Binding Protein (VCBP) chez l'amphioxus *Branchiostoma floridae* (Cannon *et al.* 2002), des Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) et les protéines Sp185/333 chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Pancer 2000), des Down's syndrome cell adhesion molecule (Dscam) chez les diptères *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, et les crustacés *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, et *Litopenaeus vannamei* (Watson *et al.* 2005; Dong *et al.* 2006; Brites *et al.* 2008; Chou *et al.* 2009), ou bien encore des Fibrinogen-Related Protein (FREP) du gastéropode *B. glabrata* (Zhang *et al.* 2004).

a) Les Variable Chitin-Binding Protein (VCBP)

L'amphioxus (*Branchiostoma floridae*) est un Céphalochordé (Invertébré Deutérostomien) qui exprime des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines (IgSF) : les Variable Chitin-Binding Protein (VCBP). La structure du précurseur de ces molécules est composée d'un peptide signal, de deux domaines de type immunoglobuline apparenté au domaine V (domaine variable des Ig, IgV-like) disposés en tandem et d'un domaine liant la chitine (Chitin-binding Domain, CBD). Ces molécules sont réparties en 5 familles (VCBP1 à VCBP5) et codées par une famille multigénique. Elles ne sont exprimées que dans les cellules de l'intestin et sont sécrétées (Cannon *et al.* 2002). Le

domaine V des VCBP présente les caractéristiques communes avec les régions V des autres IgSF (Ig, TCR) notamment la conservation de résidus canoniques (en particulier les cystéines). Ce domaine est extrêmement polymorphe, les différentes familles de VCBP présentent des similarités de séquence limitées et comprise entre 27% et 41% d'identité (séquence protéique). Seuls VCBP2 et VCBP5 présentent des similarités supérieures (78%). Les domaines V de VCBP2 et VCBP5 contiennent une région de 10 à 13 résidus hypervariable tant au niveau de sa taille que de sa composition en acides aminés (Cannon *et al.* 2002; Cannon *et al.* 2004). Ce haut degré de variation résulterait de recombinaisons mais ne serait pas généré de façon somatique. La structure tridimensionnelle de VCBP3 a été obtenue et révèle que cette région hypervariable pourrait être impliquée dans l'interaction avec le ligand reconnu par les VCBP, cependant jusqu'à présent aucun ligand n'a été identifié (Hernandez Prada *et al.* 2006).

La région hypervariable du domaine V de VCBP2 a été analysée au niveau intra- et interindividuel à la fois au niveau génomique et au niveau transcriptionnel (ADNc). Cette analyse montre que chaque individu possède un répertoire unique de VCBP2 codé dans la lignée germinale. En effet, toutes les séquences présentes au niveau des transcrits sont retrouvées au niveau génomique. La variabilité observée au niveau de cette région ne serait donc pas générée de manière somatique (Cannon *et al.* 2004).

L'organisation génomique des *VCBP* est complexe, les gènes codant les VCBP1, 2, 4, et 5 sont situés sur un seul locus et répartis dans deux clusters VCBP1/4 et VCBP2/5. Le gène *VCBP3* est situé sur un autre locus (Dishaw *et al.* 2008). Il existe un polymorphisme haplotypique très important qui repose sur des variations du nombre de copies des gènes et sur des insertions/délétions. La région génomique contenant les *loci* VCBP est riche en séquences répétées inversées favorisant les évènements de recombinaison, de duplication de gènes ou les délétions (Dishaw *et al.* 2008). Cette organisation en cluster et la complexité haplotypique sont à la base du haut degré de polymorphisme des VCBP, par exemple la présence de séquences répétées inversées peut favoriser des évènements de recombinaison (égaux ou inégaux) (Dishaw *et al.* 2010).

La structure et le haut degré de polymorphisme des VCBP suggèrent qu'elles jouent un rôle dans la reconnaissance immunitaire. Les deux domaines portés par ces molécules (IgV-like et CBD) sont susceptibles d'interagir avec des pathogènes et pourraient conférer aux VCBP une dualité fonctionnelle. Le domaine IgV-like serait impliqué dans la reconnaissance spécifique du pathogène. Le domaine CBD se lierait à la N-acétylglucosamine

qui compose la chitine présente chez les bactéries et les champignons, inhibant ainsi leur croissance (Litman *et al.* 2005).

b) Les «Scavenger Receptor Cysteine-Rich» (SRCR)

Les protéines SRCR sont exprimées dans les cœlomocytes (cellules à fonction immunitaire) de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*. Les SRCR constituent une superfamille de protéines présente dans différents groupes de métazoaires (Spongiaires, Nématodes, Echinodermes, Agnathes, Mammifères). Le domaine SRCR est constitué de 110 acides aminés contenant 6 ou 8 cystéines à des positions très conservées et impliquées dans la formation de ponts disulfures intra-chaîne. Chez l'oursin, le domaine SRCR contient 6 cystéines. La plupart des protéines SRCR connues ont une fonction immunitaire et sont impliquées soit dans la reconnaissance soit dans la régulation de la réponse immunitaire. Chez les Mammifères, les macrophages expriment divers récepteurs contenant des domaines SRCR qui sont impliqués dans la régulation de la cascade du complément, la liaison à des lectines ou bien à des bactéries. Chez les Spongiaires, les protéines SRCR semblent avoir une fonction de reconnaissance et peuvent être soit liées aux membranes, soit sécrétées (Pancer *et al.* 1999).

Chez l'oursin, il existe 7 types de SRCR (SpSRCR1, SpSRCR5, SpSRCR6, SpSRCR7.1, SpSRCR7.2, SpSRCR12 et SpSRCR20) qui diffèrent par le nombre de domaines SRCR et la présence d'autres domaines protéiques (Figure 4) (Pancer *et al.* 1999; Pancer 2000). SpSRCR1 et 6 contiennent des domaines VonWillebrand (VWF), connus pour être impliqués notamment dans la migration ou l'adhésion cellulaire (Whittaker & Hynes 2002; Bouchut *et al.* 2005). SpSRCR1 et 12 contiennent un domaine de liaison à la matrice extracellulaire via un motif RGD, ce motif est impliqué dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (Ruoslahti 1996). SpSRCR7.1 et SpSRCR7.2 correspondent à deux formes liées à la membrane plasmique. SpSRCR7.1 contient 3 motifs EGF (Epidermal-Growth Factor) connus pour être impliqués dans l'adhésion cellulaire (Sakamoto *et al.* 2005). SpSRCR7.2 contient une séquence consensus (Short Consensus Repeat, SCR) correspondant au domaine «complement-control protein», ce domaine est présent dans de nombreuses protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (Chou & Heinrikson 1997).

Les SRCR sont codés par une famille multigénique qui compte au moins 150 membres lesquels codent environ 1200 SRCR différents. L'organisation génomique de cette famille multigénique semble complexe avec de nombreux *loci* pour chaque type de SRCR ;

les gènes codant SpSRCR1 seraient organisés en cluster ce qui est une caractéristique des gènes impliqués dans l'immunité (Pancer 2000).

Les 7 types de SRCR sont exprimés constitutivement et uniquement dans les coelomocytes qui sont les cellules effectrices de l'immunité. L'analyse de l'expression des SRCR au niveau individuel révèle que chaque individu exprime un répertoire différent de SRCR. Ce répertoire individuel des transcrits est très variable chez les animaux non immunostimulés, le niveau d'expression des SRCR change de 20 à 30 fois sur une période de 3 mois. Les individus immunostimulés présentent des variations d'expression similaires. Bien qu'aucun profil d'expression spécifique n'ait été mis en évidence, le haut degré de conservation de la région de régulation en 5' des gènes suggère une transcription coordonnée des SRCR (Pancer *et al.* 1999; Pancer 2000).

Les caractéristiques des SRCR tant au niveau protéique qu'au niveau transcriptionnel laissent penser qu'ils jouent un rôle dans l'immunité de l'oursin cependant leur fonction est encore non élucidée.

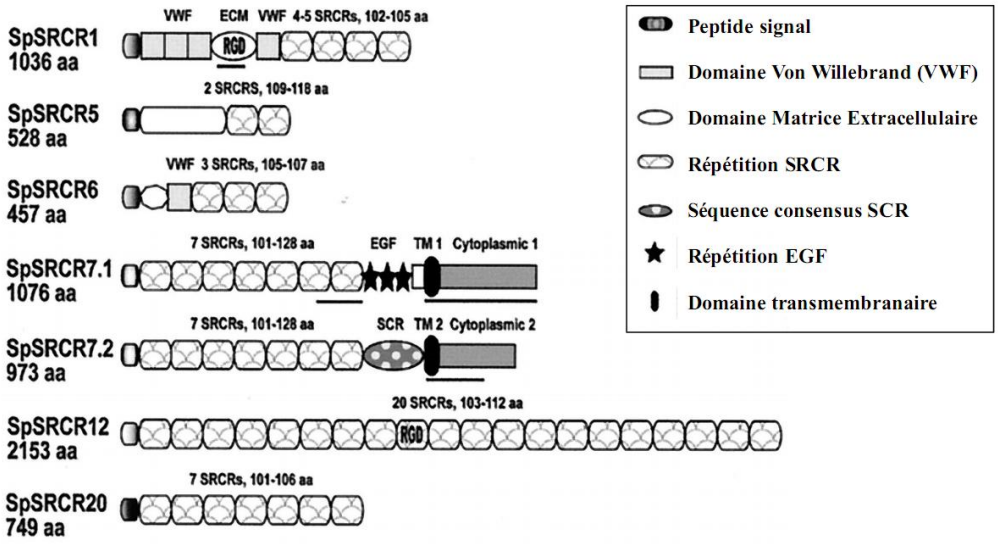


Figure 4. Structure des 7 types de protéines SRCR de *S. purpuratus* (modifié d'après Pancer 2000).
Les SRCR peuvent contenir différents domaines protéiques en plus d'un nombre variable de domaines SRCR (le nombre de répétitions et leur longueur en acides aminés (aa) est indiqué pour chaque SpSRCR). Des domaines de type Von Willebrand (VWF) sont présents dans SpSRCR1 et SpSRCR6. SpSRCR1 et SpSRCR6 contiennent également un motif RGD (Arginine- Glycine- Aspartate). Un domaine de liaison à la matrice extracellulaire (ECM) est présent dans SpSRCR1. SpSRCR7.1 et SpSRCR7.2 contiennent des domaines transmembranaires (TM1 et TM2). Trois domaines de type «Epidermal Growth Factor» (EGF) sont présents dans SpSRCR7.1, alors que SpSRCR7.2 contient une courte séquence consensus («Short Consensus Sequence» ou SCR).

c) Les protéines Sp185/333

Les Sp185/333 sont exprimées dans les cœlomocytes de *Strongylocentrotus purpuratus.* Leurs transcrits représentent 60% des transcrits induits dans ces cellules en réponse à l'injection de LPS dans la cavité cœlomique de l'animal (Nair *et al.* 2005). Ces molécules sont extrêmement diversifiées puisqu'une étude menée sur des ADNc pleine longueur révèle que parmi 81 ADNc identifiés, 67 ADNc correspondent à des séquences nucléotidiques différentes codant 64 protéines différentes (Terwilliger *et al.* 2006). L'ORF des *Sp185/333* est composé d'une séquence signal (leader) en N-terminal du précurseur, suivie de 25 blocs de séquence appelés éléments (Nair *et al.* 2005). La très grande variabilité des *Sp185/333* est basée d'une part sur la présence/absence de certains éléments, ce qui permet de distinguer 22 patrons différents (Figure 5), et d'autre part sur des variations de séquences nucléotidiques de ces éléments résultant de mutations ponctuelles et d'évènements d'insertions/délétions. Il existe deux séquences possibles pour l'élément 11 (sous-éléments 11a et 11b) qui code des séquences en acides aminés très différentes, chaque transcrit contient l'un ou l'autre des éléments mais jamais les deux. La séquence nucléotidique et la longueur de l'élément 15 est très variable ce qui permet de répartir les *Sp185/333* en 7 groupes basés sur la présence/absence et la longueur de l'élément 15 (Figure 5). En raison de mutations ponctuelles, la position du codon stop dans l'élément 25 est variable et définit 3 sous-éléments 25a, 25b et 25c. Le calcul du ratio entre mutations non synonymes et synonymes (dn/ds), révèle un excès de mutations non synonymes pour certains patrons ce qui suggère qu'ils sont soumis à une sélection diversifiante (Terwilliger *et al.* 2006).

Au niveau protéique les précurseurs de Sp185/333 ont tous un peptide signal en partie N-terminale suivi de 3 régions, une région riche en glycine, une région riche en histidine et une région C-terminale (Figure 5). Ces protéines ne contiennent aucune cystéine et seul le peptide signal et une partie de l'élément 7 semblent avoir une structure secondaire. Elles contiennent également de courtes séquences répétées (entre 28 et 8 acides aminés) classées en 5 types. Les répétitions de types 1 sont disposées en tandem dans la région riche en glycine alors que les répétitions de types 2 à 5 sont réparties dans les différentes régions de la protéine. Un motif RGD est présent à la fin de la région riche en glycine (élément 7) suggérant que Sp185/333 pourrait se lier aux intégrines. Des sites de modifications post-traductionnelles sont également prédits, 16 sites de N-glycosylation dans la région riche en histidine et 9 sites de O-glycosylation au niveau de l'élément 25a (Terwilliger *et al.* 2006). La diversité des Sp185/333 rencontrée au niveau transcriptionnel est également présente au

niveau protéique, ainsi il a été montré que certains individus peuvent exprimer jusqu'à 200 protéines Sp185/333 différentes et que chaque individu possède un répertoire particulier. De plus, en réponse à une injection de LPS ou de β-1,3-glucane (composant majeur de la paroi des champignons) non seulement la production de Sp185/333 est augmentée mais il y a un changement dans les patrons majoritaires exprimés (Terwilliger *et al.* 2007) et différents ensembles de Sp185/333 sont exprimés en fonction du stimulus (Brockton *et al.* 2008; Dheilly *et al.* 2009).

Les gènes *Sp185/333* forment une famille multigénique comptant environ 50 à 60 membres qui seraient organisés en cluster. Ces gènes ont une taille comprise entre 1,2 et 2 kb et sont constitués de 2 exons et un intron (400 pb). Le premier exon code la séquence signal (leader) et le second le reste de la protéine. Ces gènes sont très similaires entre eux (similarité de 88%), cependant sur 171 gènes clonés à partir de 3 individus, 71% des séquences sont uniques et les séquences identiques ne sont pas partagées entre les individus, ce qui révèle un polymorphisme individuel et populationnel très élevé (Buckley & Smith 2007). Ce haut degré de polymorphisme serait le résultat de différents *processi* agissant au niveau génomique et transcriptionnel. Au niveau génomique, l'analyse des séquences des différents éléments suggère que des évènements de recombinaison, délétions et des mutations ponctuelles ont lieu à la fois entre les éléments et à l'intérieur de ceux-ci (Buckley *et al.* 2008a). Au niveau transcriptionnel, la comparaison entre la séquence des gènes et celle des ARN messagers correspondant montre que la plupart (73%) des substitutions nucléotidiques sont des transitions (A/G ou C/U), les transitions cytidine vers uridine sont les plus fréquentes ce qui suggère l'intervention d'une cytidine deaminase (AID) (Buckley *et al.* 2008b).

Les études menées chez l'oursin *S. purpuratus* révèlent donc que cet animal possède au moins deux grandes familles de molécules diversifiées : les SRCR et les Sp185/333. Dans les deux cas, la fonction de ces molécules reste à découvrir. Cependant, elles présentent des caractéristiques qui laissent supposer une fonction immunitaire. En effet, leur expression est restreinte aux cellules immunitaires et peut être modulée lors de stimulations immunitaires, de plus elles sont hautement diversifiées et/ou polymorphes.

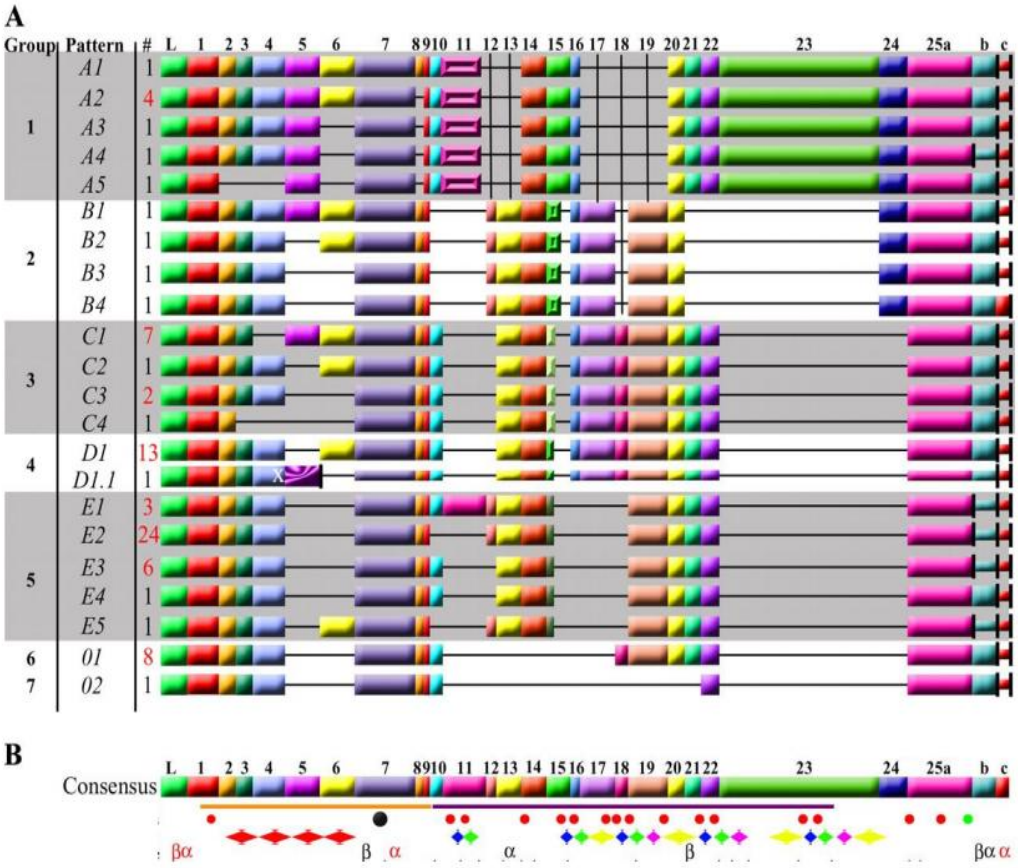


Figure 5. Diversité des transcrits et structure du précurseur des Sp185/333 de *S. purpuratus* (modifié d'après Terwilliger 2006).

A. L'alignement optimal des séquences d'ADNc des Sp185/333 exige l'introduction de gaps (représentés ici par les lignes horizontales), les blocs de séquences séparés par les gaps sont appelés éléments représentés par les rectangles de couleurs et numérotés de 1 à 25. Les ADNc sont organisés en 7 groupes (Group) sur la base de la présence/absence et de la longueur de l'élément 15. La présence/absence des autres éléments permet de définir 22 patrons différents (Pattern), le patron A correspond au groupe 1, le patron B au groupe 2, le patron C au groupe 3, etc. L'élément 25 est subdivisé en 3 sous-éléments (25a, 25b, 25c) en fonction de la position du codon stop (représenté par le trait noir vertical). Un décalage de cadre de lecture (symbolisé par un X blanc) dans l'élément 4 du variant D1.1 conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'élément 5 (noté par un trait noir vertical), les autres éléments sont représentés en plus petit pour montrer qu'ils sont présents dans la séquence mais qu'ils ne sont pas traduits. Certains ADNc du même groupe présentent le même patron, le nombre d'ADNc correspondant à ces ensembles sont indiqué dans la colonne notée #. **B.** Représentation d'une séquence protéique consensus. La région riche en glycine est représentée par un trait orange, et la région riche en histidine par un trait violet. Le motif RGD de l'élément 7, et les sites de N- et O-glycosylations sont indiqués par des points noir, rouges et verts respectivement. La séquence signal (leader) est notée L). Les 5 types de répétitions sont indiqués par les losanges colorés (type 1 = rouge, type 2 = bleu, type 3 = vert, type 4 = violet, et type 5 = jaune). Les structures secondaires (hélices α et feuillets β sont également indiqués).

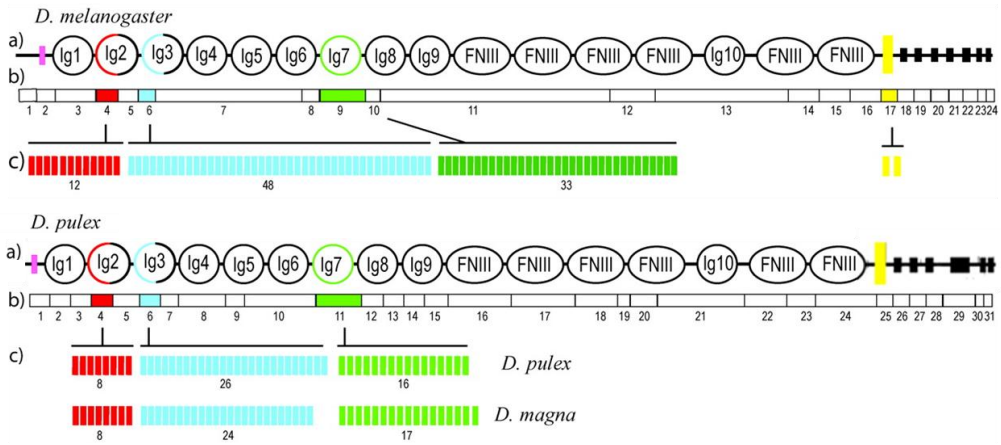
d) Les Down Syndrom Cell Adhesion Molecules (Dscam) des arthropodes

Les Dscam appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ces molécules sont connues initialement en tant que molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans l'ontogénèse du système nerveux, et en particulier dans le guidage des axones et la connectivité entre les neurones chez les mammifères et la drosophile (Yamakawa *et al.* 1998; Schmucker *et al.* 2000; Hattori *et al.* 2007). Elles ont également été décrites chez d'autres Invertébrés comme le diptère *Anopheles gambiae* et les crustacés *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* et *Litopenaeus vannamei* (Dong *et al.* 2006; Brites *et al.* 2008; Chou *et al.* 2009). Leur implication dans l'immunité n'a été montrée que récemment, suite à des travaux menés chez *D. melanogaster* et *A. gambiae* (Watson *et al.* 2005; Dong *et al.* 2006).

Les Dscam sont des protéines transmembranaires très diversifiées qui contiennent 10 domaines de type Ig et 6 domaines fibronectine III extracellulaires et un domaine cytoplasmique (Figure 6A), cependant il existe aussi des Dscam solubles sécrétées. Elles sont codées par un gène unique (*Dscam*) qui est constitué de 24 exons. Suite à des évènements de duplication, 4 d'entre eux (exons 4, 6, 9 et 17) sont présents en multiples copies avec des séquences variables organisées en clusters (respectivement 12, 48, 33, et 2 copies chez *D. melanogaster* et 14, 30, 38, et 2 chez *A. gambiae*). Les exons 4, 6 et 9 codent des parties de 3 domaines de type immunoglobuline. La grande diversité des isoformes de Dscam résulte d'un épissage alternatif mutuellement exclusif entre les différentes copies des exons 4, 6, 9 et 17 (Figure 6B). Ainsi à partir de l'unique gène *Dscam*, environ 40 000 isoformes peuvent être générées, de plus chaque hémocyte (cellule à fonction immunitaire chez les Invertébrés) exprime entre 14 et 50 isoformes différentes (Watson *et al.* 2005; Dong *et al.* 2006).

Les Dscam sont certes exprimées dans les neurones, mais c'est dans les hémocytes et le corps gras (organe impliqué dans la réponse immunitaire systémique de la drosophile) que le répertoire diversifié de Dscam est exprimé (Watson *et al.* 2005). Des expériences d'ARN interférence ont montré que la diminution du taux d'expression des Dscam entraîne une réduction d'environ 30% de l'activité de phagocytose des hémocytes chez la drosophile et de 50% chez *A. gambiae* ainsi qu'une diminution de la survie du moustique suite à une infection bactérienne (Dong *et al.* 2006). De plus, chez *A. gambiae* l'infection par un pathogène n'induit pas une augmentation de l'expression des Dscam mais un changement du répertoire des transcrits exprimés. Des répertoires différents sont exprimés en fonction du pathogène avec un degré de spécificité élevé puisque des isoformes différentes sont exprimées en réponse à deux espèces différentes de *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum* et *P. berghei*) (Dong *et al.* 2006).

A.



B.

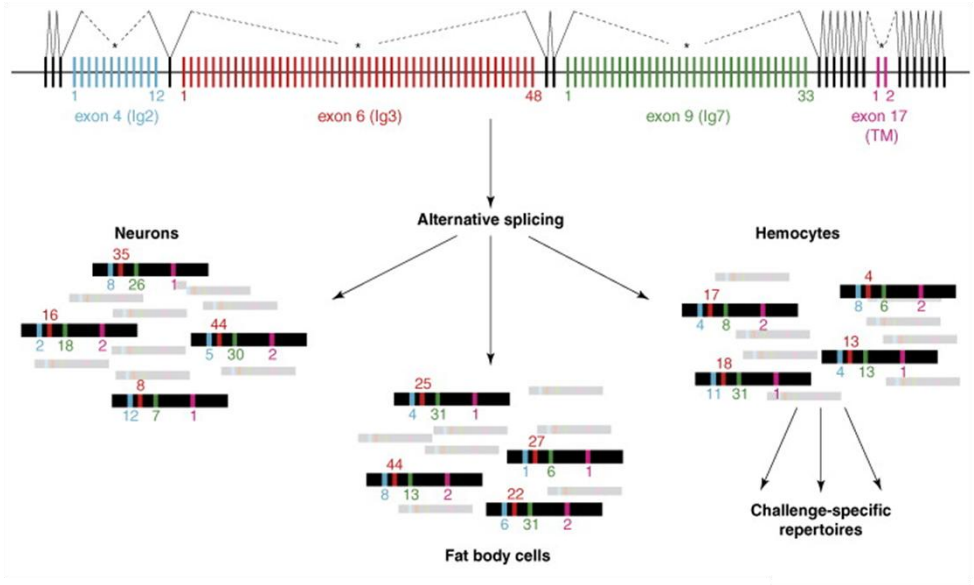


Figure 6. Structure et diversification des Dscam de Diptères et de Crustacés (modifié d'après Brites *et al.* 2008 et Litman *et al.* 2007).

A. Structure des Dscam chez *Daphnia pulex, D. magna, et Drosophila melanogaster*. (a) Organisation des différents domaines protéiques des Dscam, Ig = domaine de type immunoglobuline, FNIII = domaine fibronectine III, TM=domaine transmembranaire (b) Structure de l'ARN messager. (c) Les différentes copies des exons codant les parties N-terminale des domaines Ig2 (rouge), Ig3 (bleu) et Ig7 (vert) sont représentées par des traits verticaux. Le nombre de copies présentes chez chaque espèce est indiqué. Le domaine transmembranaire (jaune) de *D. melanogaster* est codé par 2 exons alternatifs.

B. Diversification des Dscam chez *D. melanogaster* par épissage alternatif différentiel. Une représentation schématique de la structure des gènes *Dscam* de *D. melanogaster* est reportée en haut de la figure (les différentes copies des exons 4, 6 et 9 codant les domaines Ig2, Ig3 et Ig7 sont représentées par les traits verticaux bleu, rouge et vert respectivement, leur nombre est également indiqué. L'épissage alternatif au niveau des exons 4, 6 et 9 (indiqué par un astérisque) permet de générer environ 40 000 isoformes différentes de Dscam. Ces répertoires sont exprimés dans 3 types cellulaires différents : les neurones, les cellules du corps gras et les hémocytes.

Les Dscam identifiées chez les crustacés *D. magna*, *D. pulex* et *L. vannamei* ont des structures très similaires à celles des insectes tant au niveau génomique qu'au niveau protéique (Brites *et al.* 2008; Chou *et al.* 2009). De plus, les travaux menés chez *L. vannamei* montrent que les Dscam semblent impliquées dans la réponse antivirale (Chou *et al.* 2009).

Les Dscam sont donc des molécules de reconnaissance immunitaires hypervariables dont la diversification somatique est assurée par un mécanisme d'épissage alternatif. Ces molécules pourraient donc être le support moléculaire d'un type d'immunité adaptative alternatif présents chez les insectes et les crustacés (Kurtz & Armitage 2006; Brites *et al.* 2008).

e) Les Fibrinogen related proteins (FREPs) de *B. glabrata*

Les FREPs sont des protéines hautement diversifiées qui ont une activité de type lectine calcium-dépendante. Elles ont été mises en évidence chez le mollusque *B. glabrata* qui est l'hôte intermédiaire de plusieurs trématodes parasites dont *S. mansoni*. Ce sont des protéines solubles présentes dans l'hémolymphe, exprimées par les hémocytes et capables de précipiter des antigènes solubles de trématodes (Adema *et al.* 1997a; Adema *et al.* 1997b). Elles sont constituées d'un ou de deux domaines de type immunoglobuline (IgSF) en N-terminal et d'un domaine de type fibrinogène (FBG) en C-terminal contenant le site potentiel de liaison aux résidus glucidiques («Carbohydrate Recognition Domain» ou CRD) (Figure 7). Ces deux types de domaines sont séparés par une région intermédiaire («interceding region» ou ICR) riche en lysine, isoleucine et acide glutamique (Léonard *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2001). Leur expression est augmentée en réponse à une infection par des bactéries ou des trématodes (*S. mansoni* ou *Echinostoma paraensei*) (Adema *et al.* 1997a; Hertel *et al.* 2005; Adema *et al.* 2010; Hanington *et al.* 2010b). Tous ces éléments suggèrent qu'elles pourraient jouer le rôle de récepteurs immuns.

Elles sont codées par une famille multigénique qui compte au moins 14 membres *FREP1 à FREP14* (Hanington & Zhang 2011). Les différentes familles de FREPs partagent une similarité de séquence en aminoacides entre 42% et 81%. Actuellement, seuls 4 gènes ont été entièrement séquencés *FREP2*, *FREP3*, *FREP4* et *FREP7*. *FREP2* et *FREP4* codent des FREPs avec 1 domaine IgSF et *FREP3* et *FREP7* codent des FREPs avec 2 domaines IgSF. Les analyses en southern-blot permettent d'estimer entre 1 et 8 le nombre de *loci* par haplotype pour chaque famille de FREP (Léonard *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2001; Zhang & Loker 2003).

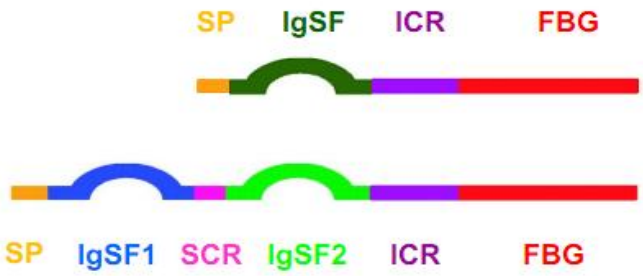


Figure 7. Représentation schématique de la structure du précurseur des FREPs de *B. glabrata* (modifié d'après Zhang *et al.* 2004)

Les FREPs possèdent toutes un peptide signal (SP), un ou deux domaines de type immunoglobuline (IgSF) en N-terminal, séparés par une région intermédiaire («interceding region» ou ICR) et un domaine de type fibrinogène (FBG) en C-terminal. FREP2 et FREP4 contiennent un seul domaine IgSF alors que FREP3 et FREP7 possèdent deux domaines IgSF (IgSF1 et IgSF2) organisés en tandem et séparés par un région appelée «small connecting region» (SCR).

La diversification des FREPs au niveau individuel a été étudiée au niveau du premier domaine IgSF (IgSF1) de FREP3 (Zhang *et al.* 2004). En effet, 45 séquences différentes d'ADNc correspondant au domaine IgSF1 de FREP3 ont été amplifiées chez un seul individu et 37 séquences chez un autre individu. Ces deux individus ne présentent qu'une seule séquence commune. Le nombre de *loci* estimé pour FREP3 étant entre 1 et 5, un individu devrait disposer au maximum de 10 allèles différents. Une analyse informatique des séquences d'ADNc a montré que la diversité observée peut être obtenue par la superposition de mécanismes de recombinaison et de mutations ponctuelles. Ainsi, les FREPs (ou au moins FREP3) seraient soumises à une diversification somatique au cours de la différenciation des hémocytes (Zhang *et al.* 2004; Hanington *et al.* 2010a).

Conclusion

Les données récentes sur l'immunité des Invertébrés montrent donc que ces derniers possèdent des molécules qui partagent un ensemble de caractéristiques communes aux molécules impliquées dans la réponse immunitaire. En effet, ces molécules sont codées par des gènes organisés en cluster, plusieurs mécanismes différents seraient responsables de leur polymorphisme et/ou de leur diversification, elles possèdent des domaines protéiques capables de se lier à d'autres molécules, elles sont exprimées dans les cellules immunitaires

(coelomocytes ou hémocytes) en réponse à une stimulation immunitaire. Ainsi, les invertébrés sont capables de générer un répertoire individuel de molécules de reconnaissance immunitaire diversifiées. De tels répertoires constituent la base de l'immunité adaptative, comme elle est connue chez les Vertébrés. Néanmoins une inconnue subsiste : ces molécules diversifiées interagissent-elles vraiment avec des antigènes de pathogènes qui, dans le contexte de la course aux armements et de l'hypothèse de la Reine Rouge, sont supposés être également polymorphes et/ou diversifiés ? Il est donc maintenant crucial de rechercher leur contrepartie parasitaire ou plus précisément les antigènes du parasite qui interagissent avec ces molécules de reconnaissance (cf. Partie 1).

2. La phase effectrice de la réponse immunitaire dans les interactions hôte-parasite : le rôle des espèces réactives de l'oxygène

La réponse immunitaire comporte deux phases, la première phase est dédiée à la reconnaissance du pathogène et la deuxième est une phase effectrice qui consiste à détruire ce dernier. Les réponses effectrices induites par les pathogènes sont multiples et elles incluent la production de cytokines, de peptides antimicrobiens, la phagocytose ou l'encapsulation, la mélanisation (voie pro-phénoloxydase), ou encore la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS). Dans le cas des interactions mollusque-trématode qui sont notre sujet d'étude, la production de ROS ou de RNS par les hémocytes constitue le mécanisme majeur de la phase effectrice (Zelck & Von Janowsky 2004). Pour contrecarrer ces « armes oxydantes » de l'hôte, les parasites disposent de systèmes antioxydants («ROS scavengers») qui annihilent les effets des ROS ou RNS. Dans le contexte de la course aux armements entre hôtes et parasites, il est attendu que ces deux systèmes antagonistes coévoluent et donc que les capacités oxydantes de l'hôte et les capacités antioxydantes du parasite s'influencent mutuellement et soient étroitement liées.

2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) chez l'hôte

ROS et RNS sont des composés cytotoxiques dont l'implication dans la réponse immunitaire est très conservée et largement répandue aussi bien chez les Vertébrés que chez les Invertébrés (Nappi & Ottaviani 2000). La reconnaissance d'un pathogène entraîne une forte consommation d'O_2 dans les hémocytes du fait de l'activation d'un complexe enzymatique membranaire, la NADPH oxidase (Zelck & Von Janowsky 2004; Bender *et al.* 2005). Cette enzyme catalyse l'oxydation du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) en $NADP^+$ avec production d'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ (Fang 2004). Cet anion superoxyde est le précurseur des autres ROS comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$, ou encore l'acide hypochlorique (HOCl). La toxicité de ces différents ROS varie beaucoup de même que leur demi-vie et leur capacité à traverser les membranes

biologiques (Sorci & Faivre 2009). Ainsi le H_2O_2 , qui peut traverser les membranes et qui est très stable, constitue un ROS particulièrement toxique. Il est généré par la dismutation de $O_2^{\bullet -}$ catalysée par la superoxide dismutase (SOD) (Figure 8). Cette dernière réaction est clé car H_2O_2 est le précurseur d'autres ROS (HOCl et $HO^{\bullet}$). HOCl est produit à partir de H_2O_2 et de l'ion chlorure Cl^- par l'action de la myéloperoxydase (MPO), il possède une puissante activité antimicrobienne et peut générer à son tour d'autres ROS comme l'ion hypochlorite (ClO^-), puis l'oxygène singulet ($^1O_2$). $HO^{\bullet}$ peut être produit soit à partir de H_2O_2 lorsque ce dernier oxyde l'ion ferreux (Fe^{2+}) par la réaction de Fenton, soit à partir de HOCl qui réagit avec $O_2^{\bullet -}$ (Beutler 2004; Fang 2004) (Figure 8).

Les RNS constituent la deuxième classe de molécules oxydantes, le principal représentant est le monoxyde d'azote (NO), il est produit à partir de l'arginine par une réaction catalysée par la NO synthase (Figure 8). Le NO est cytotoxique par lui-même, mais il peut aussi réagir spontanément avec $O_2^{\bullet -}$ pour former l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$) très réactif.

Chacune de ces espèces ont des réactivités, des demi-vies, et des activités biologiques différentes, elles peuvent être présentes simultanément. L'activité anti-parasitaire des ROS et des RNS repose sur le fait qu'ils peuvent interagir avec toutes sortes de molécules dans la cellule, comme par exemple les protéines (fonctions thiols, les tyrosines, groupements prosthétiques tels que les centres métalliques), les bases des nucléotides de l'ADN, ou bien encore les lipides. Les travaux concernant les cibles intracellulaires des ROS et RNS ont surtout porté sur les bactéries comme *Escherichia coli* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Chez *E. coli*, les ROS provoquent des dommages au niveau de l'ADN par oxydation des bases ce qui entraîne des cassures des brins d'ADN, mais aussi au niveau des protéines dont l'oxydation de certains résidus (cystéine, méthionine, tyrosine, phénylalanine) entraîne une perte de fonction. Chez *M. tuberculosis*, les RNS inhibent la respiration et la réplication de l'ADN. Les parasites eucaryotes sont eux très sensibles à la peroxydation des lipides membranaires (Fang 2004).

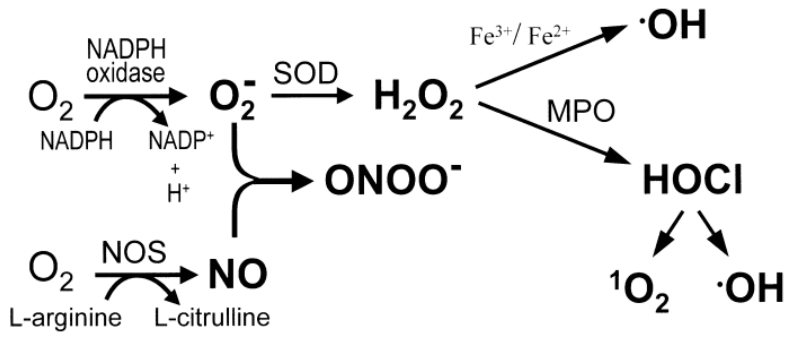


Figure 8. Schéma simplifié des voies de synthèse des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) (d'après Bayne *et al.* 2001).

Le complexe NADPH oxidase catalyse la réduction de l'oxygène (O_2) en anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). La dismutation de $O_2^{\bullet-}$en H_2O_2 est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD). En présence d'ion chlorure Cl^-, H_2O_2 est converti en acide hypochlorique (HOCl) par la myeloperoxidase (MPO). H_2O_2 peut réagir avec Fe^{2+} pour produire le radical hydroxyle ($HO^\bullet$). HOCl peut aussi produire $HO^\bullet$ et de l'oxygène singulet ($^1O_2$).

La NO synthase (NOS) catalyse la formation de monoxyde d'azote (NO) à partir de l'arginine. Le NO peut réagir avec $O_2^{\bullet-}$ pour former l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$).

Cependant, les pathogènes disposent de moyens pour résister aux effets du stress oxydant généré par les ROS et les RNS produits par l'hôte.

2.2 Les systèmes enzymatiques antioxydants des parasites

Tous les organismes aérobies possèdent des systèmes antioxydants pour pouvoir lutter contre le stress oxydant généré par leur métabolisme. Dans le cas des interactions hôtes-parasites, les parasites doivent lutter également contre le stress oxydant généré par la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, les ROS et les RNS générés par les hôtes exercent une pression de sélection forte sur les systèmes antioxydants des parasites dans la mesure où ceux-ci doivent pouvoir résister à ce stress oxydant pour survivre. Chez les parasites la production d'enzymes anti-oxydantes constitue un moyen d'échapper à ces effecteurs de l'immunité de l'hôte, ces enzymes sont d'ailleurs le plus souvent soit ancrées au niveau du tégument du parasite soit libérées dans les produits d'excrétion-sécrétion et donc dans l'environnement immédiat du parasite (Guillou *et al.* 2007; Chiumiento & Bruschi 2009). Les enzymes anti-

oxydantes sont nombreuses et les stratégies anti-oxydantes diffèrent selon les espèces de parasite. Très peu de choses sont connues en ce qui concerne la lutte conte les RNS, c'est pourquoi nous nous focaliserons ici sur les systèmes antioxydant de lutte contre les ROS présents chez les helminthes parasites (Nématodes et Platheminthes).

2.2.1 La superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène [$2\ O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$]. Chez les métazoaires il y a deux classes de SOD, une isoforme mitochondriale qui possède un ion Mn^{2+} (Mn SOD) et une isoforme cytosolique ou sécrétée qui contient un ion Cu^{2+} et un ion Zn^{2+} (Cu/Zn SOD) (Fridovich 1995). La SOD constitue souvent la première ligne de défense contre les ROS, les formes sécrétées assurent la protection du parasite contre l'$O_2^{\bullet -}$ exogène produit par l'hôte. Les formes extracellulaires de la SOD ont été mises en évidence dans les produits d'excrétion/sécrétion de Nématodes (Selkirk *et al.* 1998) et des Trématodes *Fasciola hepatica*, *Echinostoma caproni* et *S. mansoni* (Guillou *et al.* 2007; Gourbal *et al.* 2008). Cependant le peroxyde d'hydrogène produit doit être ensuite réduit pour éviter l'oxydation des composants cellulaires. La réduction de H_2O_2 en H_2O implique d'autres enzymes telles que les catalases ou les glutathione peroxydases (voir les 2 prochains paragraphes). En outre, la SOD possède également une activité peroxydase lui permettant de réduire H_2O_2 (Kim & Kang 1997; Liochev & Fridovich 2010).

2.2.2 Les peroxydases

Deux classes d'enzymes catalysent la réduction de H_2O_2, les catalases (les produits en fin de réaction sont H_2O et O_2) et les glutathione peroxydases (les produits en fin de réaction sont H_2O et un transporteur d'électrons réduit). Les catalases ont été identifiées chez la plupart des espèces de parasites et semblent constituer la principale défense contre H_2O_2 chez quelques espèces de nématodes *Haemonchus contortus*, *Ascaris suum*, *Brugia malayi* (Ou *et al.* 1995; Eckelt *et al.* 1998; Kotze & McClure 2001), cependant elles sont absentes chez *S. mansoni* ce qui suggère l'existence d'un système alternatif chez ce parasite pour détoxifier H_2O_2. Dans le cas des glutathione peroxydases, la réduction de H_2O_2 est couplée

avec l'oxydation d'un transporteur d'électrons qui est en général le glutathion. Le glutathion est un tripeptide (γ-glutamyl-cysteinyl-glycine) dont la fonction thiol peut être oxydée et qui joue un rôle important de tampon redox dans la cellule (Muller 2004). Cependant chez les helminthes ces glutathione peroxydases ont une faible réactivité avec H_2O_2 et ne constituent pas un moyen de détoxifier les ROS (Selkirk *et al.* 1998; Dzik 2006; Chiumiento & Bruschi 2009).

2.2.3 Les glutathione S-transférases (GST)

Ces enzymes sont surtout impliquées dans la protection des membranes en neutralisant les produits de la peroxydation des lipides (lipoperoxydation) induite par les ROS, en conjuguant ces produits avec le glutathion (Torres-Rivera & Landa 2008). Les GST sont classées en 13 classes dont certaines sont retrouvées chez tous les organismes (mu (μ), alpha (α), pi (π), theta (θ), sigma (σ), zeta (ζ) and omega (ω)). Les activités GST ont été détectées dans les différents stades de développement et les différents tissus des parasites. En général, ces activités sont présentes dans les tissus en contact avec l'environnement, c'est-à-dire avec l'hôte, comme les téguments, l'hypoderme, les protonéphridies, certaines GST sont mêmes sécrétées (Dzik 2006; Torres-Rivera & Landa 2008).

Trois GST ont été identifiées chez le nématode *O. volvulus* (OvGST1, OvGST2 et OvGST3). Elles possèdent en plus une activité peroxydase et pourraient donc être impliquées dans la détoxification de H_2O_2, de plus OvGST1 est sécrétée (Liebau *et al.* 1994; Liebau *et al.* 1996). Les GST sont également présentes chez *S. mansoni*, 5 isoformes ont été identifiées mais seulement 3 ont été purifiées et caractérisées (Chiumiento & Bruschi 2009). Chez l'adulte, elles sont localisées au niveau des tubercules tégumentaires du mâle, ici encore la GST est localisée au contact du milieu extérieur et donc de l'hôte (Chiumiento & Bruschi 2009). Notons que la femelle de *S. mansoni* ne présente pas les mêmes caractéristiques d'expression tégumentaire : ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'au stade adulte, la femelle vit enchâssée dans le canal gynécophore du mâle et elle est donc moins exposée au ROS de l'hôte. A signaler que des études menées au laboratoire dans le cadre de mon Master ont permis de mettre en évidence la présence de GST dans les produits d'excrétion/sécrétion des stades intramolluscaux du parasite (Guillou *et al.* 2007) (Annexe 1).

2.2.4 Les Peroxyrédoxines

Les Peroxyredoxines (Prx) catalysent la réduction des hydroperoxydes (dont H_2O_2) et des peroxynitrites ($ONOO^-$) (Flohe *et al.* 2003). Elles ne possèdent ni cofacteur, ni groupement prosthétique. Il y a trois familles de Prx en fonction du nombre de cystéines présentes à des positions très conservées : 1-Cys Prx typique, 1-Cys Prx atypique, et 2-Cys Prx. Toutes les Prx ont une cystéine réactive en N-terminal considérée comme le site actif de l'enzyme, les 2-Cys Prx ont en plus une deuxième cystéine dans leur partie C-terminale. Lors du cycle catalytique, la réduction des peroxydes par les 2-Cys Prx entraine l'oxydation de la fonction thiol de la cystéine catalytique et la formation d'un pont disulfure. La fonction thiol est ensuite régénérée par réduction de ce pont disulfure par des molécules donneuses d'électrons telles que la thiorédoxine ou le glutathion (Figure 9). L'état réduit de ces molécules est maintenu par le système thioredoxine réductase ou glutathione réductase (Rouhier *et al.* 2001; Hofmann *et al.* 2002; Sayed & Williams 2004).

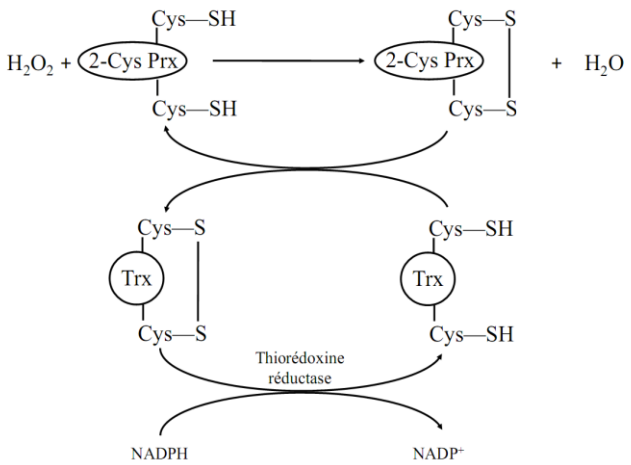


Figure 9. **Réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la peroxyrédoxine (2-Cys Prx)**

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est réduit par la peroxyrédoxine (2-Cys Prx) et 2-Cys Prx est régénérée par le système Thiorédoxine (Trx) – Thiorédoxine réductase.

Les Prx ont été identifiées chez plusieurs espèces de Nématodes au niveau de la cuticule (*Onchocerca volvulus*), ou des produits d'excrétion/sécrétion des stades larvaires et adultes (*Dirofilaria immitis*) (Lu *et al.* 1998; Chandrashekar *et al.* 2000). Chez *Ascaris suum*, les Prx font partie des composants majoritaires des extraits d'*A. suum* et semblent donc jouer un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant (Tsuji *et al.* 2000). Concernant les Trématodes, la première séquence complète correspondant à une Prx a été décrite chez

Fasciola hepatica, il s'agit d'une 2-Cys Prx qui est sécrétée (McGonigle *et al.* 1997) et dont l'activité antioxydante a été confirmée *in vitro* (Salazar-Calderón *et al.* 2000). Chez *S. mansoni*, 3 isoformes de Prx (Prx1, Prx2, et Prx3) ont été caractérisées, il s'agit de 2-Cys Prx qui peuvent utiliser aussi bien la thioredoxine que le glutathion pour régénérer la forme réduite de l'enzyme (Sayed & Williams 2004). Elles sont exprimées dans tous les stades du parasite, surexprimées dans le stade intramolluscal (sporocyste primaire) et sont présentes dans les produits d'excrétion/sécrétion des stades larvaires, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle important dans la détoxification des ROS (Sayed & Williams 2004; Vermeire & Yoshino 2007). Les travaux récents de Vermeire *et al.* (2007) montrent que l'exposition de sporocystes au H_2O_2 entraîne une surexpression de Prx1 et Prx2 et que l'effet antioxydant des produits d'excrétion/sécrétion est annulé lorsque Prx1 et Prx2 sont absentes. Ces résultats suggèrent donc que les Prx sont des enzymes clés dans la détoxification des peroxydes chez *S. mansoni*. Aussi bien pour *F. hepatica* que pour *S. mansoni* la catalase est absente et les glutathione peroxydases ont une activité faible, les Prx constituent donc la voie majeure de détoxification des peroxydes chez ces deux espèces.

Conclusion

En réponse au stress oxydant généré par la réponse immunitaire de l'hôte, les parasites se protègent grâce à un ensemble d'enzymes antioxydantes. Dans ce contexte, capacités oxydantes de l'hôte et capacités antioxydantes du parasite sont en perpétuelle opposition, au cœur d'une course aux armements dont on peut prédire qu'elle a certainement une influence forte sur la dynamique co-évolutive de ces mécanismes. Cette défense antioxydante est absolument nécessaire pour les parasites puisque l'altération de cette voie de détoxification est préjudiciable pour la survie et le développement du parasite dans son hôte (cf. Partie 2, publication n°3) et elle constitue donc une cible de choix pour les stratégies de traitement médicamenteux des parasitoses (Sayed *et al.* 2006). Il est donc attendu qu'il existe une corrélation étroite entre les taux de ROS de l'hôte et les taux de ROS scavengers du parasite (cf. Partie 2, publication n°4).

3. Le modèle *Biomphalaria glabrata / Schistosoma mansoni*

L'étude de la course aux armements dans une interaction hôte-parasite nécessite de disposer d'un modèle adapté dans lequel cette dynamique co-évolutive est accessible expérimentalement. C'est le cas de l'interaction entre le mollusque gastéropode *B. glabrata* et le Trématode *S. mansoni*. En effet, dans cette interaction les mécanismes d'infectivité du parasite et les mécanismes de défense de l'hôte sont à l'équilibre. Cette dynamique co-évolutive à l'équilibre se traduit en populations naturelles par un polymorphisme de compatibilité, c'est-à-dire qu'il existe des couples hôte-parasite compatibles (succès de l'infestation) et d'autres incompatibles (échec de l'infestation).

3.1 Généralités

Les schistosomes sont des parasites appartenant à l'embranchement des Plathelminthes et à la classe des Trématodes. Le genre *Schistosoma* compte une vingtaine d'espèces dont trois (*S. haematobium*, *S. japonicum*, et *S. mansoni*) sont les principaux agents étiologiques des schistosomiases (ou bilharzioses) humaines, pathologies très sévères au deuxième rang mondial des maladies parasitaires. Cette maladie affecte plus de 200 millions de personnes et environ 200 000 personnes décèdent de cette maladie chaque année (Chitsulo *et al.* 2004).

Les espèces du genre *Schistosoma* sont réparties sur toute la ceinture tropicale et intertropicale : *S. haematobium* (responsable de la bilharziose urinaire) est présent en Afrique et au Moyen Orient, *S. japonicum* (responsable de la bilharziose spléno-hépatique) est endémique de l'Asie, et *S. mansoni* (responsable de la bilharziose intestinale) est largement répandu en Afrique et constitue la seule espèce présente en Amérique du sud et dans les Caraïbes où elle fut importée assez récemment, pendant les XVIème et XVIIème siècles lors du déplacement massif des populations africaines vers le nouveau monde durant la traite négrière (Morgan *et al.* 2005).

3.2 Le cycle de vie de *Schistosoma mansoni*

Comme toutes les espèces du genre *Schistosoma*, *S. mansoni* a un cycle de vie complexe qui fait intervenir deux hôtes successifs : un hôte intermédiaire qui est toujours un mollusque (caractéristique des Trématodes) et un hôte définitif vertébré, chez lequel le parasite devient adulte et se reproduit sexuellement (Figure 10).

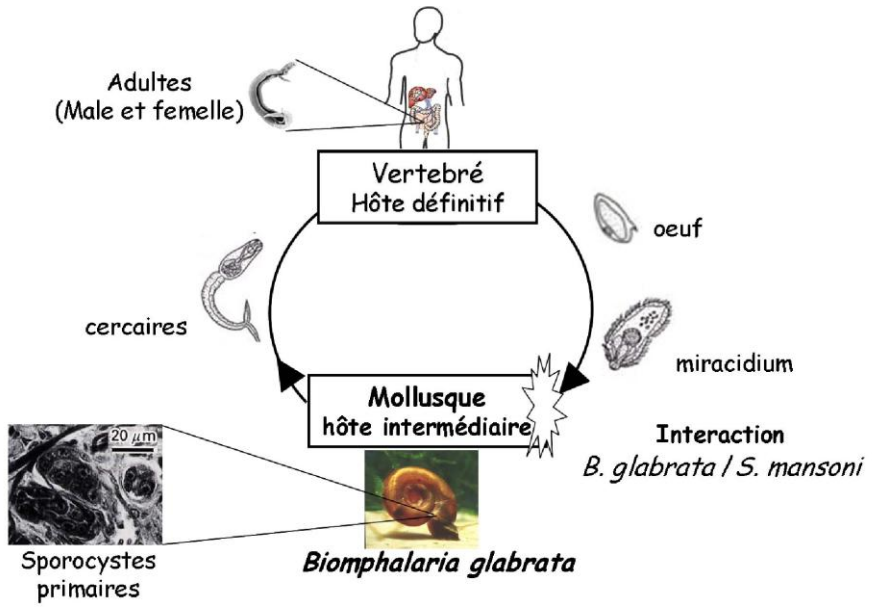


Figure 10. Cycle de vie de *Schistosoma mansoni*

Les vers adultes forment des couples qui vivent et se reproduisent au niveau des veines de l'intestin de l'hôte vertébré. Les œufs, pourvus d'un éperon, traversent par effraction la paroi de l'intestin et sont rejetés à l'extérieur avec les excréments. Dans l'eau douce, ces œufs libèrent une larve nageuse, le miracidium qui infeste l'hôte intermédiaire, le gastéropode *Biomphalaria glabrata*. A l'interieur du mollusque, le miracidium se transforme en sporocyste primaire et entame une multiplication asexuée intense pour donner des sporocystes secondaires qui se transforment en cercaires. Les cercaires sont des larves nageuses qui sortent activement du mollusque par effraction du tégument et nagent pour infester l'hôte définitif.

Les adultes vivent et se reproduisent à l'intérieur du système veineux porte hépatique et mésentérique du vertébré. Les femelles peuvent pondre jusqu'à 300 œufs par jour, certains franchissent la barrière intestinale et rejoignent le milieu extérieur par l'intermédiaire des fèces, les autres restent dans le compartiment sanguin et s'accumulent dans le foie où ils déclenchent une forte réaction inflammatoire (responsable de la pathologie). Les œufs, émis dans le milieu aquatique, libèrent une larve ciliée et nageuse : le miracidium (premier stade larvaire) qui infeste activement et très spécifiquement l'hôte

intermédiaire, un mollusque d'eau douce du genre *Biomphalaria* (Gastropoda, Pulmonata, Planorbidae), chez lequel le parasite se multiplie intensément de manière clonale. Le miracidium se transforme alors en sporocyste primaire (Sp1), généralement localisé dans les tissus du pied de l'hôte. Les Sp1 produisent une deuxième génération de sporocystes : les sporocystes secondaires (Sp2) qui migrent vers la glande digestive du mollusque. Les Sp2, sont capables de produire non seulement des cercaires (larve nageuse qui infeste l'hôte Vertébré) mais également des générations supplémentaires de sporocystes (Sire *et al.* 1998). La pénétration et le développement d'un miracidium dans le mollusque conduit à la production de plusieurs milliers de cercaires qui sortent activement du mollusque (Coustau 2009).

3.3 L'interaction *B. glabrata* / *S.mansoni*

3.3.1 Spécificité et multiplication clonale

Les schistosomes utilisent toujours un mollusque d'eau douce comme hôte intermédiaire dans lequel ils effectuent une multiplication asexuée intense. S'il existe une certaine latitude quant à l'espèce de l'hôte définitif (par exemple *S. mansoni* peut parasiter des humains ou des rongeurs), il y a au contraire un haut niveau de spécificité entre l'hôte intermédiaire et le parasite, ainsi *S. mansoni* ne parasite que des espèces de mollusque du genre *Biomphalaria* (*B. glabrata, B. pfeifferi, B. alexandrina, B. straminea, B. sudanica, B. tenagophila,* etc…) et pour une localité donnée une seule espèce. Cette spécificité est à l'origine de la répartition géographique du parasite, son aire de répartition étant limitée à celle où l'hôte intermédiaire est présent (Van Der Knaap & Loker 1990). L'implantation de *S. mansoni* en Amérique du sud et aux Caraïbes s'explique par la présence dans le Nouveau-Monde de l'espèce *B. glabrata,* alors qu'en Afrique *S. mansoni* infecte principalement *B. pfeifferi* et *B. alexandrina*. Plusieurs facteurs influencent cette spécificité. Par exemple, la fixation et la pénétration du miracidium ne sont possibles que sur certains hôtes. Dans d'autres cas, l'état physiologique ou biochimique de l'hôte (osmolarité, nutriments, etc…) ne permet pas l'implantation et/ou le développement du parasite. Cependant, la cause majeure d'un tel niveau de spécificité est le système immunitaire de l'hôte qui détermine l'issue de l'interaction entre l'hôte et le parasite. En effet, l'immunité de l'hôte impose une pression de

sélection très forte sur le parasite qui doit pouvoir opposer une réponse adaptée au système de défense de l'hôte (Van Der Knaap & Loker 1990; Sapp & Loker 2000).

A l'intérieur de l'hôte intermédiaire, le parasite va effectuer une multiplication asexuée intense. Le cycle de vie complexe du parasite entraîne de grandes pertes au cours des étapes de changement d'hôte (en moyenne seulement 6 cercaires issues d'un mollusque parviennent à infester un hôte définitif), de plus dans le milieu naturel les prévalences sont faibles seulement 1% de la population de mollusques est parasitée. Cette étape de multiplication asexuée permet donc de compenser ces pertes dues aux changements d'hôtes successifs. C'est donc une étape cruciale pour assurer la transmission du parasite. Cette clonalité n'affecte pas la diversité génétique des populations de parasites du fait de l'étape de reproduction sexuée dans l'hôte définitif (Théron 2005).

3.3.2 Le polymorphisme de compatibilité

En populations naturelles, l'interaction *S. mansoni/B. glabrata* est caractérisée par un polymorphisme de compatibilité. Dans cette interaction, les mécanismes d'infectivité du parasite et de défense de l'hôte sont à l'équilibre ce qui conduit à la coexistence de phénotypes d'hôtes et de parasites compatibles et incompatibles. Ce polymorphisme de compatibilité serait donc l'illustration d'un équilibre dans la course aux armements prédite par l'hypothèse de la Reine Rouge. La compatibilité serait testée indépendamment pour chaque couple hôte-parasite et l'issue de l'infestation dépendrait de la concordance ou de la non concordance des phénotypes de l'hôte et du parasite, c'est le modèle de «matching phenotype» proposé par Théron & Coustau (2005). En effet, les données expérimentales obtenues dans notre laboratoire montrent que (i) les prévalences au niveau du mollusque dépendent du nombre de *miracidia* auquel le mollusque est exposé et (ii) des coupes histologiques réalisées au sein d'un même individu mollusque révèlent la présence simultanée de Sp1 développés et de Sp1 encapsulés (Théron & Coustau 2005). Ainsi dans le cas de l'interaction *S. mansoni/B. glabrata* les concepts classiques de résistance et de sensibilité ne peuvent être appliqués. La survie ou la mort du parasite dans les tissus de l'hôte reflèterait donc la capacité pour un individu miracidium de contrecarrer les défenses immunitaires de l'individu mollusque auquel il est confronté.

Selon ces hypothèses, la compatibilité entre *S. mansoni* et *B. glabrata* reposerait sur l'expression par le parasite d'épitopes qui pourraient être reconnus ou non reconnus par

les molécules de reconnaissance immunitaires de l'hôte. Ce modèle implique qu'il existe dans la population d'hôtes et de parasites des répertoires polymorphes et/ou diversifiés d'épitopes et de molécules de reconnaissance, la concordance ou la non concordance entre ces deux répertoires constituant la base fonctionnelle du polymorphisme de compatibilité.

Les modèles expérimentaux qui ont été développés au sein du laboratoire devraient nous permettre de mener des approches comparatives afin de mettre en évidence les molécules clés au cœur de l'interaction, molécules qui seraient impliquées dans cette course aux armements.

Partie 1

RECONNAISSANCE IMMUNITAIRE
ET
COURSE AUX ARMEMENTS
DANS L'INTERACTION *S. MANSONI* / *B. GLABRATA*

Publication n°1

Roger E., Mitta G., Moné Y., Bouchut A., Rognon A., Grünau C., Boissier J, Théron A., Gourbal B.E.F., (2008). Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata* / *Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomic approach. Molecular and Biochemical Parasitology, 157 (2), 205-216.

Publication n°2

Moné Y., Gourbal B.E., Duval D., Du Pasquier L., Kieffer-Jaquinod S., Mitta G. (2010). A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. PloS Neglected Tropical Diseases, 4(9): e813.

Dans l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni*, comme nous l'avons vu, la course aux armements entre l'hôte et son parasite s'illustre en populations naturelles par un polymorphisme de compatibilité. Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents, nous avons recherché les molécules présentant un haut niveau de polymorphisme et/ou de diversification et jouant donc un role clé au sein de l'interaction entre les deux protagonistes.

En s'appuyant sur ce polymorphisme de compatibilité caractéristique de l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni*, nous avons sélectionné au laboratoire deux souches de parasites l'une compatible (C) et l'autre incompatible (IC) vis-à-vis de la même souche de mollusque. Ici il faut entendre par souche, un ensemble d'individus provenant du même isolat géographique et qui partagent le même phénotype. Dans le cas de l'interaction compatible, le parasite pénètre à l'intérieur du mollusque et se développe normalement. Au contraire lors d'une interaction incompatible, après avoir pénétré dans l'hôte le parasite est très rapidement reconnu, encapsulé, et détruit par les hémocytes de l'hôte. La rapidité de cette reconnaissance et l'élimination du parasite suggèrent que les souches C et IC présentent des différences antigéniques constitutives. Afin de mettre en évidence les molécules potentiellement impliquées dans cette compatibilité/reconnaissance différentielle, une approche protéomique comparative entre sporocystes primaires des souches C et IC a été menée. Cette analyse comparative menée par électrophorèse bidimensionnelle (gels 2D) a permis de révéler des protéines différentiellement représentées entre les sporocystes des deux souches. Ces protéines peuvent être réparties en trois classes : des protéines du métabolisme primaire, des enzymes antioxydantes et enfin, comme attendu, des protéines polymorphes de type mucine que nous avons appelées *Schistosoma mansoni* Polymorphic Mucins ou *Sm*PoMucs (Publication n°1). Les mucines sont connues pour être impliquées dans les relations hôte-parasite à différents niveaux (pénétration dans l'hôte, évasion immunitaire, immunomodulation). La structure du précurseur révèle que les *Sm*PoMucs possèdent un peptide signal potentiel, une partie N-terminale composée d'un nombre variable d'unités répétées de neuf acides aminés et une partie C-terminale relativement constante. Des travaux menés au laboratoire dans le cadre de la thèse d'Emmanuel Roger ont montré que ces protéines sont fortement glycosylées et hautement polymorphes, qu'elles sont exprimées uniquement dans les stades interagissant avec le mollusque (miracidium et sporocystes), et qu'elles sont localisées dans la glande apicale (un organe impliqué dans la sécrétion). De plus, ces protéines sont présentes dans les produits d'excrétion/sécrétion des sporocystes primaires (Roger *et al.* 2008a). Il a été également montré que ce polymorphisme des *Sm*PoMucs était généré à différents niveaux. Tout d'abord, au niveau génomique, les *Sm*PoMucs sont codées

par une famille multigénique d'une dizaine de membres répartis sur 4 *loci* sur les chromosomes 3 et 4. De fréquents évènements de recombinaison ectopique aboutissent à la création de gènes mosaïques. Ensuite, au niveau post-transcriptionnel, les ARN pré-messagers subissent différents types d'épissages générateurs de polymorphisme (épissage alternatif, épissage aberrant ou du trans-épissage) (Roger *et al.* 2008b). Ces mucines présentent également un polymorphisme de glycosylation (Roger *et al.* 2008b). Enfin, un polymorphisme d'expression des *Sm*PoMucs a été mis en évidence au niveau individuel, ainsi chaque individu exprime une combinaison de variants *Sm*PoMucs qui lui est propre. Toutes ces caractéristiques font des *Sm*PoMucs des candidats de choix pour être des acteurs clés de ce polymorphisme de compatibilité en tant qu'antigènes polymorphes susceptibles d'être reconnus par les molécules de reconnaissance du système immunitaire de *B. glabrata* .

Pour confirmer ces hypothèses sur le rôle des *Sm*PoMucs et aborder la question de la course aux armements de manière complète dans l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni*, il fallait également rechercher les déterminants moléculaires responsables du polymorphisme de compatibilité chez le mollusque. Pour cela nous avons choisi de développer deux approches complémentaires (Publication n°2). Une approche protéomique globale qui vise à rechercher l'ensemble des protéines issues d'extraits de sporocystes capables d'interagir avec des protéines du plasma du mollusque. La deuxième approche est plus ciblée et consiste à rechercher par coimmunoprécipitation des protéines plasmatiques du mollusque capables d'interagir avec les *Sm*PoMucs.

Ces deux approches globale et ciblée ont permis de montrer l'interaction entre les *Sm*PoMucs et les FREPs. Ces deux types moléculaires semblent jouer un rôle clé dans la reconnaissance entre l'hôte et le parasite. Leur polymorphisme est un argument supplémentaire qui renforce le rôle clé qu'ils semblent jouer dans le polymorphisme de compatibilité caractéristique de cette interaction. L'étude ciblée a permis de révéler un autre partenaire dans le complexe moléculaire formé par les *Sm*PoMucs et les FREPs : nous avons identifié une thioester-containing protein de *B. glabrata* (BgTEP). Les TEP sont connues pour jouer un rôle clé dans les interactions hôtes/pathogènes, où elles ont une fonction d'opsonine. Nous discuterons le rôle clé potentiel de cette opsonine dans notre modèle. L'approche globale quant à elle a mis en évidence d'autres molécules intéressantes supplémentaires (en plus des FREPs et des *Sm*PoMucs). Il s'agit d'une nouvelle lectine de *B. glabrata* (lectine liant le galactose) et d'autres glycoprotéines de *S. mansoni* (la 23 kDa integral membrane protein (Sm23) et la glycoprotéine K5). D'autres protéines impliquées dans l'immunité chez *B. glabrata* ont également été identifiées telles que des molécules d'adhésion cellulaires (Dec-

1-like, Matrilin-like, peroxynectine), un inhibiteur de cystéine-protéase (cystatine B), une molécule impliquée dans l'inflammation AIF (Allograft Inflammatory Factor, AIF). Enfin, une nouvelle protéine potentiellement cytolytique de *B. glabrata* a été identifiée *:* elle présente une similarité de séquence pour l'aérolysine de la bacterie *Aeromonas hydrophila*. L'aérolysine a une activité cytolytique due à sa capacité à former des pores dans les membranes. Ces protéines ont été surtout décrites chez des bactéries mais également chez une plante et un cnidaire. C'est la première fois qu'elle est identifiée chez un mollusque.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Molecular & Biochemical Parasitology 157 (2008) 205–216
MOLECULAR & BIOCHEMICAL PARASITOLOGY

Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach☆

Emmanuel Roger, Guillaume Mitta, Yves Moné, Anne Bouchut, Anne Rognon, Christoph Grunau, Jérôme Boissier, André Théron, Benjamin E.F. Gourbal*

Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5244, CNRS, EPHE, UPVD, Biologie & Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

Received 20 July 2007; received in revised form 23 October 2007; accepted 2 November 2007
Available online 17 November 2007

Abstract

The co-evolutionary dynamics that exist in host–parasite interactions sometimes lead to compatibility polymorphisms, the molecular bases of which are rarely investigated. To identify key molecules that are involved in this phenomenon in the *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* model, we developed a comparative proteomics approach using the larval stages that interact with the invertebrate host. We used qualitative and quantitative analyses to compare the total proteomes of primary sporocysts from compatible and incompatible parasite strains. The differentially expressed proteins thus detected belong to three main functional groups: (i) scavengers of reactive oxygen species, (ii) components of primary metabolism, and (iii) mucin-like proteins. We discuss the putative roles played by these protein families as determinants of compatibility polymorphism. Since mucins are known to play key roles in the host–parasite interplay, we consider the newly discovered *S. mansoni* mucin-like proteins (*Sm*Mucin-like) as the most promising candidates for influencing the fate of host–parasite interactions. An analysis of their expression is presented in a paper published in the same journal issue.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; Compatibility polymorphism; Proteomics; Mucin-like

1. Introduction

Schistosomiasis or bilharzia is a tropical disease caused by worms of the genus *Schistosoma*. The main disease-causing species are *S. haematobium*, *S. japonicum*, and *S. mansoni*. An estimated 200 million people in 74 countries suffer from schistosomiasis [1,2]. The World Health Organization expert committee (WHO Technical Report Series 912: prevention and control of schistosomiasis and soil transmitted helminthiasis (WHO, Geneva, 2002)) concluded that yearly deaths could be as high as 200,000, making schistosomiasis the most severe tropical disease after malaria in terms of morbidity [1].

The life cycle of the parasite requires contamination of surface water by excrement, specific freshwater snails as intermediate hosts, and human to water contact. The snail hosts have attracted significant attention in the past, due to their medical and epidemiological importance. In addition, the interaction between snail and schistosome has been extensively studied as a model in evolutionary biology. This host–parasite relationship is a model of choice for the study of co-evolution or reciprocal adaptation [3,4]. Host parasite co-evolution is driven by the reciprocal evolution of host resistance and parasite infectivity and or virulence [4]. To study and understand this phenomenon, it is necessary to work with a host–parasite model in which such co-evolutionary dynamics exist. This is the case in our model that involves *Schistosoma mansoni,* the main schistosome species infecting humans in Africa, the Arabian Peninsula, and South America, and *Biomphalaria glabrata*, its intermediate snail host in the New World. In the *S. mansoni*/*B. glabrata* interaction, a compatibility polymorphism was observed [5]: in natural populations some snail/schistosome combinations are compatible

☆ *Note:* Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ database under the accession numbers: EU042595, EU042596, EU042597, and EU042598.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 68 66 20 50; fax: +33 4 68 66 22 81.
E-mail address: benjamin.gourbal@univ-perp.fr (B.E.F. Gourbal).

0166-6851/$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molbiopara.2007.11.003

and others are not. The study of this compatibility polymorphism can provide insights into the so-called "Red Queen" or "arms race" co-evolutionary mechanism. Many fundamental studies [4] have been conducted using this model, but the molecular basis of the compatibility polymorphism requires more detailed investigation [6].

In this work we have developed a comparative proteomics approach using the larval stages of *S. mansoni* of compatible and incompatible parasite strains. This proteomics approach was undertaken to identify molecules playing a central role in this compatibility polymorphism. Our data show qualitative and quantitative differences between the primary sporocyst proteomes of the two strains. The identified proteins belong to three main functional groups involved in scavenging of reactive oxygen species, in metabolism, and finally a family of proteins resembling mucins. The putative roles played by these different proteins as determinants of compatibility polymorphism are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Host and parasite strains and experimental procedures

Two strains of *S. mansoni* were used in this study, a compatible Brazilian (C) strain and an incompatible Guadeloupean (IC) strain. Each was maintained (i) in their sympatric strain of *B. glabrata* and (ii) in hamsters (*Mesocricetus auratus*) as described previously [7]. Miracidia from *S. mansoni* C and IC were hatched from eggs axenically recovered from 50-day infected hamster livers according to previously described procedures [8]. Briefly, livers were collected and kept in sterile saline 0.85%, containing an antibiotic/antimycotic mixture (penicillin 100 units/ml, streptomycin 0.1 mg/ml, amphotericin 0.025 μg/ml; Sigma). The livers were homogenized and the eggs were filtered and washed to obtain miracidia. Miracidia were concentrated by sedimentation on ice for 1 h and directly submitted to *in vitro* transformation to obtain primary (mother) sporocysts (Sp1) [9]. Miracidia were cultured in sterile Chernin's balanced salt solution (CBSS) [10] and the antibiotic/antimycotic mixture at 26 °C under atmospheric conditions. Full transformation of miracidia to Sp1 occurred within the first 24 h in culture [11]. After 24 h sporocysts were spun down (600 × *g* for 5 min) to remove the supernatant culture medium and the sporocyst pellet was directly submitted to DNA, RNA or protein extractions.

2.2. Histological procedure

A histological approach was conducted to investigate and describe the fate of *S. mansoni* sporocysts from both strains in the molluscan host (Brazilian strain). *B. glabrata* (Brazil strain, shell diameters between 7 and 10 mm) were infected using 10 miracidia from *S. mansoni* C or IC strains. Molluscs (10 per condition), for 1, 2, 4, 8, and 24 h post-infection, were kept in beakers with 250 ml of bi-distilled water containing a menthol crystal for anaesthesia. The shells of the animals were then removed and snails were fixed in 10% formaldehyde for 1 week. Once dehydrated, the snails were transferred to 100% butanol before embedding in paraffin. Histological sections of the whole specimens, 10-μm thick, were cut and stained using Haemalum and Eosin (HE) prior to microscopic analysis.

2.3. Protein extraction, separation, detection and identification

2D gels of 10 independent samples per strain were run. Batches of sporocysts originating from different hamster livers were used. Living Sp1 were resuspended in 2D lysis buffer (8 M urea, 40 mM Tris, 4% CHAPS, 60 mM DTT) and incubated 2 h at room temperature to extract the total protein content. The cell lysate was centrifuged at 15,000 × *g* to pellet remaining cells and nuclear material. The protein concentration was assayed using the 2D Quant Kit (Amersham) and 100 μg of protein were loaded on the first dimension on 17 cm Ready Strips IPG Strips, pH 3–10 non-linear gradient (Bio-Rad). Isoelectrofocusing (IEF) was performed as previously described [12] with a gradually increasing voltage to 8000 V and running for 180,000 V h at 20 °C. Second dimension SDS-PAGE electrophoresis was performed and proteins were visualized by silver staining [13]. 2D gels were scanned using a densitometer (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad). Although the silver stain is the most sensitive currently available, the protocol can generate staining differences within and between gels, notably in the case of background staining. Thus to avoid spurious differences, gels with similar spot intensities and background coloration were selected using an analytical approach. The density of 11 spots, present in all gels and distributed evenly over the entire gel surface was measured. The degree of similarity between gels was then obtained using a hierarchical classification procedure using the statistical software SPSS 10.0 (SPSS Inc.). A hierarchical tree was constructed and a group of the 10 most related gels (5 gels per strain) was selected to perform the comparative proteomic approach. Replicate proteome images for *S. mansoni* C and IC were aligned and matched to generate a composite map image for each strain. Comparative analysis of digitized proteome maps was performed using the image analysis software PDQuest 7.4.0 (Bio-Rad). Significant differences between the patterns and/or intensities (at least twofold) of protein spots in Sp1 C and IC proteomes were identified by pair-wise comparisons of spots between gel images. Differences were tested by quantitative real-time PCR (see below).

Gel plugs containing the proteins of interest were excised from a gel that was silver-stained by a method compatible with mass spectrometry [14]. Plugs were processed and characterized by nanoscale capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC–MS/MS) as described previously [12,15,16]. NanoLC–MS/MS analysis of the digested proteins was performed using a capillary LC system coupled to a LCQ Deca XP$^+$ Thermo-electron tandem mass spectrometer [17,18].

The resulting peptide MS/MS spectra were processed and converted into "Merge" peak lists format using the SEQUEST algorithm for interrogation of protein or nucleotide sequence databases (MSDB, dbEST) using MASCOT (http://www.matrixscience.com/). One or two missed

cleavages per peptide were allowed and some variable modifications were taken into account in the search such as carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine, histidine or tryptophan, and phosphorylation of serine, threonine or tyrosine. Searches were performed without constraining protein molecular weight or isoelectric point. A protein was considered to be correctly identified if at least two peptides were confidently matched with database sequences. An overall MASCOT score of greater than 50 was considered significant ($p < 0.05$) [19].

2.4. RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR

Total RNA extractions from Sp1 were performed using the Trizol Reagent (Invitrogen) and the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed according to previously described procedures [20]. Real-time PCR analysis of gene expression was done on cDNAs coding for the proteins identified in the proteomic approach as described before [20]. Primers for real-time quantitative PCR were designed with the Light Cycler Probe Design™ version 1.0. Primers for ornithine amino-transferase (OAT), superoxide dismutase Cu/Zn (SOD), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), myosin light chain (MyoLC), proteasome alpha subunit (α-SubProt), ribosomal protein P2 (Ribo-P2) and for the 28 s ribosomal gene (Ribo s28) used as a control, are shown in Table 1.

2.5. Gene characterization and protein primary structure analysis

ESTs (GenBank dbEST of *S. mansoni* 162,839 sequences) identified from MASCOT analysis were assembled with Sequencher™ (Gene Codes Corporation). Complete CDSs were found for all proteins identified in the comparative analysis except the mucin-like proteins [21].

To characterize potential polymorphisms and difference between strains in the ornithine amino-transferase (OAT) and creatine kinase (CK) genes, complete CDSs in Sp1 of the C and IC strains were amplified using the following primers (*OATCDSF1* AAATCACCGCACAGATTGTTCAAG, *OATCDSR1* GCATAGTTGTATGTTTTTCCTGTG, *CKCDSF1* GTGCACAATCAGAATGCAGGTTG, and *CKCDSR1* ATATGTACCATCAGGGGATTCTG). PCR products were ligated into the pCR2.1-TOPO™ vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Plasmids were sequenced with M13 forward and reverse primers using a dideoxy-dye-terminator method (CEQ™ DTCS-Quick Start kit, Beckman Coulter) and a CEQ™ 8000 capillary sequencer (Beckman Coulter).

Based on complete CDSs, primary structure analyses were performed using ProtFun 2.2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/) and SignalP 3.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Specific active domain searches were done using ScanProsite (http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/) and MotifScan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). Expected molecular weights (MW) and isoelectric points (p*I*) were calculated using Scansite (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) (see Table 2). When necessary multiple alignments were realized using ClustalW 1.7 (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/).

3. Results

3.1. Histological study of the encapsulation process

We observed that miracidia of compatible (C) and incompatible (IC) strains of *S. mansoni* penetrate the snail epithelium in a similar manner (same number of larvae, same speed of entry). Nevertheless, drastic differences were evident between C and IC strains in the first hour after penetration. Parasites from the IC strain were immediately recognized by haemocytes that were in contact with the surface of the parasites 1 h post-infection (data not shown) and sporocysts were entirely encapsulated 4–8 h post-infection. At this stage, sporocysts were clearly degraded (Fig. 1B). Most sporocysts lacked tegumental cytoplasm. Germinal cells and other internal structures showed extensive pathological changes (increase of intercellular spaces and pycnotic nuclei). In contrast, miracidia of the C strain remained unaffected and did not undergo encapsulation, no haemocytes were observed close to the sporocysts. Normal developing Sp1 structures were observed (Fig. 1A). In addition, miracidia of the C strain attained deeper regions in the organs of *B. glabrata* than did the IC strain. It is apparent that fast encapsulation of IC strain miracidia after penetration prevents larvae from moving further into the snail tissues. C strain parasites then pursued normal growth and development (data not shown). Our results suggest constitutive antigenic differences between strains that allow immediate recognition, encapsulation and killing of parasites of the IC strain. These antigenic differences were investigated in the global comparative proteomics approach developed here.

3.2. Global comparative proteomics approach

Proteomic studies have been used to study molecules involved in the host–parasite interplay in *Schistosoma*. Most of these previous studies were done on adult worms interacting with the vertebrate host [22–24]. Here we compared Sp1 proteomes from the *S. mansoni* C and IC strains. Five independent samples for each strain were separated on 2D gels and representative gels are shown in Fig. 2. Samples were compared using the 2D gel analysis software package PD Quest and spots with more than twofold differences in intensity were examined individually. Spots of interest were excised from the gels and identified by mass spectrometry. The results are listed in Table 2; for both strains, names of proteins identified in databases, species and Genbank accession numbers are shown. The number and sequences of identified peptides, the MASCOT score and the coverage of the protein are also reported. Where possible, theoretical values for molecular weight (MW) and isoelectric point (p*I*) were calculated using the Scansite program and these values were compared to the position on the gel.

Our qualitative and quantitative analyses showed that patterns and/or intensities of 23 spots were different between Sp1 C and

Table 1
Primers used for quantitative real-time PCR

Gene name	Primer forward	Primer reverse
Ornithine amino-transferase (OAT)	TGCCCGGATTTGTCAC	ACAGCGGATACTGGAAG
Superoxide dismutase Cu/Zn (SOD)	AGTGGACTCAAGGCTG	CCACGGCCTAAATCAT
Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GCGAGGTTTCGACTGA	AACAACGAACATGGGTG
Myosin light chain (MyoLC)	ATGGTCGAGATGGTATGA	AGCATAGGTGCCAGTT
Proteasome alpha subunit (α-SubProt)	GCTGTGAGTAACTTGGC	GCACCTTCACTACCAGA
Ribosomal protein P2 (Ribo-P2)	CGTGATGCGTTACTTGG	TGACATCTGCTTGCGG
28 s ribosomal (Ribo s28)	GCTGTAGTGGATCTGTGC	CTACGTCATGGGACGG

IC proteomes (Fig. 2B). Among these 23 spots, 11 were present solely in the C strain (7719, 7720, 7721, 7723, 7322, 0729, 0719, 0723, 0539, 0505, and 0508), and 6 in the IC strain (7704, 7705, 7706, 7727, 0726, and 0534) (Fig. 2B). Concerning the quantitative differences, 5 spots of the C strain (0011, 1123, 5019, 6219, 0017) showed a greater than twofold increase in intensity compared to the IC strain and one IC strain spot (1749) was present in at least double the amount seen in the C strain (Fig. 2B and Table 2).

3.3. Characterization of proteins resulting from the comparative proteomic analysis

Three of the spots respectively specific for the C strain (7719, 7720, and 7721) or for the IC strain (7704, 7705, and 7706) could not be identified.

3.3.1. Proteins involved in metabolism

3.3.1.1. Creatine kinase. Spots 7723 to 7727 were identified as *S. mansoni* creatine kinase (*Sm*CK) (Fig. 2). ScanProsite revealed the presence of a specific active domain of the enzyme family: the ATP: guanido phosphotransferases (Prosite #: PS00112). Analysis of the *Sm*CK precursor by ProtFun 2.2 predicts a cytosolic or mitochondrial localization. This is in agreement with previous studies in other species [25]. In each strain a train of 4 spots was observed on the 2D gel. Their position is in agreement with the theoretical molecular weight calculated from the deduced amino acid sequence. Nevertheless, a shift to a more acidic p*I* in the IC strain enzymes distinguishes them from the C strain *Sm*CKs (Fig. 2B and Table 2). The observed p*I* shift could be due to different post-translational modifications of these *Sm*CK in the strains.

This hypothesis is strengthened by previous data showing that mammalian CK is extensively autophosphorylated [26] and this could also be the case for *Sm*CK. The addition of phosphate groups on proteins does not change the MW (at least not sufficiently to be visible on 2D gels), but drastically changes the isoelectric point. The result is a stretch of spots commonly called a "phosphorylation train", the number of spots depending on the number of phosphates that the proteins carry [27]. These trains were observed in our gels and differential levels of phosphorylation could explain the observed shift.

In addition, *Sm*CK cDNA sequencing in the C and IC strains revealed differences in the deduced amino acid sequence: N15S; K252R; G493D for C versus IC strain, respectively (GenBank accession numbers: EU042595 and EU042596). These differences do not change the theoretical MW (76.7 kDa for the 2 strains), but the calculated p*I* is more acidic for *Sm*CK from the IC strain (C: 8.08; IC: 7.87). In addition, the difference at N15 (S in the IC strain) provides an additional putative phosphorylation site (NetPhosK 1.0 phosphorylation prediction server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/)). Taken together, these data provided a possible basis to explain the shift in p*I* values observed for *Sm*CK.

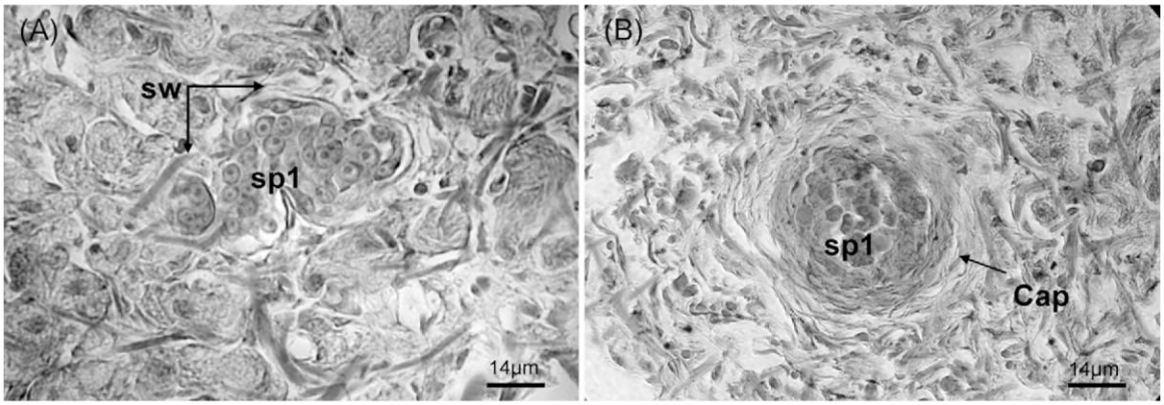


Fig. 1. Histological sections of *S. mansoni* Sporocysts (Sp1) in a compatible (C strain) host–parasite combination (A) or in an incompatible (IC strain) host–parasite combination (B) located in head-foot tissues of *B. glabrata* snails (Brazil strain) 6 h post-infection. (A) Normal developing sporocyst (Sp1) structures, sporocyst wall (sw) is intact; no haemocytes present in the vicinity of the sporocyst. (B) The sporocyt is encapsulated by hemocytes (cap = capsule), the sporocyst wall is already clearly degraded and most of sporocyst cells are destroyed.

Table 2
Protein identification in a comparative screen between Sp1 C strain and Sp1 IC strain of *Schistosoma mansoni*

Function	Spot #	Protein name	Strain	Fold change	Species	Accession #[a]	MW (kDa) (exp/obs)[b]	pI (exp/obs)[b]	Coverage (%)	Peptides #	Peptides Sequence data	Mascot score
Metabolism	7723	Creatine kinase	C		*S.mansoni*	CD092123	73/75	8.7/8.7	30	7	LIEGINAIGK QLVEDHFLFK DAGGYRDWPVGR IISMQQGGNLAAVYK IISMQQGGNLAAVYK[c] YGYITCCPSNLGTSMR[d] FAHSDKYGYITCCPSNLGTSMR[d]	285
	7727	Creatine kinase	IC		*S.mansoni*	CD085199	73/75	8.7/8.1	3	2	LPFGDLDPTGK TVEGFGFGPTLTK	121
	7322	Ornithine aminotransferase	C		*S.mansoni*	CD064137	47/48	8.5/8.4	41	7	TQSETLTLTSR VIFAEGNFWGR VLPMNSGVEAGETSIK VLPMNSGVEAGETSIK[c] YGAHNYHPLPVALSK AFYNVCLGEFEEMAAK[d] AFYNVCLGEFEEMAAK[d,c]	287
	6219	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	C/IC	+2.7	*S.mansoni*	AI067530	36/37	8.1/7.8	42	7	AGISLNNNFVK VVDLITHMHK GAMQNIIPASTGAAK GAMQNIIPASTGAAK[c] LVSWYDNEFGYSCR[d] GILEYTEDEVVSSDFVGSTSSSIFDAK GILEYTEDEVVSSDFVGSTSSSIFDAK	276
Antioxidant	5019	Superoxide dismutase Cu/Zn	C/IC	+2.2	*S.mansoni*	AM043786	16/16	6.1/6.3	35	7	LACGVVGLAAE[d] AVCVMTGTAGVK[d] AVCVMTGTAGVK[d,c] TMVIHENEDDLGR TMVIHENEDDLGR[c] FTQETDNGPVHVHAEFSGLK HVGDLGNVVAGADGNAVYNATDK	283
Host–parasite interaction	0729	*S.m*Mucin-like	C		*S.mansoni*	CD161554	nd/110	nd/3.7	23	6	RDWSGLLR WAVHYLSK IEAQLNIVK EQYYEAYSTLAK SLKEQYYEAYSTLAK QLTNTENKIEAQLNIVK	246
	0719	*S.m*Mucin-like	C		*S.mansoni*	CD161554	nd/100	nd/3.9	17	4	WAVHYLSK IEAQLNIVK EQYYEAYSTLAK SLKEQYYEAYSTLAK	146
	0723	*S.m*Mucin-like	C		*S.mansoni*	CD119636	nd/90	nd/4.1	17	3	WAVHYLSK FLSLEPYTR APQIYHEECLR[d]	100
	1749	*S.m*Mucin-like	C/IC	−6.7	*S.mansoni*	CD161554	nd/80	nd/4.3	23	5	WAVHYLSK IEAQLNIVK EQYYEAYSTLAK SLKEQYYEAYSTLAK QLTNTENKIEAQLNIVK	159

Table 2 (*Continued*)

Function	Spot #	Protein name	Strain	Fold change	Species	Accession #[a]	MW (kDa) (exp/obs)[b]	pI (exp/obs)[b]	Coverage (%)	Peptides #	Peptides Sequence data	Mascot score
	0539	*S.m*Mucin-like	C		*S.mansoni*	CD119646	nd/57	nd/3.3	28	5	WAVHYLSK FLSLEPYTR APQIYHEECLR[d] EILDDVESAYIAEPR APQIYHEECLRLEK[d]	212
	0505	*S.m*Mucin-like	C		*S.mansoni*	CD119646	nd/58	nd/3.4	21	3	WAVHYLSK APQIYHEECLR EILDDVESAYIAEPR	170
	0508	*S.m*Mucin-like	C		*S.mansoni*	CD119624	nd/53	nd/3.4	26	4	WAVHYLSK FLSLEPYTR APQIYHEECLR[d] EILDDVESAYIAEPR	184
	0726	*S.m*Mucin-like	IC		*S.mansoni*	AA140578	nd/120	nd/3.5	33	3	ILLLTTLPK MIIQAMDKDSTNCS[d] ILLLTTLPKDEQIK	120
	0534	*S.m*Mucin-like	IC		*S.mansoni*	CD119646	nd/55	nd/3.4	31	6	LYFTK WAVHYLSK FLSLEPYTR APQIYHEECLR[d] EILDDVESAYIAEPR EREILDDVESAYIAEPR	221
Other functions	0017	Myosin light chain	C/IC	*+2.1*	*S.mansoni*	AW017362	18/18	4.7/4	54	11	FIDLR LEDPEVDAILK EGQGFISAAEMR EGQGFISAAEMR[c] CSGINPTIALTVK[d] ETGTYADYMEAFK ETGTYADYMEAFK[c] FDEFLPCYEAILK[d] EDLDGNIKYEELIK EDLDGNIKYEELIK CSGINPTIALTVKHGATIK[d,e]	386
	1123	Proteasome alpha subunit	C/IC	*+2.2*	*S.mansoni*	T14568	27/25	5.2/5.2	26	4	GVNTFSPEGR VNSTLIIPSSIEK LFQVEYAIEATK RVNSTLIIPSSIEK	196
	0011	Ribosomal protein P2	C/IC	*+9.7*	*S.mansoni*	AI067566	12/16	4.7/3.5	23	3	DIPQLIAEGSKK TVLNSVGIEHDSER TVLNSVGIEHDSERLEK	152

nd: not determined.
[a] Genbank accession number.
[b] Expected and observed molecular weight (MW) and isoelectric point (p*I*) for each identification.
[c] Methionine oxidation.
[d] Cysteine carbamidomethylation.
[e] Serine/threonine phosphorylation.

3.3.1.2. Ornithine aminotransferase. Spot 7322 was present solely in the C strain (Fig. 2) and was identified as an ornithine aminotransferase (*Sm*OAT; GeneDB #: Smp_000660). The calculated theoretical MW and p*I* based on protein primary structure are in good agreement with the position in the gel (Table 2). ScanProsite revealed the presence of the co-enzyme (pyridoxal phosphate) fixation site (Prosite #: PS00600). The alignment of *Sm*OAT with OAT of other species revealed conservation of the amino acids involved in the active site and tertiary conformation [28] (data not shown). No signal peptide was predicted by SignalP 2.0, in agreement with the mitochondrial localization of the enzyme (ProtFun 2.2) [28]. Ornithine aminotransferase plays a central role in ornithine biosynthesis [29]. The absence of *Sm*OAT in the *IC* strain is therefore surprising. To verify differences between C and IC strains, we investigated *Sm*OAT transcription levels (Fig. 3). Both strains expressed OAT, with a slightly, but not significantly, higher level in the C strain. In order to characterize this gene further, we sequenced C and IC *Sm*OAT cDNA obtained by PCR using primers flanking the *Sm*OAT CDS. Sequencing revealed differences in the deduced amino acid sequence: N30S; E122K, for C versus IC strain, respectively (GenBank accession numbers: EU042597 and EU042598). These differences do not change the theoretical MW (48.5 kDa for the 2 strains) but change the calculated p*I* value, for the C strain p*I* = 8.83 and p*I* = 8.97 for the IC strain. This shift in p*I* value could explain why *Sm*OAT was identified solely in C strain (Fig. 2).

3.3.1.3. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Sm*GAPDH; GeneDB #: Smp_056970.1; spot 6219) is over-expressed in strain C (Table 2). The enzyme active site was identified by ScanProsite (Prosite #: PS00071). Alignment of the protein CDS with GAPDHs from various other organisms confirmed the presence of conserved amino acids involved in the catalytic domain, cysteine 153 of the active site, and the domains associated with the binding of NAD^+ [30] (data not shown). GAPDH is involved in the Embden–Meyerhof–Parnas pathway. In this pathway, the glyceraldehyde 3-phosphate generates a high-potential phosphorylated compound, the 1,3-bisphosphoglycerate. This compound is formed by the action of the GAPDH producing concomitantly NADH.

3.3.2. Antioxidant enzymes

3.3.2.1. Superoxide dismutase. Spot (5019), was over-expressed in the C strain (Fig. 2B, Table 2) and was identified as Cu/Zn superoxide dismutase (*Sm*SOD; GeneDB #: Smp_176200.2). Two characteristic active sites of the enzyme were revealed using ScanProsite: two histidines (H45 and H47) are involved in copper binding (Prosite #: PS00087), and cysteines (C57 and C145) form disulfide bonds that are involved in the tertiary structure of the protein (Prosite #: PS00332) [31]. The calculated MW of 16 kDa and the expected p*I* of 6.3 are in good agreement with the position of the protein in the gel (Fig. 2B, Table 2). SOD is involved in oxidative stress scavenging and its specific actions will be described in the Section 4 of the paper.

3.3.3. Molecules involved in host–parasite interaction

3.3.3.1. Mucins. Spots 0719, 0729, 0723, 0539, 0505, and 0508 are solely present in the C strain and spots 0726 and 0534 are exclusively present in the IC strain. Spot 1749 is over-expressed in IC (Fig. 2B, Table 2). These nine proteins represent the main difference between the Sp1 C and IC proteomes. ESTs identified from MASCOT analysis were assembled using Sequencher^{TM}, and partial CDSs were deduced. Comparison of this nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence with databases (Basic BLAST; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) revealed no similarities with known sequences.

A series of complete cDNAs were obtained and we provide a comprehensive description of these proteins in another article [21]. Briefly, the protein consists of an N-terminal signal peptide (22 amino acids) and a conserved C-terminal region. The N-terminal structure of the deduced protein shows internal tandem repeats of nine amino acids enriched in serine, threonine, and proline residues that potentially serve as a scaffold for the extensive addition of O-glycans. This particular feature relates them to the group of mucin-like molecules in mammals, and other parasites [32,33]. These proteins were thus named *S. mansoni* mucin-like proteins (*Sm*Mucin-like).

3.3.4. Proteins with other functions

3.3.4.1. Myosin light chain. Protein spot 0017 was over-expressed in the C strain and was identified as a myosin light chain (*Sm*MyoLC; GeneDB #: Smp_045220.1) (Fig. 2B, Table 2). ScanProsite revealed the presence of two EF-hand calcium-binding domains (prosite #: PS50222). The position of the protein in the gel corresponds to the calculated MW and p*I*.

3.3.4.2. Proteasome alpha subunit. Spot 1123 was over-expressed in the C strain and corresponds to the Proteasome alpha subunit (*Sm*α-SubProt; GeneDB #: Smp_032580.2) (Fig. 2B, Table 2). ScanProsite identified the specific signature of a proteasome subunit (Prosite #: PS00388). The theoretical MW and p*I* based on the protein primary structure are in good agreement with the position in the gel (Table 2). No signal peptide was detected by SignalP 2.0 which is in agreement with the predicted cytosolic or nuclear localization of the protein (ProtFun 2.2) [34].

3.3.4.3. Ribosomal protein P2. This protein (spot 0011), over-expressed in C (Table 2), was identified as ribosomal protein P2 (*Sm*Ribo-P2; GeneDB #: Smp_029820). The MotifScan tool revealed the presence of specific signature of 60s acidic ribosomal protein in the Pfam motif database (Pfam #: PF00428.9). The Ribosomal P2 protein belongs to this ribosomal protein family. A signal peptide was predicted by SignalP 2.0 HMM with a cleavage site between residues 18 and 19. Calculated MW and p*I* based on protein primary structure do not correspond to the position in the gel for either strain (Table 2). This could be related to

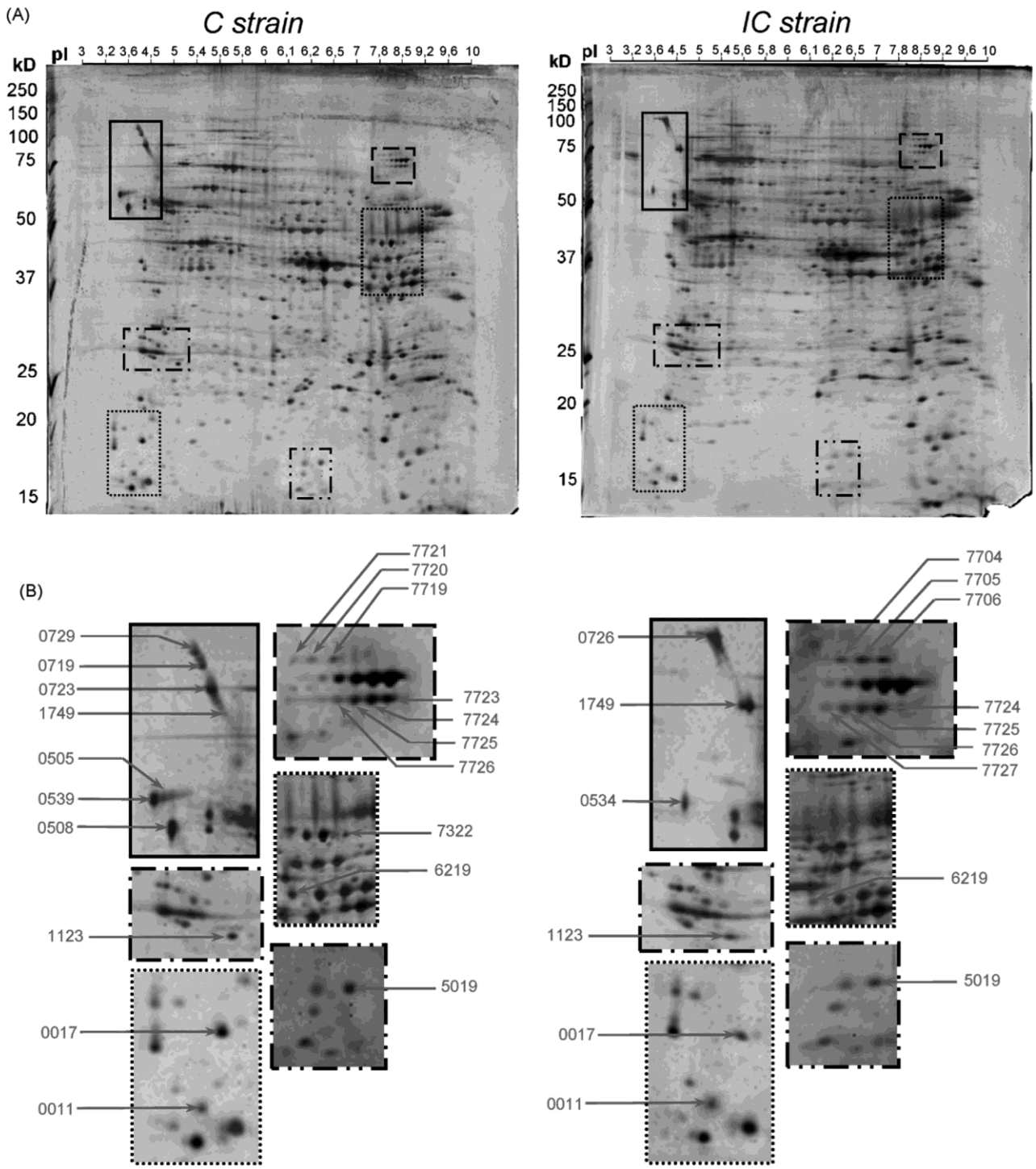


Fig. 2. (A) Proteomic profiles of sporocyst total proteome from *S. mansoni* C and IC strains. (B) High magnification of gel areas showing the qualitative and quantitative differences underlined using PDQuest image analysis software (see Table 2). *X*-axis is the isoelectric point scale (p*I*). *Y*-axis is the molecular weight scale in kDa. Proteins were focused using a 3–10 non-linear pH range as the first dimension and a 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as the second dimension. Gels were silver-stained.

post-translational modifications resulting in an increase of MW and acidification.

3.4. Quantitative real-time PCR

To confirm differences shown by the comparative proteomics approach for MyoLC, Ribo-P2, α-SubProt, GAPDH, and SOD, we investigated their transcript levels in sporocysts from the two strains, using quantitative RT-PCR on total RNA from 10 000 sporocysts. None of the 5 transcripts showed significant differences in transcript levels (Fig. 3). However, post-transcriptional or post-translational modifications cannot be excluded, and could explain the observed differences in protein expression. In the light of the small differences observed for these five pro-

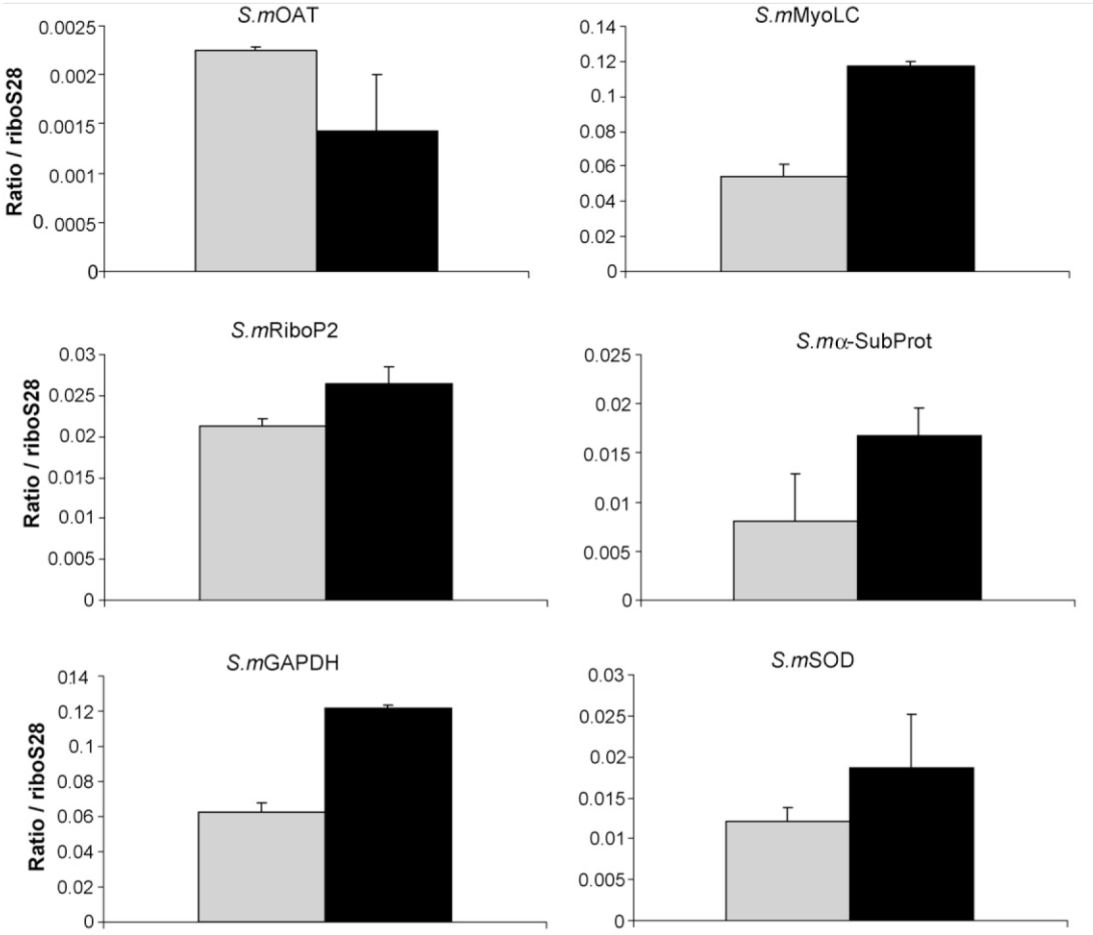


Fig. 3. Ratios of transcripts corresponding to *S.m*OAT, *S.m*MyoLC, *S.m*Ribo-P2, *S.m*α-SubProt, *S.m*GAPDH, and *S.m*SOD. Transcript levels in sporocysts (Sp1) from *S. mansoni* C strain (grey histograms) and *S. mansoni* IC strain (dark histograms) were measured using real-time quantitative PCR and are shown relatively to S28 expression levels (ratio/riboS28). Each histogram is the average value of duplicates ±S.D.

teins, the significance of which for host-compatibility remains to be determined, we decided to focus our further work on the principal difference between the C and IC strain: the *Sm*Mucin-like gene family.

4. Discussion

During the life cycle of *S. mansoni*, Sp1 larval stages develop in the mollusk intermediate hosts. Parasites need to penetrate into this host, develop, multiply asexually and finally leave the host to continue their life cycle [35,36]. Parasites therefore face many challenges such as gaining enough energy to grow and to evade the defense system of the host [37–39]. In parallel, hosts have to co-evolve with their parasites to avoid being infected. This evolutionary battle leads to an arms race between host and parasites. In our model, this struggle results in compatibility polymorphism [5]. In natural populations some snail/schistosome combinations are compatible and others are not.

In compatible interactions, the parasite penetrates and develops normally within the snail, giving rise to the next parasite stage, the cercariae. Alternatively, in incompatible interactions, the larval trematode penetrates but is immediately recognized as non-self, encapsulated and destroyed by the mollusk's internal defense system. The success or failure of an infection does not depend on the snail susceptibility/resistance status, but on the "matched" or "mismatched" status of the host and parasite phenotypes ("matching phenotype" hypothesis, [5]). Indeed, many fundamental studies [4] have been conducted on compatibility polymorphism, but the molecular basis of this polymorphism has rarely been studied and needs to be investigated [6].

In the *S. mansoni/B. glabrata* interaction, incompatible miracidia are recognized as non-self and encapsulated in the first few hours following penetration. Compatible strains remain unaffected. These observations suggest constitutive antigenic differences between strains that are responsible for the compatibility polymorphism. To identify and characterize the underlying molecular determinants, we conducted a global comparative proteomic approach using primary sporocysts (Sp1) from C and IC strains. Our findings reveal several qualitative and quantitative differences, and we discuss here their putative involvement in compatibility polymorphism.

We found several proteins that are involved in oxidative stress scavenging processes. All these proteins (*Sm*SOD, *Sm*GAPDH, and *Sm*α-SubProt) are over-represented in strain C. Host haemocytes generate oxidative stress by producing reactive oxygen

species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2) [40]. *Sm*SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) into hydrogen peroxide (H_2O_2) and O_2. H_2O_2 is the most toxic oxygen species for *S. mansoni* sporocysts [40]. But, SOD also has a peroxidative activity that uses its own dismutation product, H_2O_2, as a substrate to produce the hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) [41,42]. Using its peroxidative function, SOD could inactivate H_2O_2 and produce $^{\bullet}OH$ that is less toxic for the sporocysts [40]. Another protein that could be involved in detoxification of ROS is *Sm*GAPDH. *Sm*GAPDH is involved in the Embden–Meyerhof–Parnas pathway. In this pathway, glyceraldehyde 3-phosphate generates a high-potential phosphorylated compound, 1,3-bisphosphoglycerate by the reduction of NAD^+ to NADH. Recently, we have put forward the hypothesis that this synthesis of NADH could be involved in the cell redox cycle [9,43]. In many other parasites, glycolysis is involved in the defence against oxidative stress [44,45]. Finally, *Sm*α-SubProt is part of a proteolytic complex, the proteasomal system, which is the major proteolytic system responsible for the removal of oxidized cytosolic proteins. One of the hallmarks of oxidative stress is the accumulation of oxidized proteins, which tend to form high-molecular weight aggregates. The major proteolytic system responsible for the removal of oxidized cytosolic and nuclear proteins is the proteasome [46]. Over-expression of *Sm*α-SubProt in the C strain could be a sign of a higher proteolytic activity of the proteasomal system acting as secondary antioxidant system that maintains the integrity of cell homeostasis. The over-expression of these proteins in the C strain is in favor of a model in which a more active oxidative stress scavenging system provides a better cellular antioxidant defense for the parasite. This would allow sporocysts to combat the first line of the host's internal defense system, and to pursue their development in the snail host.

The qualitative difference in *Sm*OAT expression observed in this study (Fig. 2) appears to be related to a shift in p*I* value. RT-PCR shows that both strains express *Sm*OAT at similar levels, and cDNA sequencing revealed amino acid changes in the deduced sequence of the precursor protein. The apparent absence of *Sm*OAT in IC is therefore certainly due to a p*I* modification that changes the position in the gel. Frameshift and point mutations in the ornithine aminotransferase gene were reported in the literature and possible effects of these events on the structural stability or the catalytic competence of the enzyme were discussed [28]. Ornithine aminotransferase plays a central role in ornithine biosynthesis [29] catalyzing the transfer of the delta-amino group of L-ornithine to 2-oxoglutarate, producing L-glutamate-gamma-semialdehyde, that in turn spontaneously cyclizes to pyrroline-5-carboxylate, and L-glutamate. This is the first step of metabolic processes in Krebs cycle and neoglucogenesis [47]. Differences in amino acid sequence could result in *Sm*OAT activity differences between strains, but this remains to be investigated.

We have identified another protein that is known to be involved in a metabolic process, *Sm* Creatine kinase (*Sm*CK). CK participates in temporal ATP buffering, in regulating inorganic phosphate (Pi) levels, which play a key role in glycogenolysis and proton buffering, and CK has a role in intracellular energy transport. CK is an enzyme that catalyses the reversible transfer of the high-energy phosphoryl group of phosphocreatine to ADP and regenerates ATP [25,48]. CK is able to autophosphorylate *in vitro* [26] and the addition of a variable number of phosphate groups leads to a spot train like that observed in this study (Fig. 2). CK phosphorylation affects enzyme activity by modulating the reversibility of the CK reaction [26]. After autophosphorylation, the forward reaction is far more inhibited than the reverse reaction towards ATP synthesis. For *Sm*CK a p*I* shift of the train was observed between C and IC strain. We hypothesize that this shift is associated with differential levels of phosphorylation between strains. Given the impact of phosphorylation on CK activity, we propose different energetic and metabolic capacities for the C and IC strains.

Finally, our comparative proteomics approach unearthed an unusual family of proteins that are promising candidates as key elements in the host compatibility mechanism. Blast searches found no similarities with proteins of known function. However, amino acid sequences deduced from EST assemblies revealed structural features characteristic of mucins from other parasites or from mammals [32,33]. The N-terminal part of the precursor showed internal tandem repeats of nine amino acids containing serine, threonine, and proline residues that could serve as a scaffold for the addition of O-glycans. This particular feature relates them to the group of mucin-like molecules.

Mucins are known to play a key role in host–parasite interplay and are involved in immune evasion, host invasion and parasite protection [33,49–51]. The surface of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is covered by GPI anchored mucins, which might provide protection against the vector and/or vertebrate host defence mechanisms [51]. Cleavage of the GPI anchor mucins by phosphatidylinositol-phospholipase C results in the shedding of mucins into the parasite environment. Immunogenicity of mucin carbohydrate epitopes might thus be used as an immunological decoy to form immunocomplexes with antibodies and block the opsonisation process [51]. This phenomenon was also described for other parasite species. Secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* create a "smoke screen" that prevents deleterious antigen recognition [50,52].

The *Sm*Mucine-like proteins are therefore good candidates as key determinants of compatibility polymorphism in the *S. mansoni*/*B. glabrata* interaction. *Sm*Mucin-like are the proteins (9 spots out of 23) that clearly distinguish compatible and incompatible parasite strains. This pronounced qualitative and quantitative polymorphism (Fig. 2, Table 2) and the fact that mucins are known to interact with host molecules [33] leads us to hypothesize that *Sm*Mucin-like could be recognized as "self" molecules by the host (molecular mimicry hypothesis), or alternatively could avoid recognition of the parasite by the host (smoke screen hypothesis).

The proteomic approach conducted here has lead to the identification of proteins putatively involved in the compatibility polymorphism. Several proteins involved in oxidative stress scavenging and metabolic processes were discovered but the most promising candidates are proteins belonging to the mucin family. These *Sm*Mucin-like constitute candidates of choice as molecular determinants of compatibility poly-

morphism and could represent the molecular basis of the "matching-phenotype" hypothesis developed by Theron and Coustau [5]. The polymorphism of these *Sm*Mucin-like that distinguishes compatible and incompatible parasite strains led us to investigate in more detail the role played by this protein family. Studies on *Sm*Mucin-like precursor structure, analysis of mucin-like expression and polymorphism are comprehensively described in a paper presented in the same issue [21].

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS. The mass spectrometry facility used in this study was funded by the European Community (FEDER), the Region Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, the Genopole of Lille and the University of Sciences and Technologies of Lille. We are grateful to Adeline Page (Lille University), for performing mass spectrometry analysis. We thank Bernard Dejean, Rémi Emans and Pierre Tisseyre, for technical assistance and Dr. R.J. Pierce, for his critical reading of the manuscript.

References

[1] Chitsulo L, Loverde P, Engels D. Schistosomiasis. Nat Rev Microbiol 2004;2:12–3.
[2] Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. Lancet 2006;368:1106–18.
[3] El-Ansary A, Al-Daihan S. Important aspects of *Biomphalaria* snail–schistosome interactions as targets for antischistosome drug. Med Sci Monit 2006;12:RA282–92.
[4] Webster JP, Davies CM. Coevolution and compatibility in the snail–schistosome system. Parasitology 2001;123(Suppl.):S41–56.
[5] Theron A, Coustau C. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? J Helminthol 2005;79:187–91.
[6] Lewis FA, Patterson CN, Knight M, Richards CS. The relationship between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*: genetic and molecular approaches. Parasitology 2001;123(Suppl.):S169–79.
[7] Theron A, Pages JR, Rognon A. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. Exp Parasitol 1997;85:1–9.
[8] Mattos AC, Kusel JR, Pimenta PF, Coelho PM. Activity of praziquantel on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;101(Suppl. 1):283–7.
[9] Guillou F, Roger E, Mone Y, et al. Excretory–secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. Mol Biochem Parasitol 2007;155:45–56.
[10] Chernin E. Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus*. J Parasitol 1963;49:353–64.
[11] Coustau C, Mitta G, Dissous C, et al. *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni* excretory–secretory products differentially affect gene expression in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. Parasitology 2003;127:533–42.
[12] Vergote D, Bouchut A, Sautiere PE, et al. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. Int J Parasitol 2005;35:215–24.
[13] Patton WF. Detection technologies in proteome analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002;771:3–31.
[14] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem 1996;68:850–8.
[15] Bouchut A, Sautiere PE, Coustau C, Mitta G. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. Acta Trop 2006;98:234–46.
[16] Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. Mol Cell Proteomics 2007;6:88–101.
[17] Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. Annu Rev Biochem 2001;70:437–73.
[18] Ashton PD, Curwen RS, Wilson RA. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. Trends Parasitol 2001;17:198–202.
[19] Kayser JP, Vallet JL, Cerny RL. Defining parameters for homology-tolerant database searching. J Biomol Tech 2004;15:285–95.
[20] Guillou F, Mitta G, Dissous C, Pierce R, Coustau C. Use of individual polymorphism to validate potential functional markers: case of a candidate lectin (BgSel) differentially expressed in susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2004;138:175–81.
[21] Roger E, Gourbal BEF, Grunau C, Pierce RJ, Galinier R, Mitta G, Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite Schistosoma mansoni, Mol Biochem Parasitol 2007, doi:10.1016/j.molbiopara.2007.11.015, in press.
[22] Liu F, Lu J, Hu W, et al. New perspectives on host–parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. PLoS Pathog 2006;2:e29.
[23] Liu F, Hu W, Cui SJ, et al. Insight into the host–parasite interplay by proteomic study of host proteins copurified with the human parasite *Schistosoma japonicum*. Proteomics 2007;7:450–62.
[24] Perez-Sanchez R, Ramajo-Hernandez A, Ramajo-Martin V, Oleaga A. Proteomic analysis of the tegument and excretory–secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. Proteomics 2006;6(Suppl. 1):S226–36.
[25] Ellington WR. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Annu Rev Physiol 2001;63:289–325.
[26] Stolz M, Hornemann T, Schlattner U, Wallimann T. Mutation of conserved active-site threonine residues in creatine kinase affects autophosphorylation and enzyme kinetics. Biochem J 2002;363:785–92.
[27] Carter MD, Southwick K, Lukov G, Willardson BM, Thulin CD. Identification of phosphorylation sites on phosducin-like protein by QTOF mass spectrometry. J Biomol Tech 2004;15:257–64.
[28] Shen BW, Hennig M, Hohenester E, Jansonius JN, Schirmer T. Crystal structure of human recombinant ornithine aminotransferase. J Mol Biol 1998;277:81–102.
[29] Gafan C, Wilson J, Berger LC, Berger BJ. Characterization of the ornithine aminotransferase from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 2001;118:1–10.
[30] Jenkins JL, Tanner JJ. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006;62:290–301.
[31] Cardoso RM, Silva CH, Ulian De Araujo AP, Tanaka T, Tanaka M, Garratt RC. Structure of the cytosolic Cu, Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2004;60:1569–78.
[32] Van Klinken BJ, Dekker J, Buller HA, Einerhand AW. Mucin gene structure and expression: protection versus adhesion. Am J Physiol 1995;269:G613–27.
[33] Theodoropoulos G, Hicks SJ, Corfield AP, Miller BG, Carrington SD. The role of mucins in host–parasite interactions. Part II. Helminth parasites. Trends Parasitol 2001;17:130–5.
[34] Castro-Borges W, Cartwright J, Ashton PD, et al. The 20S proteasome of *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis. Proteomics 2007;7:1065–75.
[35] Davies SJ, Mckerrow JH. Developmental plasticity in schistosomes and other helminths. Int J Parasitol 2003;33:1277–84.
[36] Parker GA, Chubb JC, Ball MA, Roberts GN. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. Nature 2003;425:480–4.
[37] De Jong-Brink M, Bergamin-Sassen M, Solis Soto M. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. Parasitology 2001;123(Suppl.):S129–41.
[38] Meuleman EA, Bayne CJ, Van Der Knaap WP. Immunological aspects of snail–trematode interactions. Prog Clin Biol Res 1987;233:113–27.
[39] Van Der Knaap WP, Loker ES. Immune mechanisms in trematode–snail interactions. Parasitol Today 1990;6:175–82.

[40] Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 2001;87:778–85.
[41] Kim SM, Kang JH. Peroxidative activity of human Cu, Zn-superoxide dismutase. Mol Cells 1997;7:120–4.
[42] Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. J Biol Chem 1993;268:4099–105.
[43] Kum-Tatt L, Tan IK, Seet AM. A new colorimetric method for the determination of NADH/NADPH-dependent glutathione reductase in erythrocytes and in plasma. Clin Chim Acta 1975;58:101–8.
[44] Cordeiro AT, Michels PA, Delboni LF, Thiemann OH. The crystal structure of glucose-6-phosphate isomerase from *Leishmania mexicana* reveals novel active site features. Eur J Biochem 2004;271:2765–72.
[45] Roth Jr E. *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. Blood Cells 1990;16:453–60 [discussion 461–6].
[46] Bader N, Grune T. Protein oxidation and proteolysis. Biol Chem 2006;387:1351–5.
[47] Haslett MR, Pink D, Walters B, Brosnan ME. Assay and subcellular localization of pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in rat liver. Biochim Biophys Acta 2004;1675:81–6.
[48] Stein LD, Harn DA, David JR. A cloned ATP:guanidino kinase in the trematode *Schistosoma mansoni* has a novel duplicated structure. J Biol Chem 1990;265:6582–8.
[49] Hicks SJ, Theodoropoulos G, Carrington SD, Corfield AP. The role of mucins in host–parasite interactions. Part I. Protozoan parasites. Parasitol Today 2000;16:476–81.
[50] Rathore D, Nagarkatti R, Jani D, et al. An immunologically cryptic epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and induces protective antibodies that block liver cell invasion. J Biol Chem 2005;280:20524–9.
[51] Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. Nat Rev Microbiol 2006;4:229–36.
[52] Loukas A, Hintz M, Linder D, et al. A family of secreted mucins from the parasitic nematode Toxocara canis bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. J Biol Chem 2000;275:39600–7.

A Large Repertoire of Parasite Epitopes Matched by a Large Repertoire of Host Immune Receptors in an Invertebrate Host/Parasite Model

Yves Moné[1], Benjamin Gourbal[1], David Duval[1], Louis Du Pasquier[2], Sylvie Kieffer-Jaquinod[3], Guillaume Mitta[1]*

1 Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5244, CNRS Université de Perpignan, Perpignan, France, **2** University of Basel, Institute of Zoology and Evolutionary Biology, Basel, Switzerland, **3** Laboratoire d'étude de la dynamique des protéomes CEA-DSV/IRTSV, Grenoble, France

Abstract

For many decades, invertebrate immunity was believed to be non-adaptive, poorly specific, relying exclusively on sometimes multiple but germ-line encoded innate receptors and effectors. But recent studies performed in different invertebrate species have shaken this paradigm by providing evidence for various types of somatic adaptations at the level of putative immune receptors leading to an enlarged repertoire of recognition molecules. Fibrinogen Related Proteins (FREPs) from the mollusc *Biomphalaria glabrata* are an example of these putative immune receptors. They are known to be involved in reactions against trematode parasites. Following not yet well understood somatic mechanisms, the FREP repertoire varies considerably from one snail to another, showing a trend towards an individualization of the putative immune repertoire almost comparable to that described from vertebrate adaptive immune system. Nevertheless, their antigenic targets remain unknown. In this study, we show that a specific set of these highly variable FREPs from *B. glabrata* forms complexes with similarly highly polymorphic and individually variable mucin molecules from its specific trematode parasite *S. mansoni* (*Schistosoma mansoni* Polymorphic Mucins: *Sm*PoMucs). This is the first evidence of the interaction between diversified immune receptors and antigenic variant in an invertebrate host/pathogen model. The same order of magnitude in the diversity of the parasite epitopes and the one of the FREP suggests co-evolutionary dynamics between host and parasite regarding this set of determinants that could explain population features like the compatibility polymorphism observed in *B. glabrata*/*S. mansoni* interaction. In addition, we identified a third partner associated with the FREPs/*Sm*PoMucs in the immune complex: a Thioester containing Protein (TEP) belonging to a molecular category that plays a role in phagocytosis or encapsulation following recognition. The presence of this last partner in this immune complex argues in favor of the involvement of the formed complex in parasite recognition and elimination from the host.

Citation: Moné Y, Gourbal B, Duval D, Du Pasquier L, Kieffer-Jaquinod S, et al. (2010) A Large Repertoire of Parasite Epitopes Matched by a Large Repertoire of Host Immune Receptors in an Invertebrate Host/Parasite Model. PLoS Negl Trop Dis 4(9): e813. doi:10.1371/journal.pntd.0000813

Editor: Matty Knight, Biomedical Research Institute, United States of America

Received June 18, 2010; **Accepted** August 6, 2010; **Published** September 7, 2010

Copyright: © 2010 Moné et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the ANR (grant 25390 Schistophepigen), the CNRS and the UPVD. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mitta@univ-perp.fr

Introduction

Understanding host-parasite interactions represents a major challenge in evolutionary biology. Parasites cause substantial deleterious effects on their hosts, and therefore represent a major driving force for their evolution [1]. In parallel, parasites have to cope with the evolving host-defence mechanisms, i.e. they must co-evolve with their host to avoid elimination. This antagonistic co-evolution in host-parasite interactions can be illustrated by an arms race in which both host and parasite develop mechanisms to circumvent weapons developed by their opponent. In this context, evolutionary hypotheses like the Red Queen Hypothesis [2] predict that diversity and polymorphism of molecules occurs especially on molecules that play key roles in the host-parasite interplay [3].

In vertebrate host/parasite interactions, adaptive immunity is the ultimate outcome of this molecular arms race. Vertebrates possess an extraordinary system able to generate somatically an exceptional diversity of antigen-specific receptors [4,5,6]. It consists in a 'do-it-yourself kit', i.e a set of gene segments to be assembled during the ontogeny of lymphocyte that randomly generates receptors. This adaptive immune system can recognize and initiate a protective response against most of the pathogen/antigen encountered. Indeed, gnathostomes as well as agnathes, seem to be able to generate a highly diverse repertoire of lymphocytes, each bearing a different cell surface antigen receptor [7,8]. The interaction of the lymphocyte receptor with the epitope present on the antigen leads to a signal transduction and eventually to an effector phase leading to the neutralization or the destruction of the antigen. These diversified immune receptors can be different between vertebrate lineages. They are members of the immunoglobulin superfamily for B or T Cell Receptors in gnathostomes and members of the leucine rich repeat family or Variable Lymphocyte Receptors in agnathans, but in all cases they are generated through recombinatorial processes occurring somatically during lymphocyte differentiation and proliferation. The convergent evolution in all vertebrates of these different genes leading to the acquisition of a vast repertoire of somatically

Author Summary

Contrary to the traditional view that immunity in invertebrates is limited to innate mechanisms, recent studies have shown that these several species of protostome invertebrates express putative immune receptors that can be somatically diversified in a way resulting in an analogy with Immunoglobulins or T Cell Receptors of vertebrate species. Other studies have shown the existence of putative antigenic variant counterparts in their specific parasite, as would be expected in an "arms race" between both protagonists. However, the interaction between these immune receptors and antigens was never demonstrated in an interaction involving an invertebrate and its specific pathogen. We demonstrate such an interaction in the present study. We show that a specific set of highly variable immune receptors of the mollusc *Biomphalaria glabrata* forms immune complexes with highly polymorphic and individually variable mucin determinants from its specific trematode parasite *S. mansoni*. We demonstrate for the first time in an invertebrate host-parasite interaction that a large repertoire of parasite epitopes matched a large repertoire of host immune receptors.

generated receptors proves the high selective value of this mechanism in the living kingdom and suggests that it might be found elsewhere. For the pathogen counterparts, a variety of mechanisms permitting evasion of the host's immune response exist in pathogenic bacteria and viruses [9]. But as expected in an arms race perspective, diversity, polymorphism and variation of antigens from pathogen is a widespread strategy also described (i) from numerous pathogens belonging to distant evolutionary lineages [10] and (ii) for most of the eukaryotic parasites [11].

In the case of invertebrate hosts and their parasites, the picture was believed to be completely different since the prevailing view was that invertebrates have no acquired adaptive immunity, and their immune system being innate would exhibit less diversity of the receptor repertoire and hence less specificity. The detection of parasites by these organisms was believed to rely exclusively on invariable germline-encoded immune receptors that recognize microbial antigens to limit pathogen invasion [12]. Recent studies have somehow shaken this paradigm. They report the existence of polymorphic and diversified putative immune receptor sequences that are somatically generated, that varies considerably from one individual to the other and that leads to an enlarged repertoire of putative recognition molecules. This was reported in echinoderms (sea urchin; [13]), insects (*Drosophila melanogaster and Anopheles gambiae*; [14,15]), crustaceans [16] and molluscs (*Biomphalaria glabrata*; [17]). These studies have suggested the existence of a form of specific adaptative immunity in several invertebrates, without providing mechanism, which raised some doubts in the mind of traditional immunologists (for the polemic see [18,19]). In addition, the direct proof of a role in immunity of these molecules is not provided. Do these diversified molecules actually interact with antigens? Are they able to interact with antigenic variants from parasites that are expected, in an arms race perspective, to be diversified and/or polymorphic? We propose to address this last crucial question in the present study.

As a model we choose the interaction between the trematode *Schistosoma mansoni* and its mollusc host *Biomphalaria glabrata*, in which several pieces of exciting data were obtained. Firstly, incubations of *B. glabrata* plasma extracts and soluble antigens from trematodes led to the formation of molecular complexes [20,21]. *B. glabrata* molecules involved in these complexes were characterized, they were called FREPs for Fibrinogen Related Proteins [21]. The *FREP* genes belong to a multigene family of at least fourteen members [22,23]. FREPs consist of one or two amino-terminal IgSF domains and a carboxyl-terminal fibrinogen domain. These molecules undergo apparently somatic variations leading to a remarkable diversification [17]. The superimposition of allelic polymorphism and somatic processes can lead to the expression of 45 isoforms of FREP3 per individual [17]. These genes encode lectin-like hemolymph polypeptides that are able to bind to *E. paraensei* sporocysts and a variety of microbes [24]. However the ligands themselves are still mysterious. FREP expression increases in response to challenge with the trematode parasites, *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni* [21,25]. In the parasite *S. mansoni*, we identified recently polymorphic mucins [26]. They were called *Sm*PoMuc (for *S. mansoni* Polymorphic Mucins). They display a high level of intra- and inter-strain polymorphism due to a complex hierarchical system that efficiently generates polymorphic variants based on a relatively low number of genes [27]. We hypothesise that these mucins could contain the epitopes that interact with the immune receptors from *B. glabrata* and make the hypothesis that FREPs are among those receptors.

To test this hypothesis we developed two assays. Firstly, we developed a global proteomic approach to the interactome between parasite extracts and plasma extracts from the mollusc host. Co-incubation and precipitation of this total extract led to the identification of *Sm*PoMucs and FREPs in the same fraction. Secondly, the direct interaction of these two partners was confirmed by Co-Immunoprecipitation experiments using antibodies raised specifically against *Sm*PoMuc. Another interesting partner was coimmunoprecipitated in the same molecular complex. It corresponds to a putative opsonin, the ThioEster-containing Protein from *B. glabrata*.

Materials and Methods

Accession numbers

Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank database under the accession numbers: HM003905 to HM003908, HM038098 to HM038105 and HM237113 to HM237135.

Host and parasite strains and protein sample preparation

Ethics statement. Our laboratory has received the permit N° A 66040 for experiments on animals from both French Ministère de l'Agriculture et de la Pêche and French Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie. Housing, breeding and animal care of the mice followed the ethical requirements of our country. The experimenter possesses the official certificate for animal experimentation delivered by both ministries (Décret n° 87–848 du 19 octobre 1987; number of the authorization 007083).

Parasite and host breeding and *in-vitro* culture procedures. Two strains of *S. mansoni* were used in this study, a Brazilian strain and a Guadeloupean strain the first of which is compatible (C strain) and the second of which is incompatible (IC strain) with a single Brazilian mollusc strain [28]. Each strain was maintained in (i) their sympatric strain of *B. glabrata* and in (ii) hamsters (*Mesocricetus auratus*) as described previously [28]. Miracidia from *S. mansoni* C and IC were hatched from eggs axenically recovered from 60-days infected hamster livers, according to the previously described procedure [26]. Briefly, livers were collected and kept overnight at 4°C in sterile saline solution (NaCl 150 mM), containing an antibiotic/antimycotic

mixture (penicillin 100 units/ml, streptomycin 0.1 mg/ml, amphotericin B 0.25 µg/ml; Sigma). The livers were then homogenized and the eggs were filtered and washed. Miracidia were hatched from eggs in sterile water. Miracidia were recovered by pipetting and concentrated by sedimentation on ice for 1-h and directly submitted to *in vitro* transformation to obtain primary sporocysts (Sp1) [29]. Miracidia were cultured at 26°C in sterile Chernin's balanced salt solution (CBSS, [30]) containing the antibiotic/antimycotic mixture previously described [31]. Full transformation of miracidia to Sp1 occurred within 24 hours. Sporocysts were spun down (600 g for 5 min) and frozen at −80°C.

Native extraction of sporocysts. For each strain, 40,000 sporocysts were resuspended in 200µl TBS containing tween 20 (0.05%, v/v) and antiprotease cocktail (complete protease inhibitor cocktail, Roche). Then, they were submitted to sonication (Vibracell 75185 apparatus, 4 pulses of 20 seconds at 20% of amplitude on ice). Twenty µl of glass beads were added and the sample was vortexed (2700 rpm; 30 min; 4°C) and centrifuged (6000g; 30 min; 4°C). The supernatant was recovered and conserved at −80°C. The total protein amount present in the final sporocyst sample was determined with 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences).

Plasma protein recovery. Hemolymph of two hundred Brazilian *B. glabrata* snails (BgBRA) (9–13 mm) was extracted as previously described [32]. It represents a total volume of 20ml approximately. A centrifugation (3000g; 10min; 4°C) was performed to pellet hemocytes and the plasma recovered (supernatant). Then, haemoglobin was removed from plasma using an ultra-centrifugation procedure (55 000 rpm; 2.5 hours; 4°C). Quantification of total protein concentration was performed with the 2-D Quant Kit (Amersham Bioscience). Plasmas were conserved at −80°C.

S. mansoni/B. glabrata interactome experiments

Fifty µg of sporocyst extracts from C or IC strain and 750µg of plasma extracts were used for each interactome experiment. After thawing, extracts were submitted to a centrifugation step of 7 500g for 30 min at 4°C. The supernatants were recovered, mixed and incubated at 26°C for 2.5 hours. After incubation precipitated materials were recovered by two successive centrifugation steps at 7 500g and 15 000g for 30 min and at 4°C. The same procedure was realised with sporocyst and plasma extracts alone to identify proteins precipitating spontaneously. Precipitated proteins were resuspended in 7µl of UTCD (8M urea, 40 mM TRIS, 4% CHAPS, 60 mM DTT), 3µl of laemmli buffer 3× was added and precipitates were analysed by SDS-PAGE. Gels were silver stained using a staining procedure compatible with mass spectrometry analysis [33].

Production and purification of recombinant SmPoMuc and co-immunoprecipitation

Construction of expression vector and production of recombinant *Sm*PoMuc1. The last 699 bp sequence of *Sm*PoMuc1 (GenBank accession number: EU042599) encoding the constant C-terminal region (from amino acid 199 to amino acid 432) was amplified and cloned into the NheI/SacI sites of the pET200/D-TOPO expression vector in frame with a hexahistidine tag (Invitrogen). Briefly, the 699 bp cDNA fragment of *Sm*PoMuc1 (r*Sm*PoMuc) was obtained using a standard amplification reaction with the following primers containing NheI or SacI restriction sites (5′ primer : CTA-CTA-CTA-gct-agc-GTT-CCA-GAA-CAT-TTG-AAA-ACG-A and 3′ primer ATT-ATT-ACA-gag-ctc-ATC-AGC-TGC-AAT-TGG-TTG-AAT-CTT). Transformation of the plasmid construct was done in TOP10 chemically competent *E. coli* cells (Invitrogen) and sequencing was performed using T7 forward and reverse primers to verify its open reading frame.

For production of r*Sm*PoMuc-tagged protein, plasmid construct was transformed into Bl21 (DE3) *E. coli* competent cells. Transformed bacteria were grown in LB broth medium with kanamycin (50µg/ml) at 28°C. For protein expression, induction was performed when OD600 culture reached 0.5 by addition of IPTG at 0.7 mM and maintained overnight at 16°C.

The expressed recombinant protein was purified by IMAC using a Ni-NTA column under native conditions as recommended by the manufacturer (Invitrogen). Briefly, BL21 *E. coli* cultures expressing r*Sm*PoMuc were lysed under 20 mM imidazole and sonicated (15 pulses of 20 seconds at 97% of amplitude) on ice. The lysate was then centrifuged at 3000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was added to 0.75 ml of packed nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose resin. The supernatant/resin mixture was incubated at room temperature for 20 minutes under shaking. Ni-NTA resin was washed using 4 different pH and imidazole steps (pH 8.0/20mM; pH6.0/50mM; pH 5.5/20mM; pH 8.0/20mM). r*Sm*PoMuc bound to Ni-NTA resin was then eluted with 150 mM imidazole at pH 8.0. Eluted r*Sm*PoMuc was further purified by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) gel filtration on Superose 10/300 GL column (GE Healthcare) and concentrated on Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit 10 K NMWL (Millipore).

The purified His6-tagged r*Sm*PoMuc was then used to raise the anti-*Sm*PoMuc polyclonal antibody.

Production and purification of polyclonal antibodies against SmPoMuc1. An anti-r*Sm*PoMuc1 specific rabbit polyclonal antibody was produced according to standard procedures (Genepep, France). Briefly, 150 ìg of purified r*Sm*PoMuc (1mg/ml) was mixed with an equal volume of Freund's complete adjuvant and injected into 2 New Zealand white rabbits. Before the first injection of purified recombinant protein, 5 ml of blood was used to derive the pre-immune serum from the same rabbits. Four boosts of 150 ìg of recombinant protein were performed every 2 weeks following the primary injection. One week after the last injection, antiserum of rabbit was collected. The sensivity and specificity of this antiserum were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot. The titer of the rabbit immune serum was closed to 1/35000 (ELISA). No signal was obtained by ELISA (dilution 1/30) and western blot (dilution 1/500) with the pre-immune serum. Antiserum and pre-immune serum were precipitated by saturated ammonium sulfate and then purified by Protein A affinity chromatography. The specificity of the purified antibodies were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot.

Co-immunoprecipitation. Co-immunoprecipitation was accomplished using an antibody-coupling gel to precipitate the bait protein (sporocyst *Sm*PoMuc) and co-immunoprecipitate the interacting prey proteins. Anti-r*Sm*PoMuc antibody was coupled to an amine-reactive gel (ProFound co-immunoprecipitation kit, Pierce) overnight using slow agitation at room temperature.

Two different experimental procedures were used to isolate the bait and prey protein. During the first procedure, native sporocyst protein extract (50 µg) of C or IC strain were incubated with mollusc plasma extract (250 µg) for 2.5 hours at 26°C under slow agitation. Afterwards, the mix was passed through the anti-r*Sm*PoMuc-Coupled Resin. In the second experimental approach, the bait protein (sporocyst *Sm*PoMucs) was immobilized to anti-r*Sm*PoMuc-Coupled Resin and used to capture its partner passing

the snail plasma through the resin. Co-immunoprecipitated proteins were then eluted using IgG elution buffer (Pierce), lyophilised and re-suspended in Laemmli buffer. As controls, the same procedures were performed using sporocyst extracts and plasma alone.

The eluted proteins were separated on a 12% SDS-PAGE. Gels were stained with silver according to a method compatible with mass spectrometry [33] or submitted to western-blot to confirm the presence of *Sm*PoMucs. The procedure was described in a previous study [34]. Briefly, after gel transfer to nitrocellulose, membranes were blocked, probed with anti-r*Sm*PoMuc (1/1000 dilution) and revealed with horse radish peroxidase anti-rabbit IgG (1/5000 dilution) using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce).

Mass spectrometry analysis

The procedure used was previously described [26,32,35]. Bands containing the proteins of interest were excised from gels and digested with trypsin. Eluated peptides were lyophilised and analysed by mass spectrometry (EDyP Service laboratory, Grenoble, France). Peptides were analysed using a nanoscale capillary liquid chromatography Ultimate 3000 coupled to a LTQ-Orbitrap tandem mass spectrometer (nanoLC–MS/MS) (Mann M et al 2001; Ashton PD et al 2001). The resulting MS/MS spectra were processed and converted into peak lists in dta format using the SEQUEST algorithm for interrogation of protein or nucleotide sequence databases. Peptide masses were compared to virtual tryptic digestion of proteins from SwissProt-Trembl (other metazoan database) and to translated Expressed Sequences Tags database (dbEST) of *S.mansoni* (205 892 Ests) and *B.glabrata* (54 305 Ests) using Mascot (http://www.matrixscience.com/). No missed cleavages were allowed and some variable modifications were taken into account in the search such as Acetylation (Protein N-term), Oxidation and Dioxidation (M), and Trioxidation (C). Searches were performed using an error on experimental peptide mass values of ± 15.0 ppm and an error for MS/MS fragment ion mass values of 1.0 Da.

Mascot results were validated using IRMa software (interpretation of Mascot results) developed by "EDyP Service" laboratory. IRMa avoids redundant proteins in the analysis and reduced false positive to less than 1%. A protein was considered to be correctly identified if at least two peptides were confidently matched with database sequences with a p-value$<$0.001 for each peptide. In addition, an overall Mascot score was given by the software to the identification, a score greater than 100 was considered significant ($p<0.05$, [36]).

Cloning and sequencing of TEP and FREP2

The complete open reading frame (ORF) of BgTEP and FREP2 from our laboratory *B. glabrata* BRA strain were amplified using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). In order to investigate the variability of FREP2 sequences, total RNA was extracted individually from 5 snails (whole bodies) (9–13 mm). Concerning BgTEP, total RNA was extracted from a pool of five snails. Total RNA extractions from snails were performed using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Total RNA (2 µg) were reverse transcribed with oligo $d(T)_{17}$ primers and Superscript II reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Two µl of the RT reaction was then used for PCR experiments with the following primers corresponding to:

- TEP cDNA (GenBank accession number : FJ480411). 5′ primer: ATG-AGA-ATG-AAG-CTG-AAT-TTG-ATT-TT; 3′ primer: CTA-TGG-GCA-ACA-GTT-GAG-GCA-AAC-ATC.

- FREP2 cDNA (GenBank accession number : AY012700). 5′ primer: ATG-GCG-TCG-CTA-CCA-CTT-CGA-CTT-GTT-C ; 3′ primer: TTA-GTT-TAG-CTC-TAT-TTC-TCT-AAT-TTT-C. The PCR was performed using Advantage 2 PCR Enzyme System (Clontech).The PCR products were amplified, purified and cloned into pCR4-TOPO vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Clones were then sequenced using GATC facilities (GATC Biotech, Germany). Thirty four sequences of FREP2 were analysed from the five separated individuals. Five clones were sequenced for BgTEP.

Bioinformatic analysis

All sequence identified from databases or obtained in the present study were imported in the sequencer software (version 4.5). They were aligned and contiged. Primary structure analyses were performed using SignalP 3.0 to predict the presence of signal peptide, NetNglyc 1.0 and NetOGlyc 3.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/) to predict potential glycosylation sites. Putative proteolytic cleavage sites were predicted using PeptideCutter (http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/) program. Protein domain searches were performed using SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/). An unrooted phylogenetic tree was constructed (based on the multiple alignment performed with ClustalW) using the neighbour-joining method with MEGA 4.0.2. [37]. The reliability of the tree was tested using a bootstrap test (1000 replicates). Recombinatorial events in BgBRA-FREP2 were investigated using Dna SP 5.10 software [38].

Results

An approach designed to identify immune complexes in S. mansoni/B. glabrata interaction

We incubated (i) extracts prepared from parasite sporocysts (intramolluscal stage of *S. mansoni*) and (ii) extracts from *B. glabrata* plasma known to contain Pattern Recognition Receptors like FREPs [21] and other lectins [39,40]. We use sporocyts from two laboratory strains of *S. mansoni* (C and IC for Compatible and InCompatible, respectively) for these experiments. Both strains were chosen for this differential compatibility in the single host mollusc strain from Brazil. [26]. The C strain infects 100% of the molluscs when 10 miracidia per individual are used for infection. An average number of 3.6 sporocysts develop in the mollusc [28]. The IC strain infects only 4% of the molluscs using the same conditions.

After incubation of host and parasite extracts, precipitated products were pelleted by centrifugation and analysed by SDS-PAGE. Different centrifugation speeds were used as well as different controls consisting in incubation and centrifugation of plasma or sporocyst extracts alone. The electrophoretic profiles of precipitate materials are shown in figure 1.

Gel analysis revealed that 29 bands were differentially represented between interaction experiments and controls (Figure 1). These bands were cut. The corresponding proteins were submitted to tryptic digest and analysed by tandem mass spectrometry for identification. Thirty proteins were identified - among them 20 are *S. mansoni* proteins (Table 1) and 10 are from *B. glabrata* (Table 2). During the experimental procedure, extracts were incubated 2.5 hours at 26°C. We cannot exclude the fact that proteolysis occurs. This phenomenon could explain why sometimes these multiple bands were obtained for the same proteins.

S. mansoni proteins can be classified mainly into 5 groups taking into account their putative function and/or structural features: glycoproteins; calcium binding proteins; chaperone/stress proteins; antioxidant enzymes and proteins involved in immune regulation (Table 1). As far as *B. glabrata* proteins are concerned,

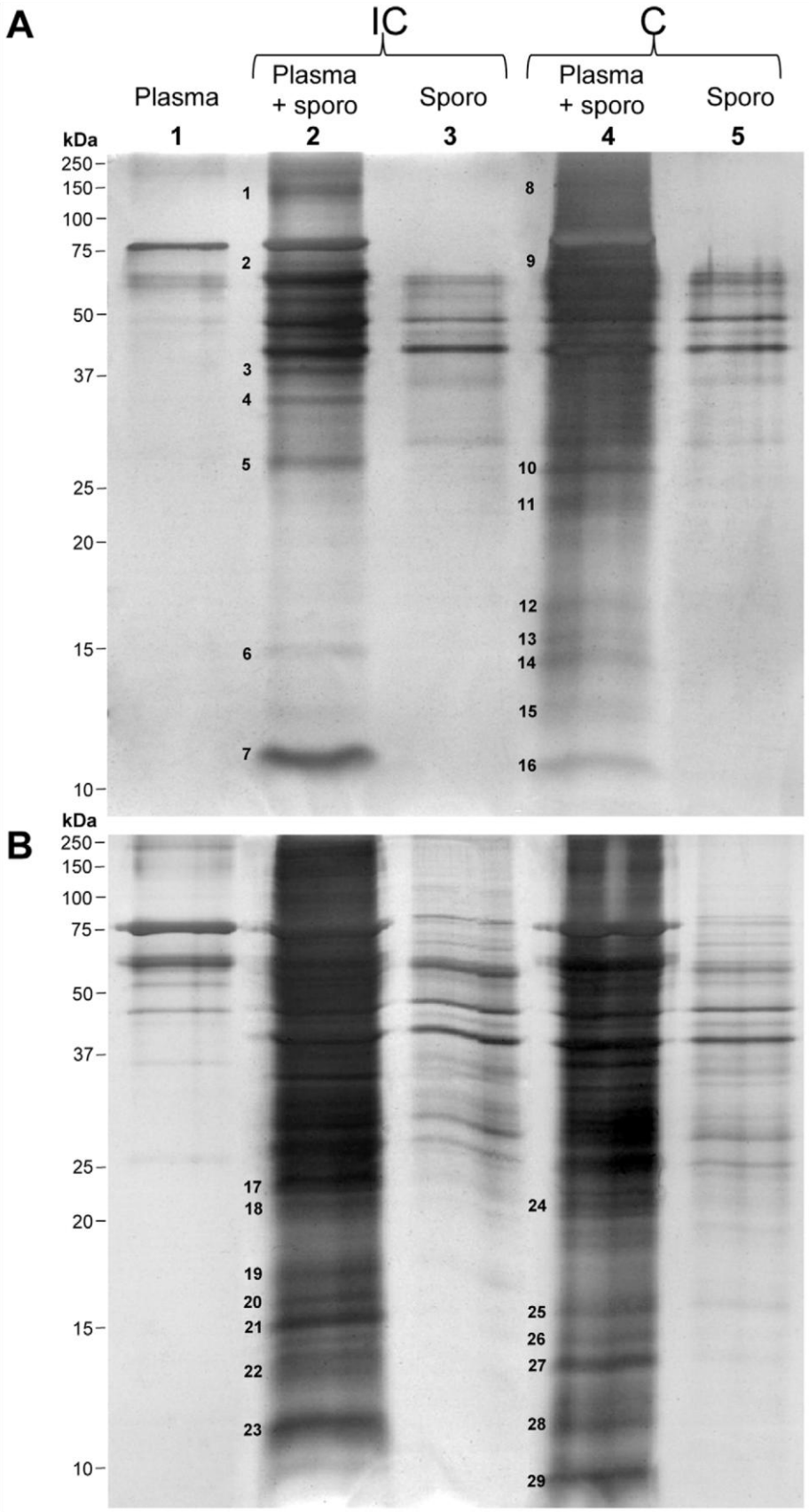

A
IC
C
Plasma
Plasma + sporo
Sporo
Plasma + sporo
Sporo
kDa
1
2
3
4
5
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
B
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

Figure 1. Interactome experiments. Precipitated proteins were pelleted using two centrifugation speeds and separated on 12.5% SDS-PAGE before silver staining. (**A**) 7 500g and (**B**) 15 000g. Compatible (C) or incompatible (IC) sporocyst (sporo) extracts and snail plasma were incubated together (lanes 2 and 4) or alone (controls, lanes 1, 3 and 5). Bands that differ between control and interactome experiments are numbered. These bands were cut, proteins submitted to tryptic digest and analysed by mass spectrometry for identification.
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.g001

they correspond mainly to lectins or other proteins listed in Table 2.

The functions of the majority of the proteins identified are speculative because they are inferred from homologies with known molecules from other organisms after BLAST analysis and protein domain searches. Nevertheless, some of them are of particular interest in the present context, especially lectins from the host and glycoproteins from the parasite. Indeed host recognition molecules (like lectins) and carbohydrate containing molecular determinants from *S. mansoni* are excellent candidates for participating in an immune complexe. Several molecules belonging to these functional classes were identified. In *B. glabrata*, the FREPs [17,21], and another putative lectin, a galactose binding-like, were clearly identified (Table 2). Different FREP family members were revealed using mass spectrometry. Among the peptides identified, some of them correspond specifically to FREP2, FREP12 and FREP13 (see Figure 2 for details).

In *S. mansoni*, *Sm*PoMucs were precipitated (Table 1). As *Sm*PoMuc group 1-specific peptides were identified, the presence of the *Sm*PoMuc from the first group is affirmed (see Figure 3 for peptides identified). Nevertheless, we cannot exclude the presence of *Sm*PoMuc from the two other groups in the precipitated material (3 groups of *Sm*PoMucs were previously characterised see [34]. Other glycoproteins like the secretory glycoprotein K5 and the 23 kDa integral membrane protein (Sm23) from *S. mansoni* were also identified [41,42].

Other proteins were identified that could be involved in protection of the parasite or in host immune response. Their putative role will be envisaged in the discussion.

Table 1. *Schistosoma mansoni* interactome identification.

Function	Gel band no.	Protein ID	Accession no. (MSdb; *Sm*-dbEST)	Species	Strain	# of Peptides	Score
Glycoprotein	1-8	*Schistosoma mansoni* polymorphic mucin (*Sm*PoMuc)	A7UAX8_SCHMA, gi|166320028	*S.mansoni*	C/IC	6	340.44
	19	Secretory glycoprotein k5	Q2KMI8_SCHMA	*S.mansoni*	IC	5	214.28
	11-17-18-24	23 kDa integral membrane protein (Sm23) (tetraspanin)	gi|34654103, gi|34683177, gi|75967629	*S.mansoni*	C/IC	4	372.08
Calcium Binding Protein (EF-hand)	21-22-28	Egg Antigen SME 16	gi|166272806, gi|166281868, gi|166336526	*S.mansoni*	C/IC	6	524.34
	7-16-23-28-29	Tegument associated antigen	gi|34624832	*S.mansoni*	C/IC	5	272.88
	12-19	Antigen SM 20	gi|34726371	*S.mansoni*	C/IC	3	133.43
Chaperone Stress Protein	2-9	Heat shock protein HSP60	Q8MXA4_SCHMA, gi|75967703, gi|75968414, gi|34699546	*S.mansoni*	C/IC	18	1209.82
	10-11-14-18-22-27-28	Heat shock 70 kDa	gi|34662357, gi|34617312, gi|34732332, gi|34613005, gi|34627204, gi|34618891	*S.mansoni*	C/IC	13	940.55
	2-9	T-complex protein 1 subunit alpha	TCPA_SCHMA	*S.mansoni*	C/IC	10	714.09
	9	Heat shock protein 86	Q26582_SCHMA	*S.mansoni*	C	7	497.13
Anti-oxidant Enzyme	11-17-24	Thioredoxine peroxidase 3	gi|86548802, gi|5869153, gi|86551428	*S.mansoni*	C/IC	6	421.03
	10-24	Glutathione-S-transferase 26kDa	gi|34669417, gi|166288290	*S.mansoni*	C	5	322.44
	12-19-25	Gluthatione peroxidase	gi|34625624, gi|34610915, gi|166333339	*S.mansoni*	C/IC	4	284.83
	11-17-18-24	Thioredoxine peroxidase	gi|86548129, gi|86550734, gi|34624053	*S.mansoni*	C/IC	3	238.87
	23-29	Thioredoxin	gi|34670675	*S.mansoni*	C/IC	3	219.65
	5-10	Glutathione-S-transferase 28kDa	gi|166265034, gi|12353926	*S.mansoni*	C/IC	3	168.42
Immune Regulation Molecule	19-22-26-28	*Sm*SPO-1	gi|166340572	*S.mansoni*	C/IC	3	175.31
Other Function	10	Leucine rich repeat (LRR)	gi|86548857	*S.mansoni*	C	5	387.17
	1	major vault-like protein	gi|72291614	*S.mansoni*	IC	4	286.43
	26	GRIM-19-like protein	gi|86552247	*S.mansoni*	C	3	235.61

LC-MS/MS results were used to interrogate Swiss prot/Trembl database (MSdb) and *Schistosoma mansoni* ESTs database (dbEST). A protein was considered to be correctly identified if at least two peptides were confidently matched with a score greater than 100. ID: identified, C: compatible combination, IC: incompatible combination.
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.t001

Table 2. *Biomphalaria glabrata* interactome identification.

Function	Gel band no.	Protein ID	Accession no. (MSdb; *Bg*-dbEST)	Species	Interaction with	# of Peptides	Score
Lectin	1-8	Fibrinogen Related Protein (FREP)	Q86GZ8_BIOGL, Q5YDA1_BIOGL, Q95UV9_BIOGL	*B.glabrata*	C/IC	8	349.5
	7-9-10-17-18-19-20-21-22-23-24-25-27-28-29	Galactose Binding lectin-like	gi|45596074, gi|163955927	*B.glabarata*	C/IC	9	666.28
Immune Relevant Molecules	28	Cystatin B-like	gi|84976026	*B.glabarata*	C	9	407.39
	2-4-9	Dec-1-like, Matrilin-like	gi|54425021, gi|146769285	*B.glabarata*	C/IC	7	425.37
	9-10-11-19-26	Aerolysin-like	gi|146770915, gi|157942185, gi|163956216	*B.glabarata*	C/IC	5	264.91
	27	Allograft inflamatory factor-like (AIF)	gi|149401339	*B.glabarata*	C	3	169.02
	23-29	Peroxinectin-like	gi|146765607	*B.glabarata*	C/IC	3	124.87
Other Function	3-10	Zinc metalloprotease-like	gi|141327900, gi|54424552	*B.glabarata*	C/IC	6	529.03
	22-28	Calcium binding protein 1	gi|163958069	*B.glabarata*	C/IC	4	274.76
	19-25	Stanniocalcin-like protein	gi|163956096	*B.glabarata*	C/IC	3	252.46

LC-MS/MS results were used to interrogate Swiss prot/Trembl database (MSdb) and *Biomphalaria glabrata* ESTs database (Bg-dbEST). A protein was considered to be correctly identified if at least two peptides were confidently matched with a score greater than 100. ID: identified, C: compatible combination, IC: incompatible combination.

doi:10.1371/journal.pntd.0000813.t002

Coimmunoprecipitation: A Fibrinogen related protein (FREP 2) and a thioester-containing protein form a complex with SmPoMucs

We chose to focus then on the putative interaction between FREPs and *Sm*PoMucs. FREPs are highly variable molecules described in *B. glabrata*, and in at least four other genera of gastropods [21,43] and related members, although with a different domain composition, exist in arthropods [44] and in cephalochordates [45]. All the observations on FREPs suggest that these molecules may act as highly diversified recognition and/or effector proteins somehow analogous to antibodies from vertebrate species [46,47]. From an evolutionary point of view and in an arms race perspective, these diversified immune receptors are expected to interact with diversified antigens from the pathogen counterpart, but this remains to be demonstrated. *Sm*PoMucs identified in the present study represent possible ligands for these diversified host molecules. Indeed, these proteins correspond to polymorphic mucins that are secreted and preferentially expressed in miracidium or sporocyst stages [34]. *Sm*PoMucs are highly glycosylated and have an extraordinary level of polymorphism facing the diversified FREPs from *B. glabrata* that could represent a particularly well adapted set of immuno receptors or effectors.

To test this hypothesis and to determine which snail proteins may interact or form a complex with *Sm*PoMucs, we carried out CoImmunoPrecipitation (CoIP) experiments using antibodies raised against recombinant *Sm*PoMuc (r*Sm*PoMuc).

Firstly, r*Sm*PoMuc corresponding to the C-terminal part of *Sm*PoMuc1 (234 last residues) was produced and purified to raise an anti-*Sm*PoMuc1 polyclonal antibody. After purification of IgG by protein A affinity chromatography, the sensivity and specificity of anti-*Sm*PoMuc1 antibody were evaluated by ELISA assay (data not shown) and western blot (Figure 4). In C and IC sporocyst extracts, only the bands corresponding to *Sm*PoMuc were revealed (Figure 4, lane 4 & 5). These profiles confirm the *Sm*PoMuc profile obtained in a previous study and show also that anti-*Sm*PoMuc1 polyclonal antibodies recognize all members of the *Sm*PoMuc family [34]. In addition, the absence of cross-reactivity with *B. glabrata* protein extracts was verified (Figure 4, lane 2 & 3). No signal was obtained in ELISA and Western blot assays using Protein A-purified IgG prepared from pre-immune serum (data not shown).

For CoIP experiments, controls and coimmunoprecipitated extracts from C and IC combinations were separated by SDS-PAGE (Figure 5). The ability of antibodies to immunoprecipitate *Sm*PoMucs from C and IC sporocyst extracts was tested. The bands corresponding to *Sm*PoMucs are revealed by silver stain in immunoprecipitated sporocyst extracts (Figure 5A, lane 1 & 5). The identification of *Sm*PoMucs in coimmunoprecipitated samples was assayed by western blot (Figure 5B, lane 1 & 3) and confirmed by mass spectrometry. Bands corresponding to *Sm*PoMucs in coimmunoprecipitated extracts (Figure 5A, lane 2 & 4, position indicated by arrows) were cut, submitted to tryptic digest and analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). These bands correspond to the different groups of *Sm*PoMucs as previously described (data not shown, [27]).

By comparison to controls, four specific bands were obtained for the coimmunoprecipitation assay (Figure 5 A; lane 2 bands n°1 and 2; lane 4 bands n°3 and 4). These bands were excised from the gel and submitted to mass spectrometry analysis. The same procedure was applied to the bands present at the same position in control snail plasma to ascertain protein identification after LC-MS/MS. Mass spectrometry analysis of the four bands of interest led to the identification of three proteins (Table 3). None of these proteins were identified for the corresponding bands in controls. As expected considering their position in the gel (~70–75 kDa), bands 1 and 3 (from IC and C combinations, respectively) led to the same identifications: Fibrinogen-related proteins (FREPs) and a Thioester-containing protein (TEP), both from *B. glabrata*.

In the case of FREPs, 4 peptides were identified by LC-MS/MS analysis. These are contained in different FREP isoforms available in GenBank database (Figure 2). The identification of a FREP2-specific peptide (Figure 2) confirms that FREP2 is present in these

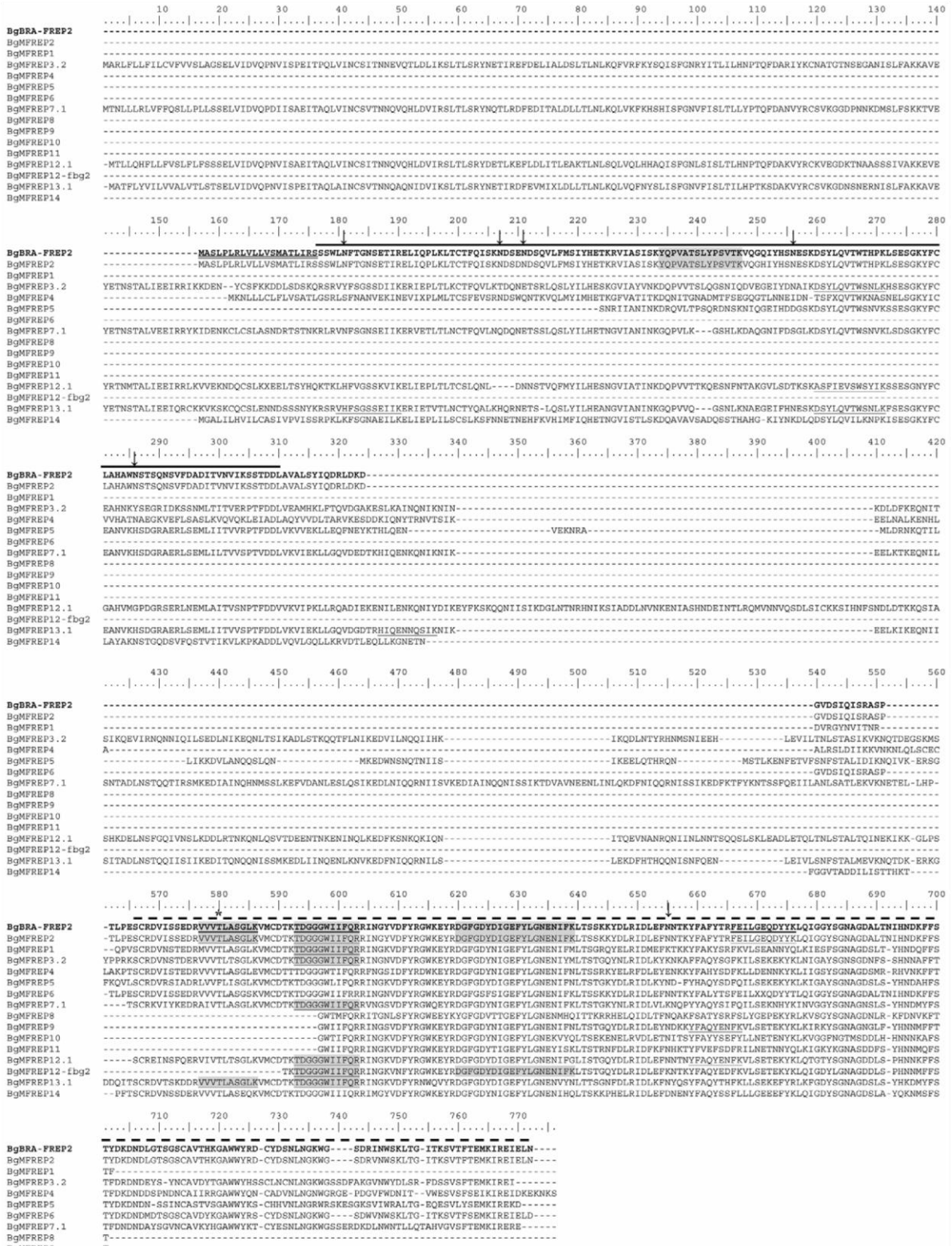

BgBRA-FREP2
BgMFREP2
BgMFREP1
BgMFREP3.2
BgMFREP4
BgMFREP5
BgMFREP6
BgMFREP7.1
BgMFREP8
BgMFREP9
BgMFREP10
BgMFREP11
BgMFREP12.1
BgMFREP12-fbg2
BgMFREP13.1
BgMFREP14

Figure 2. Alignment of BgBRA-FREP2 sequence with others FREPs from *B. glabrata*. Amino acid sequence of BgBRA-FREP2 (in bold, GenBank: HM003905) aligned with other FREPs family members from *B. glabrata*. Peptides identified by LC-MS/MS from the interactome approach and the coimmunoprecipitation approach are underlined and highlighted in grey, respectively. The putative signal peptide is double underlined, the putative N-glycosylation sites are indicated by arrows and the putative O-glycosylation site is indicated with an asterisk. The GenBank accession numbers of each entry are: BgMFREP1, AAK13549; BgMFREP2, AAK13550; BgMFREP3.2, AAK28656; BgMFREP4, AAK13551; BgMFREP5, AAK13546; BgMFREP6, AAK13552; BgMFREP7.1, AAK28657; BgMFREP8, AAK13553; BgMFREP9, AAK13554; BgMFREP10, AAK13555; BgMFREP11, AAK13556; BgMFREP12.1, AAO59918; BgMFREP12-fbg2, AAT58639; BgMFREP13.1, AAO59922; BgMFREP14, ABO61860. —— BgBRA-FREP2 IgSF domain; – – - BgBRA-FREP2 FBG domain.
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.g002

two bands. However the presence of other FREP family members cannot be excluded.

Taking into account the variability previously observed in this gene family, we investigated FREP2 in our own mollusc strain from Brazil (BRA). The cDNA corresponding to FREP2 was amplified by RT-PCR using RNA extracted from seven *B. glabrata* BRA snails and specific oligonucleotides designed from FREP2 sequence available on databases (BgMFREP2, FREP2 from M line *B. glabrata*, GenBank Accession number: AY012700). The amplicons obtained were cloned. One clone was sequenced. This sequence was called BgBRA-FREP2 and deposited in GenBank (Accession number: HM003905). The overall sequence identity and similarity between BgMFREP2 and BgBRA-FREP2 (isoform 1, HM003905) are 99.2% and 99.7%, respectively. BgBRA-FREP2 shares the structure of BgMFREP2 which has already been described [48]. It contains one IgSF domain upstream the C-terminal fibrinogen domain (FBG) (Figure 2). In addition, we investigate the variability of FREP2 sequences. Using RT-PCR amplification, we amplified FREP2 from five individuals from the BRA strain. Then, we cloned the PCR product obtained for each individual and 12 clones were randomly picked and sequenced. As primers do not discriminate between FREP6 and FREP2, 26 and 34 sequences of these two FREPs were obtained respectively. BgBRA-FREP2 sequences were further analysed. As expected, these sequences display a high level of similarity (about 99%) at the nucleic acid level. Nevertheless, 23 of them are non redundant (GenBank accession numbers: HM237113 to HM237135), indicating a high degree of diversity (88%). Interestingly, two individuals express 7 and 8 different isoforms of FREP2, respectively while a maximum 3 loci per haplotype were estimated in a previous study [22]. No recombinatorial process was observed (using Dna SP 5.10 software) indicating that at least a part of this FREP2 diversity was generated by somatic nucleotide point mutations with a strong bias for transitions (A to G and T to C).

The four peptides identified by LC-MS/MS cover 14.28% of BgBRA-FREP2 (HM003905) deduced amino acid sequence (Figure 2). The theoretical molecular weight of BgBRA-FREP2 deduced amino acid sequence is 43.8 kDa. The observed molecular weight of BgBRA-FREP2 (Figure 5A), approximately 70kDa, is not in agreement with the theoretical molecular weight. This phenomenon could be explained by post-translational modifications. Indeed, FREPs are known to be heavily glycosylated proteins [21] and the electrophoretic migration profile of FREPs under reducing conditions were shown to be comprised between 40 and 75 kDa in a previous study [24]. In addition, seven putative glycosylation sites (6 N-linked glycosylation and 1 O-linked glycosylation sites) have been predicted in BgBRA-FREP2 using the NetNglyc 1.0 and NetOglyc 3.1 servers (http://www.cbs.dtu.dk/services/). Consequently, we hypothesize that this difference between theoretical and observed molecular weight is due to post-translational glycosylation events.

Another protein was identified in the same bands 1 and 3. It corresponds to a thioester-containing protein (TEP) from *B. glabrata*. This TEP protein superfamily contains three different families of proteins which display distinct functions: (i) the vertebrate complement proteins (C3/C4/C5), (ii) the pan-protease inhibitors Alpha2 Macroglobulin (A2M) found in both vertebrates and invertebrates and finally, (iii) non classical A2M including TEPs subgroup only identified in invertebrate species and cell surface thioester containing protein isoforms (CD109 subgroup). We characterize the ORF of the *B. glabrata* TEP (BgTEP) from RNA of *B. glabrata* from the BRA strain (GenBank Accession Number HM003907). The deduced amino acid sequence corresponds to a precursor of 1446 amino acids. The peptides identified by LC-MS/MS cover 6.22% of the precursor sequence (Figure 6, Accession Number HM003907). The BgTEP sequences contain a putative 21 residue signal peptide as revealed by SignalP 3.0 analysis. It displays 14 putative N-glycosylation sites predicted

```
Group1   -----------VPEHLKTRIKHYKDAYFHSSIQKFLSLEPYTRASSTRAPQIYHEECLRLEKLYFTKWAVH 60
Group3   -----------VPEHLKTRIKHYKDAYYNSSIQKFLSLEPYTRASSTRAPQIYHEECLRLEKLYFTKWAVH 60
Group2   -----------VPKHLKTRINDYKYAYYKSSIQKFLSLEPYTRARSTTAPHIYHEECLRLEKLYFTKWAVH 60
                      **:******:.** **::*************** ** **:********************

Group1               YLSKNGATDITLLQSYENEYEEAKKGDKNADPRRDWGGQLRASISKKWKEREILDDVESA 120
Group3               YLSKNGATDITLLQSYENEYEEAKKGDENADPRRDWGGRLRASISKKWKEREILDDVESA 120
Group2               YLSKNAATDITLLQSYENEYEEAKKGDKNADRRRDWSGLLRVRISEKWKKRELLDDVESA 120
                     *****.**********************:*** ****.* **. **:***:**:*******

Group1               YIAGPRTNVNVNKEELKKQLTNTGNNIEAQLNNVKELESKAIQAANKHMNNRDDKSLEKQ 180
Group3               YIAEPRTNVNVNKEELKKQLTNTGNNIEAQLNNVKELESKAIQAANKHMNNRDDKSLEEQ 180
Group2               YIAETRTKVNVNKEKLKKQLTNTENKIEAQLNIVKELESKAIQATNEHMDNRDDKSLKEQ 180
                     *** .**:******:******** *:****** ***********:*:**:*******::*

Group1               HKEAYSTLGKELRSLVDLMGEAEFQRILLLTTLPKDEQIKMIIQAMDKDSTNCS 234
Group3               AYEAYSTLGEELRSLVDLMGEAEFQRILLLTTLPKDEQIKMIIQAMDKDSTNCS 234
Group2               YYEAYSTLAKELRSLVDLMGEAEFQRILLLTTLPKDEQINMIIQAMDKDSTNCS 234
                       ******.:****************************:**************
```

Figure 3. Amino acid sequences alignment of the C-terminal part of *Sm*PoMucs from the three identified groups. The peptides identified by LC-MSMS are underlined. Conserved positions are indicated by an asterisk. GenBank accession numbers: group 1 (EU042600), group 2 (EU042602) and group 3 (EU042633).
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.g003

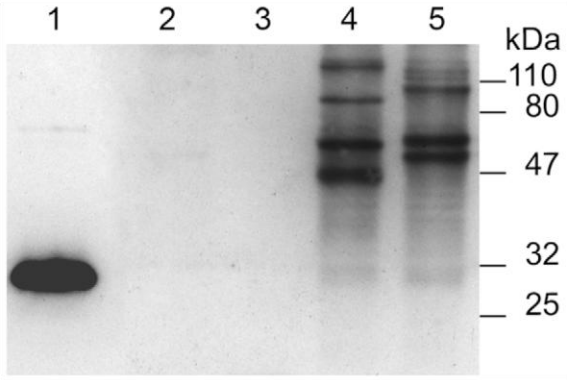


Figure 4. Anti-r*Sm*PoMuc antibodies specificity verified by Western blot. Lane 1: 30 ng of r*Sm*PoMuc ; Lane 2: 8 µg of *B. glabrata* whole extract ; Lane 3: 8 µg of *B. glabrata* plasma ; Lane 4: 8 µg of *S. mansoni* incompatible strain ; Lane 5: 8 µg of *S. mansoni* compatible strain. Extracts were separated by SDS-PAGE (12.5% gels), transferred on nitrocellulose membrane and probed with 1/1000 dilution of rabbit anti-r*Sm*PoMuc antibodies (purified IgG). Development was performed using horseradish peroxidase anti-rabbit IgG (1/5000 dilution) and chemiluminescent substrate.
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.g004

by NetNGlyc 1.0 software. SMART program analysis reveals that BgTEPs contain the different domains shared by members of the TEP superfamily [49]. The canonical thioester motif (GCGEQ) of the TEP family is located from residue 939 to 943, and the thioester bond is likely to be formed between C940 and E942. Proline residues involved in the formation, stability and function of the thioester bond in the human C3 [50] are found around the thioester site. The four residues (F996, M1345, Y1382, Y1416) forming the hydrophobic/aromatic pocket for the protection of the thioester in the human C3 are also found at conserved position. The complement component and the Alpha2 Macroglobulin receptor binding domains are identified at amino acid positions 978–1242 (Protein domain ID: pfam PF07678) and 1343–1427 (Protein domain ID: pfam PF07677), respectively. BgTEP contains 13 cysteine residues, six of them are located at the C-terminus (1334–1445) forming a sequence signature shared with *Drosophila* TEPs, *Anopheles gambiae* aTEP-1, and *Chlamys farreri* TEP [51,52,53]. This last cysteine array is a specific signature of invertebrate TEPs [51,52,54] that is not shared by complement and A2M. Finally, BgTEPs possess an aspartate residue (D1054) replacing the catalytic histidine residue usually found in most of the protein of this family including invertebrate TEPs from *A. gambiae*, *A. aegypti*, *C. elegans*, *C. farreri* and *Ephaedusa tau* [52,53]. This last feature is shared by a TEP from *Drosophila melanogaster* called TEP2. TEP2 was shown to be functional and required for the efficient phagocytosis of *E. coli* [55]. As the catalytic histidine residue determines the binding specificity of the thioester, this difference suggests an alternative binding mechanism already reported in other proteins of the family like alpha2 macroglobulin-related proteins [56].

Another interesting feature concerns the position of the protein in the gel. BgTEPs have a calculated molecular weight around 160 kDa which is not in agreement with the position of the protein in the gel (70kDa approximately). Interestingly, all the peptides identified by LC-MS/MS are located in the C-terminal part of the protein downstream the thioester site (Figure 6). These data suggest that we probably identified a cleaved C-terminal portion of the BgTEP. This suggests that BgTEP is processed like other members of the family. Indeed, human C3, alpha2 macroglobulins and *A. gambiae* TEP-1 have been shown to be activated by proteolysis [52]. However, no clear cut site has been identified in BgTEP, only a putative cleavage site sensitive to diverse proteases (trypsin, chymotrypsin, thermolysin, clostripain, LysC and LysN Lysyl endopeptidase, pepsin) has been predicted using PeptideCutter (http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/) program (see Figure 6).

The phylogenetic position of BgTEP (Accession number: HM003907) was investigated in the present work. Phylogenetic analysis confirms the situation of BgTEP in the group of invertebrates TEPs. An unrooted phylogenetic tree was constructed with the neighbour-joining method using 54 sequences of TEPs (Figure 7 and Table 4). Three major groups can be distinguished in the TEP family: complement components group, the A2M group and the group formed by invertebrate TEPs and cell surface TEP (CD109). The topology obtained shows that A2M and invertebrate TEPs are more similar between them than they are with complement components. This phylogenetic distribution is consistent with those previously obtained for this protein family [49,52,53,57]. BgTEP forms a cluster with other mollusc TEPs from *C. farreri* (39.5% similarity) and *E. tau* (55.1% similarity). This mollusc cluster forms a sister group of the insect TEPs from *A. gambiae* and *D. melanogaster*.

The third protein (bands 2 and 4, Figure 5) identified in the coimmunoprecipitated extracts is an alpha-amylase-like protein. The seven peptides obtained by mass spectrometry analysis matched with 2 ESTs (gi|146763124, gi|163957465). These contiged sequences display a high similarity to the alpha-amylase from the disk abalone *Haliotis discus discus* (E-value 2e-45). As alpha-amylase was known to be located mainly in the digestive tract of molluscs [58], the presence of this digestive enzyme in this context is surprising. Recovery of alpha-amylase in snail plasma is probably linked to a contamination of hemolymph by digestive mucus [32]. As it was demonstrated that porcine pancreatic alpha-amylase is able to bind N-linked oligosaccharides of glycoproteins [59], the interaction of alpha-amylase with *Sm*PoMucs or other partners of the complex could be an artefact.

There were no differences between C and IC strains in the co-immunoprecipitation experiments.

Discussion

Two main types of immune receptor systems were described in vertebrates. Firstly, immune receptors participating to innate immune mechanisms that are encoded by germline single or multigene copy genes. And secondly, immune receptors (immunoglobulins and T cell receptors) mediating adaptive immunity that are encoded by complex multigene systems submitted to somatic rearrangement and extensive diversification processes. Immunoglobulins and T cell receptors have not been identified either in jawless vertebrates, or in deuterostome or protostome invertebrates [60] and immunity against parasites by these organisms was believed to rely exclusively on invariable germline-encoded receptors and effectors molecules that recognize antigens with low specificity. However these organisms are confronted to an environment filled with complex changing populations of microorganisms and potential pathogens, the selective pressures to which they are submitted are comparable with those of jawed vertebrates [47]. Therefore, it should be expected that they also possess sophisticated recognition systems to deal with these challenges. Recent studies support this view. In jawless vertebrate leucine rich repeat receptors genes were identified [61]. They encode a repertoire of somatically diversified receptors analogous to that of T cell Receptors or Immunoglob-

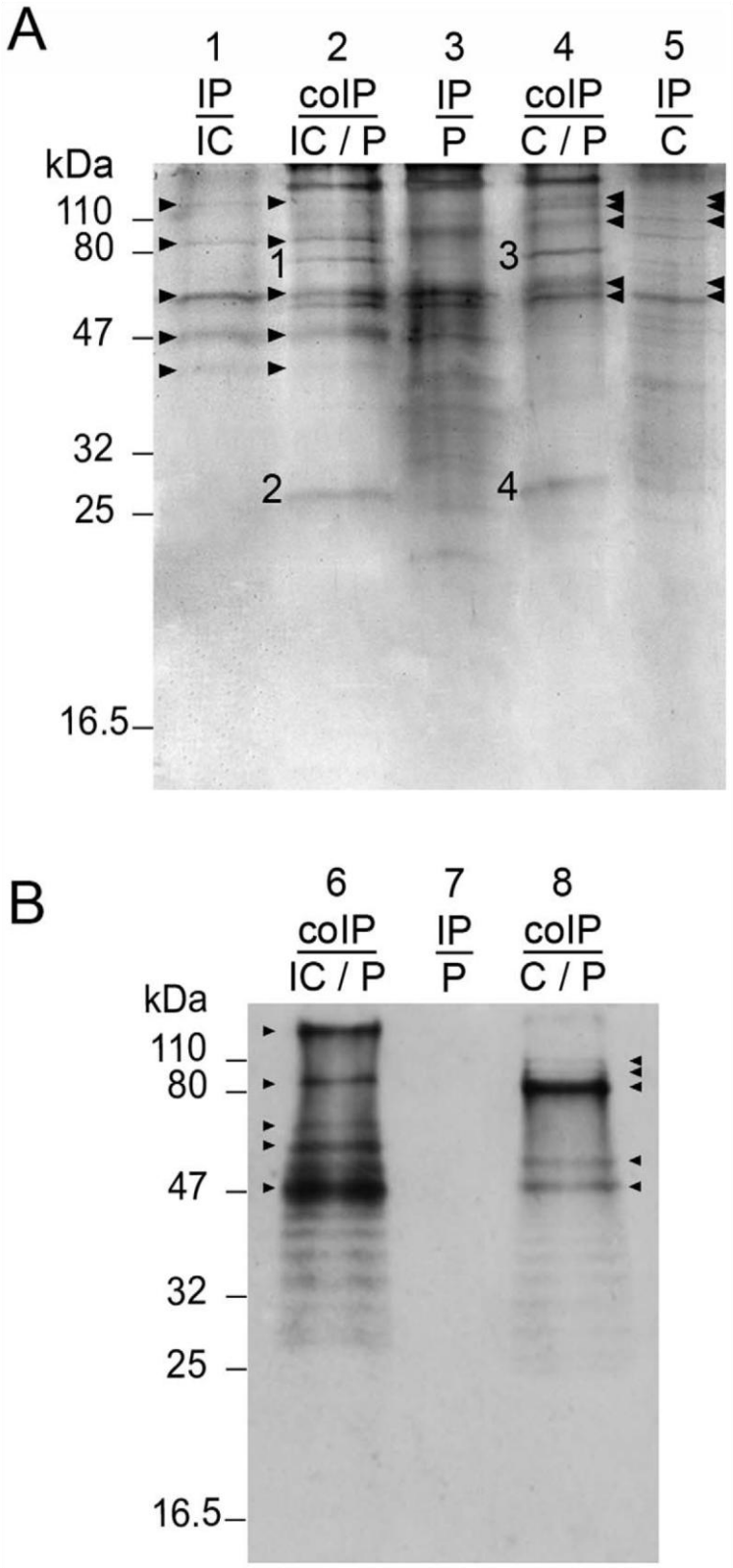


Figure 5. Immunoprecipitation and Coimmunoprecipitation experiments. A. CoImmunoPrecipitated (CoIP) and Immunoprecipitated (IP) extracts were separated by SDS-PAGE (12.5% gels) and silver-stained. Lanes 2 and 4 correspond to CoIP extracts. Lane 2: CoIP material obtained after incubation of sporocyst extracts from *S. mansoni* incompatible (IC) strain incubated with extracts from *B. glabrata* plasma (P). Lane 4: CoIP material obtained after incubation of sporocyst extracts from *S. mansoni* compatible (C) strain incubated with extracts from *B. glabrata* plasma (P). Lanes 1, 3

and 5 represent controls of Immunoprecipitated material. Lane 1: IP extracts from sporocyst of *S. mansoni* incompatible (IC) strain. Lane 3: IP extracts from *B. glabrata* plasma (P). Lane 5: IP extracts from sporocyst of *S. mansoni* Compatible (C) strain. **B.** Western-blot of immunoprecipitated (IP) and coImmunoPrecipitated (coIP) samples probed with anti-r*Sm*PoMuc antibody. Lane 6: CoIP material obtained after incubation of sporocyst extracts from *S. mansoni* incompatible (IC) strain incubated with extracts from *B. glabrata* plasma (P). Lane 7: IP extracts from *B. glabrata* plasma (P). Lane 8: CoIP material obtained after incubation of sporocyst extracts from *S. mansoni* compatible (C) strain incubated with extracts from *B. glabrata* plasma (P). Black arrow heads indicate the position of *Sm*PoMuc. Bands differentially represented between control and coIP samples are numbered (1 to 4). These four bands were cut and submitted to digestion and mass spectrometry analysis for identification.
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.g005

ulins of gnathostomes and fully able to participate in an immune response [62]. For invertebrates many multigene families have been identified following immunization or examination of the genome of different species. They belong to LRR superfamily [63,64], IgSF (Immunoglobulin SuperFamily, [17,65]) or yet poorly characterized novel families [13,66]. They can be integral membrane proteins, soluble, or intracellular. In invertebrates some cases of somatic adaptation have been reported for the FREPs in Molluscs [17] and for DSCAMs in arthropods [15]. In most case their involvement in immunity is not totally clarified and the interaction of these putative immune receptors with antigenic variants was never demonstrated. We started to investigate this question in the present study.

The experimental model we have chosen to answer this question is the interaction between *B. glabrata* and *S. mansoni*. As mentioned above somatically diversified immune receptors were discovered in *B. glabrata* [17] that bind to determinants of the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. In another trematode, *S. mansoni*, polymorphic mucins [26] called *Sm*PoMuc (for *S. mansoni* Polymorphic Mucins) displayed a high level of inter-individual polymorphism [34] and we showed that their polymorphism is the result of a complex hierarchical system (recombination, gene conversion, alternative/aberrant/trans splicing) that efficiently generates the variants based from a relatively low number of genes [27]. We suggest that these mucins could be the ligand of FREPs from *B. glabrata* [27]. In order to investigate the putative interaction between these molecules we developed a two step-experimental approach.

The first step was aimed at the identification of all the proteins from host plasma extracts that could interact with the parasite. Concerning proteins implicated in recognition and presumably in the immunity, several host lectins and parasite glycoproteins were identified. As expected, FREPs were identified as well as a novel *B. glabrata* lectin. This latter molecule displays similarities with a secreted galactose binding lectin characterised in another gastropod, *Helix pomatia* [67]. Considering the parasite molecular determinants that could be recognized by these lectins, several glycosylated proteins have been identified (Table 1). In addition to *Sm*PoMucs, two other glycoproteins were revealed in our approach: the 23 kDa integral membrane protein (Sm23) (or tetraspanin) and the glycoprotein K5. The tetraspanin was precipitated in both conditions (C/P and IC/P, Figure 1 and Table 1). The tetraspanin family includes proteins that are involved in physiological processes as diverse as egg-sperm fusion, immunological responses (antigen presentation), tissue differentiation and regulation of protein trafficking [68,69]. In *Schistosoma mansoni* tetraspanin were studied particularly for their potential antigenic properties [41,70,71]. The glycoprotein K5 was identified solely in IC strain. It was known that glycoprotein K5 was encoded by a single copy gene in *S. mansoni* [42]. Four N-glycosylation sites and one signal peptide were predicted [42] and it was identified in excretory/secretory products of *S. mansoni* [72]. All these results taken together suggest that the recognition process between *S. mansoni* and *B. glabrata* could be multifactorial involving different immune receptors from the host and different carbohydrate components and/or glycoproteins from the parasite.

Host immunity relevant molecules were also revealed by this first interactome approach. Firstly, we identified a putative cytolytic protein related to β pore forming toxin family whose amino acid sequence displays significant similarities to aerolysin sequence of the bacteria *Aeromonas hydrophila* (data not shown). Aerolysins have cytolytic activity triggered by channel formation in target cell membranes. Secreted as an inactive proenzyme form from bacteria, proaerolysin binds with high affinity to the glycosyl anchor of glycosylphosphatidyl-inositol anchored proteins located on the surface membrane of target eukaryotic cells. Its binding to receptor induces a proteolytic cleavage leading to an active form that oligomerizes, forming a channel that causes lysis of the target cell. For the first time identified in a mollusc, the proteins sharing this specific pore forming sequence motif have been identified mainly in bacteria but also in a few plants and cnidarians [73,74,75]. In cnidarians, the pore-forming toxin could be either a defensive or offensive allomone that is involved in protecting cnidarians against predators or in killing preys [75]. In our model, aerolysin could be involved in snail innate defense responses after trematode infections.

Several other proteins that could be involved in immune processes were also identified. Some of them could be involved in

Table 3. Identification of coimmunoprecipitated proteins from *B. glabrata*.

Function	Gel band no.	Protein ID	Accession number		Species	Interaction with	# of Peptides	Score
			MSDB	dbEST				
Lectin	1-3	Fibrinogen Related Protein 2 (FREP 2)	Q95UV9_BIOGL	#	*B.glabrata*	C/IC	4	216.62
Immune Relevant Molecules	1-3	thioester-containing protein (BgTEP)	#	gi|149407840, gi|84976399, gi|157945681, gi|163957098	*B.glabrata*	C/IC	6	374.68
Other Function	2-4	alpha amylase like	#	gi|146763124, gi|163957465	*B.glabrata*	C/IC	7	473.53

LC-MS/MS results were used to interrogate Swiss prot/Trembl database (MSdb) and *Biomphalaria glabrata* ESTs database (*Bg*-dbEST).
A protein was considered to be correctly identified if at least two peptides were confidently matched with a score greater than 100.
ID: identified, C: compatible combination, IC: incompatible combination.
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.t003

```
1     MRMKLNLILFVFYLVFQECQGGKYFISAPRNVVPGTAYDISVDILKQDIDNVTVEAILQD
61    YSFSIPEGPKSLLTANGTFSPGVRGTLSMPIDFNLHCSYCRILLKGYNPLQFEQDIFIQI
121   SSDILSILIQTDKAIYKPKERVNFRILAAYYNLQLYTGTFHYEILDPYDNKINVLSGVSG
181   TFGVVEGFFDLSDQPSFGTWKINVRTETVSGAESQFFEVAEYDLPRFQVDVGLPPFALLS
241   DTTLSGSVEAKYTFGQPVYGLVLLQIGENVDTIDKCNVNRKVTEISFEIKGKGNFSVPLE
301   DIRRSVHLNEKKKIKITAFVTEASTGIKLNGSSVITYYGNRYQIKFLEMTPAVFKPGLQY
361   TAYVQVTTPDGLPPTDSNLSLSVYTSVTYQMTVPDQELYSPSSFSGSYPLPGQNMSLPAN
421   GILSIDIDIPLNATSIDIKVSLNKETTAEKRISKSYSMSNNYLQLSLLSKLVKAESDVLI
481   KITSTEAIDSLAYEIRSRSDHVKSGVLELSGQREFNATFKVEPSWAPIAQLLMYYIRRDS
541   NEVVTDSLAFNVEGMFKNKVNVAFKENETDINKNVSLELSADSDSQIYVLAVDQSVLLLK
601   TGNDLTPNKVKDSFISKFHKGAIPTDSNFALSYSGSSINEVFSNMGLVIATDLNIFAPFR
661   PIALGRFPSSGFDRQGMMGAPMAMSFRDDNAMESASFEMDVATSTKPVERVRSFFPESWL
721   WTSVKSINGHATLTTTVPDTITSWIVSAFATNSDTGLGVAPTTSKLRVFRPFFVSLTYPR
781   SVTRNEQFIVQATVFNYLPVDLMVTVSLKENPFLTPITPGPGNQASNIQVRANEQGIVYF
841   SLSALTVGSLDIEVSARSNMAADAIVRQILIKHEGAPVVYNNPILINLSNNQSTFEKNIA
901   FTLPDSLVPESQRIRVKVTGDLIGSTVQSLTSLLTLPTGCGEQSLVKFTPNIHIGRYLKA
961   TNQLSEELNKKIIDLLNDGYQRQLTYKRYDNGFSAFGNYDISSSTWLTALVVTSFAEAQE
                                          ▲
1021  FIFVDKEIILKASMLLIDRQNIDGSFNEFGKVLDRNTQGTTTAGPALTAFVLVALLKAKE
                                      ●
1081  LADVQDCKNNNKCRYYLLGNATLNATRNLERLMLADSIDDQFSLAVASYAFAEAKSQLAQ
1141  STFEKLLTFVKQEGGLEYWSANSTVNNEELNRFINWRPPRLQARPIDILITSYAILTYSS
1201  LGRLDEALPSVRWLTLQKNAQGGFVSTQDTVVGLQALSSYGSKSFRPDTNITIYVSDMNT
1261  HLTMNVNSENALSLQIQEIQSNSQDFSITASGSGLALLDIEYSFNVLKELSKPVFDVNTV
1321  LLDDKLDSFNIMVCTKFLMKHDTGMVVQELSIPSGFVPDLSTLGQVAGVKRSERKGSIVA
                  *        ▲
1381  IYFDKISGSSLCYSIVMTREAKVAKSQKSYVRTYDYYEPANQATVFYQPRTLRDSTVCDV
       ▲        *                    ▲                        *
1441  CLNCCP
      *  **
```

Figure 6. Deduced amino acid sequence of BgTEP. The complete coding sequence of BgBRATEP was obtained (GenBank: HM003907) and the deduced precursor sequence shown here. The 1446 amino acids of the precursor share the domains and motifs of the other known invertebrates TEP. Peptides, identified by LC-MS/MS, are highlighted in grey. The putative signal peptide is underlined, the putative N-glycosylation sites are indicated in bold. The thioester site is double underlined. Proline residues important for the thioester stability are boxed. ● indicate the position of the aspartate residue (D1054) of the catalytic core. Cysteins belonging to the conserved cystein array shared by other TEPs are indicated by stars. ▲ indicate residues which form the protective hydrophobic/aromatic pocket of the thioester. The putative processing site for the cleavage is underlined with broken line. The Complement Component Domain is underlined and the Receptor-Binding Domain is dotted underlined.
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.g006

molecular adhesion processes. They correspond to Dec-1-like and Matrilin-like molecules from *B. glabrata* that are suspected to be involved in extracellular matrix structure or coagulation processes [35,76]. A peroxinectin was also identified. This cell adhesion molecule was discovered in other invertebrates species and was involved in cell attachment and spreading, nodule formation,

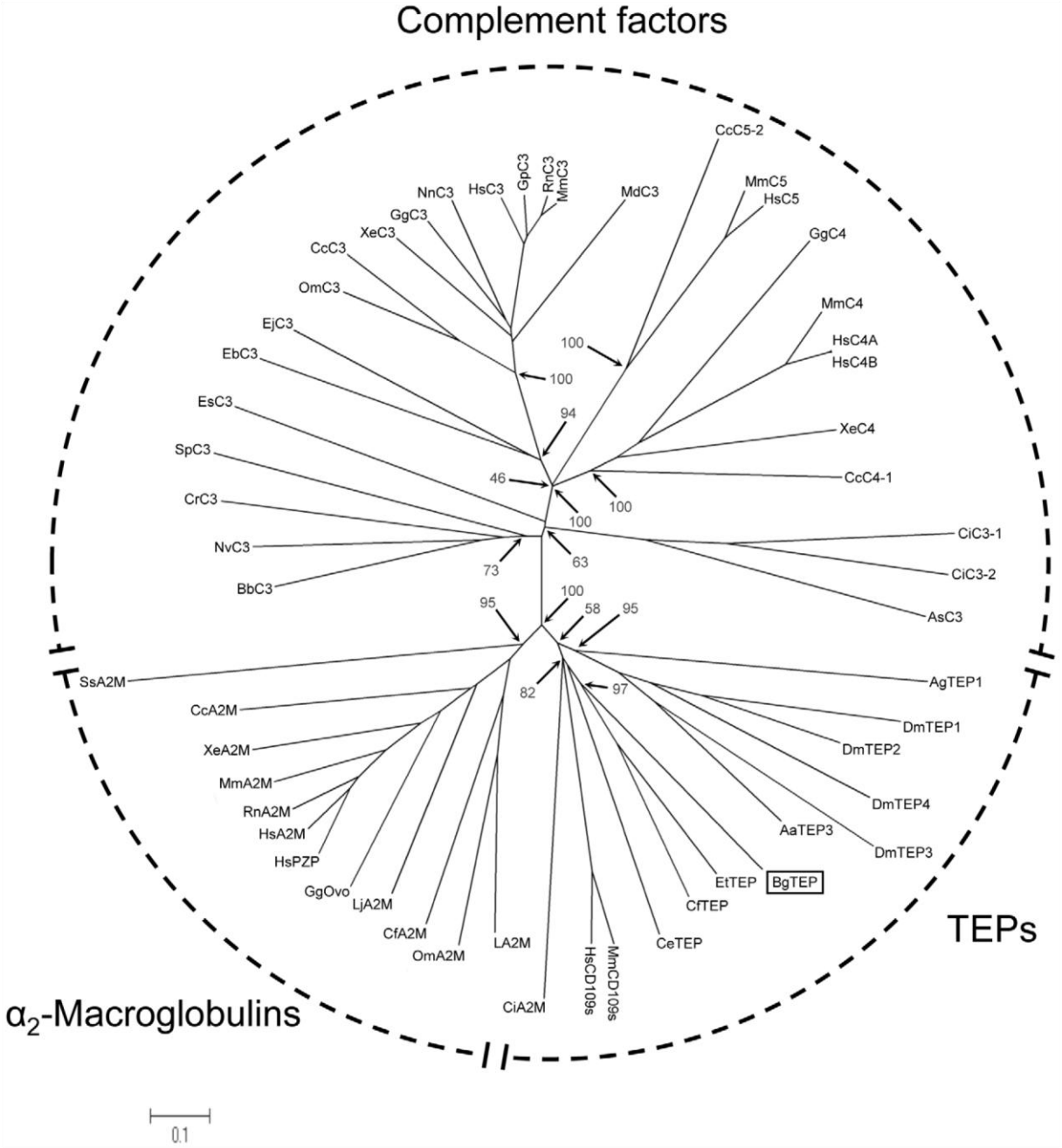


Figure 7. Phylogenetic position of BgTEP. The unrooted phylogenetic tree of thioester-containing proteins (54 sequences, cf. table 4) was produced by the neighbor-joining method based on the alignment of the sequences using CLUSTALW. Bootstrap values of 1000 replicates (%) are indicated for some nodes. The scale bar corresponds to 0.1 estimated amino-acid substitutions per site.
doi:10.1371/journal.pntd.0000813.g007

encapsulation, agglutination and phagocytosis [77]. Two other host immune relevant molecules were precipitated: AIF (Allograft Inflammatory Factor) which was shown to be crucial in pro-inflammatory activity in innate immunity [78] and a cysteine protease inhibitor (Cystatin B, [79]). The putative functions of these different molecules are very interesting in the context of host-parasite interactions. However their suspected roles are deduced from sequence similarities and further investigations are needed to clarify their function.

Finally several other proteins were identified in the interactome approach. Their presence is worth mentioning but their role in the host/parasite interplay context remains unknown. This is the case for several Heat Shock Proteins (HSP) as well as for 3 proteins belonging to the EF-hand calcium binding family, all from *S. mansoni*. It is the case also for six parasite molecules putatively involved in the detoxification of oxidative stress [29,80], or an anti-inflammatory, immunomodulatory protein of *S. mansoni*, *Sm*SPO-1 [81].

Table 4. Sequences of TEPs used to construct phylogenetic tree.

Code name	Name	Organism	Accession number (GenBank)
BgTEP	Snail TEP	*Biomphalaria glabrata*	HM003907
AgTEP1	Anopheles TEP-1	*Anopheles gambiae*	AAG00600
DmTEP1	Drosophila TEP1	*Drosophila melanogaster*	CAB87807
DmTEP2	Drosophila TEP2	*Drosophila melanogaster*	CAB87808
DmTEP3	Drosophila TEP3	*Drosophila melanogaster*	CAB87809
DmTEP4	Drosophila TEP4	*Drosophila melanogaster*	CAB87810
CeTEP	Caenorhabditis protein ZK337.1b	*Caenorhabditis elegans*	CAB05007
AaTEP3	Aedes TEP3	*Aedes aegypti*	EAT39604
EtTEP	Euphaedusa TEP	*Euphaedusa tau*	BAE44110
CfTEP	Zhikong scallop TEP	*Chlamys farreri*	ABP04060
BbC3	Amphioxus C3-like	*Branchiostoma belcheri*	BAB47146
NvC3	Starlet sea anemone C3	*Nematostella vectensis*	BAH22724
SeC3	Coral C3-like	*Swiftia exserta*	AAN86548
CrC3	Horseshoe crab C3	*Carcinoscorpius rotundicauda*	AAQ08323
EsC3	Bobtail squid C3	*Euprymna scolopes*	ACF04700
SpC3	Sea urchin C3	*Strongylocentrotus purpuratus*	AAC14396
CiC3-1	Ciona C3-1	*Ciona intestinalis*	Q8WPD8
CiC3-2	Ciona C3-2	*Ciona intestinalis*	Q8WPD7
AsC3	Ascidian C3	*Halocynthia rorezi*	BAA75069
EbC3	Hagfish C3	*Eptatretus burgeri*	CAA77677
EjC3	Lamprey C3	*Entosphenus japonicus*	Q00685
OmC3	Trout C3	*Oncorhynchus mykiss*	AAB05029
CcC3	Carp C3-H1	*Cyprinus carpio*	BAA36618
XeC3	Xenopus C3	*Xenopus laevis*	AAB60608
GgC3	Chicken C3	*Gallus gallus*	NP_990736
NnC3	Cobra C3	*Naja naja*	Q01833
HsC3	Human C3	*Homo sapiens*	P01024
GpC3	Guinea pig C3	*Cavia porcellus*	P12387
MdC3	Opossum C3	*Monodelphis domestica*	XP_001378723
RnC3	Rat C3	*Rattus norvegicus*	CAA36716
MmC3	Mouse C3	*Mus musculus*	P01027
GgC4	Chicken C4	*Gallus gallus*	T28153
CcC4-1	Carp C4-1	*Cyprinus carpio*	BAB03284
XeC4	Xenopus C4	*Xenopus laevi*	BAA11188
MmC4	Mouse C4	*Mus musculus*	P01029
HsC4A	Human C4A	*Homo sapiens*	AAB59537
HsC4B	Human C4B	*Homo sapiens*	AAA99717
CcC5-2	Carp C5-2	*Cyprinus carpio*	BAC23058
MmC5	Mouse C5	*Mus musculus*	P06684
HsC5	Human C5	*Homo sapiens*	P01031
LA2M	Horseshoe crab alpha-2-macroglobulin	*Limulus sp*	BAA19844
LjA2M	Lamprey alpha-2-macroglobulin	*Lethenteron japonicum*	BAA02762
GgOvo	Chicken ovostatin	*Gallus gallus*	P20740
HsPZP	Human pregnancy zone protein	*Homo sapiens*	X54380
HsA2M	Human alpha-2-macroglobulin	*Homo sapiens*	P01023
RnA2M	Rat alpha-2-macroglobulin	*Rattus norvegicus*	P06238
MmA2M	Mouse alpha-2-macroglobulin	*Mus musculus*	Q61838
CiA2M	Ciona alpha-2-macroglobulin	*Ciona intestinales*	NP_001027688
CcA2M	Carp alpha-2-macroglobulin1	*Cyprinus carpio*	BAA85038
XeA2M	Xenopus endodermin (alpha-2-macroglobulin-like paralog)	*Xenopus laevis*	AAB51432

Table 4. Cont.

Code name	Name	Organism	Accession number (GenBank)
CfA2M	Scallop alpha-2-macroglobulin	*Chlamys farreri*	AAR39412
OmA2M	Soft tick alpha-2-macroglobulin	*Ornithodoros moubata*	AAN10129
SsA2M	Mud crab alpha-2-macroglobulin	*Scylla serrata*	ABD61456
HsCD109s	Human CD109s	*Homo sapiens*	AAN78483

doi:10.1371/journal.pntd.0000813.t004

The second approach developed during this study was dedicated to the identification of the suspected interaction between FREPs and *Sm*PoMucs. It consisted in CoIP experiments developed with antibodies raised against *Sm*PoMucs. The FREPs and *Sm*PoMucs were found together in one molecular complex containing in addition at least a third partner, the C-terminal moiety of the ThioEster containing Protein (TEP) from *B. glabrata*. The presence of the C-terminal part of TEP in the complex is exciting as some molecules of this family were recently shown to play key roles in other invertebrate/pathogen interactions, especially in insects. Indeed, TEP1 was shown to play a crucial role in the phagocytosis of bacteria and killing of parasites in the mosquito *Anopheles gambiae*. TEP1 from the mosquito is secreted by hemocytes and cleaved in hemolymph. The C-terminal part of TEP1 binds to bacteria or ookinetes surfaces through a thioester bound. The involvement of this complement-like molecule in the antiparasitic defense of mosquitoes was recently discussed [82]. In addition, recent work demonstrates that polymorphisms in the gene encoding TEP1 occurs and explains the differences of susceptibility to *P. falciparum* between *A. gambiae* individuals [83,84].

The identification of these three partners is very interesting in our study context. Two of them (*Sm*PoMucs and FREPs) are known to be highly variable and can display individual repertoires (see [17,27] for details). Since the work on FREPs cited previously (Zhang et al. 2004) was performed on FREP3, we investigated the polymorphism of the FREP2 molecules specifically identified in the present study and we confirmed its high level of variability.

In principle the molecular diversity of both partners (FREPs and *Sm*PoMucs) is perfectly in agreement with their involvement in an immune complex involving several kinds of paratopes and epitopes. Future work will be developed to characterise the FREP binding site and *Sm*PoMuc molecular epitopes involved in this complex. The third partner is the TEP from *B. glabrata* (BgTEP). Precursor and phylogenetic analysis suggests that BgTEP shares the features of invertebrate TEPs that are known to be involved in antiparasitic defense and microbe phagocytosis [54,55,85,86]. In addition, our LC-MS/MS experiments led to the identification of peptides that are all located in the C-terminal part of BgTEP. This suggests that BgTEP has been submitted to cleavage before its association to the two other partners of the complex. This cleavage was described for numerous members of the TEP family during the activation process, especially for TEP1 from the mosquito [52]. Therefore the BgTEP found in the complex is activated and could play a role in opsonisation processes as described for the members of this family. This hypothesis is clearly supported by the Alpha2 Macroglobulin receptor binding domain (region 1343–1427) found in the C-terminal part of BgTEP precursor. Indeed, this domain is known to be involved in the interaction with macrophage and phagocyte specific receptors [87]. A protein displaying a 18 residues N-terminal sequence identical to our BgTEP was previously characterized from *B. glabrata* [88]. It displays an α-macroglobulin proteinase inhibitor-like activity. Nevertheless, our phylogenetic analysis and the cystein array identified in the C-terminus part of the Bg TEP [51,52,54] strongly support that BgTEP belongs to the invertebrate TEP and not to the A2M group.

As FREPs display a high level of similarity among themselves, it is difficult to identify without doubt the isoform(s) present in the immune complex characterised by mass spectrometry. Nevertheless, we identify a FREP2-specific peptide and consequently, we are sure that FREP2 is present in the immune complex, alone or in combination with other FREPs. This result is interesting because *FREP2* is the main gene of the *FREP* family up-regulated following exposure to *S. mansoni* [25,46,89]. Moreover, our analysis of BgBRA-FREP2 diversity in the present study reveals that somatic processes probably occurs and increase their repertoire in individuals. Consequently, FREP2 could represent a sort of induced or selected "antibody" following parasite infection and dedicated to parasite determinant recognition.

Finally, the results obtained in this work could help understanding different results obtained during previous population studies. These studies of the interaction between *B. glabrata* and *S. mansoni* have revealed a phenomenon called compatibility polymorphism [90]. In natural populations, some snail/schistosome combinations are compatible and others are not, the success or the failure of *B. glabrata*/*S. mansoni* infection depending on the matched or mismatched status of the host and parasite phenotypes [90]. The molecular basis of this phenomenon is unknown but molecular determinants like those revealed through this study are promising candidates. Indeed, we can hypothesize that particular combinations of FREPs and *Sm*PoMucs expressed by individuals could interact together or not to define the matched or mismatched status evoked previously. We have recently shown that each *S. mansoni* individual expresses a particular *Sm*PoMuc profile [27] that could be recognized or not by a particular FREPs profile expressed by the infected mollusc. We are currently testing this hypothesis by analysing the concordance of alleles in compatible combinations in different populations of *B. glabrata* and *S. mansoni* in interaction. If this hypothesis is verified, it could illustrate a bet hedging strategy of the parasite based on a diversification/polymorphism process providing an opportunity to certain individuals to infest a host permitting parasite species perpetuation. Bet hedging strategies are well characterized in bacteria [91] and consists in a switching between phenotypes for species confronted to fluctuating and unpredictable environmental variations. The FREP somatic diversification of mollusc individuals is insufficient to allow recognition of all parasite individuals. This somatic diversification could represent a first step towards adaptive immunity in an invertebrate species: individuals are capable of somatic diversification of their immune receptors allowing for an enlargement of their recognition capacity, nevertheless, this repertoire is smaller than the vertebrate immune receptor repertoire and does not allow for the recognition of all

putative antigens entering in contact with a given individual. In the future an analysis of the germ line genes of FREP that will allow dn/ds calculations and the modelling of the FREP domains bound to their mucin ligand once crystals are available should shed light on the properties of these variants and on their necessity.

Acknowledgments

We thank Anne Rognon, Bernard Dejean, David Francheteau, Christophe Gailhou and Julien Portela for technical assistance. We thank Christoph Grunau, Céline Cosseau, Richard Galinier and Emmanuel Roger for advice and fruitful discussion. We thank Julio Saez Vasquez for expert technical assistance in FPLC chromatography (LGDP, Perpignan). The Proteomics facility used in this study was conducted using the Proteomic facilities of the EDyP Service Proteomic laboratory of CEA U880 INSERM (Grenoble, France).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BG LDP GM. Performed the experiments: YM BG DD. Analyzed the data: YM BG DD GM. Contributed reagents/materials/analysis tools: SKJ. Wrote the paper: YM BG DD LDP GM.

References

1. Howard JC (1991) Immunology. Disease and evolution. Nature 352: 565–567.
2. Van Valen L (1974) Molecular evolution as predicted by natural selection. J Mol Evol 3: 89–101.
3. Ebert D (2008) Host-parasite coevolution: Insights from the Daphnia-parasite model system. Curr Opin Microbiol 11: 290–301.
4. Di Noia JM, Neuberger MS (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. Annu Rev Biochem 76: 1–22.
5. Reynaud CA, Bertocci B, Dahan A, Weill JC (1994) Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. Advances in immunology 57: 353–378.
6. Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. Nature 302: 575–581.
7. Cannon JP, Haire RN, Rast JP, Litman GW (2004) The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. Immunol Rev 200: 12–22.
8. Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL, et al. (2004) Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. Nature 430: 174–180.
9. Finlay BB, McFadden G (2006) Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. Cell 124: 767–782.
10. Deitsch KW, Lukehart SA, Stringer JR (2009) Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. Nat Rev Microbiol 7: 493–503.
11. Lopez-Rubio JJ, Riviere L, Scherf A (2007) Shared epigenetic mechanisms control virulence factors in protozoan parasites. Curr Opin Microbiol 10: 560–568.
12. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell 91: 295–298.
13. Pancer Z (2000) Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 13156–13161.
14. Dong Y, Taylor HE, Dimopoulos G (2006) AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. PLoS biology 4: e229.
15. Watson FL, Puttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, et al. (2005) Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. Science 309: 1874–1878.
16. Brites D, McTaggart S, Morris K, Anderson J, Thomas K, et al. (2008) The Dscam homologue of the crustacean *Daphnia* is diversified by alternative splicing like in insects. Molecular biology and evolution 25: 1429–1439.
17. Zhang SM, Adema CM, Kepler TB, Loker ES (2004) Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. Science 305: 251–254.
18. Hauton C, Smith VJ (2007) Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. Bioessays 29: 1138–1146.
19. Little TJ, Colegrave N, Sadd BM, Schmid-Hempel P (2008) Studying immunity at the whole organism level. Bioessays 30: 404–405; author reply 406.
20. Hertel LA, Stricker SA, Monroy FP, Wilson WD, Loker ES (1994) *Biomphalaria glabrata* hemolymph lectins: binding to bacteria, mammalian erythrocytes, and to sporocysts and rediae of *Echinostoma paraensei*. J Invertebr Pathol 64: 52–61.
21. Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES (1997) A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 8691–8696.
22. Zhang SM, Loker ES (2004) Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. Gene 341: 255–266.
23. Zhang SM, Nian H, Zeng Y, Dejong RJ (2008) Fibrinogen-bearing protein genes in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of two novel genes and expression studies during ontogenesis and trematode infection. Dev Comp Immunol 32: 1119–1130.
24. Zhang SM, Zeng Y, Loker ES (2008) Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*. Innate immunity 14: 175–189.
25. Hanington PC, Lun CM, Adema CM, Loker ES (2010) Time series analysis of the transcriptional responses of Biomphalaria glabrata throughout the course of intramolluscan development of Schistosoma mansoni and Echinostoma paraensei. Int J Parasitol.
26. Roger E, Mitta G, Mone Y, Bouchut A, Rognon A, et al. (2008) Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach. Mol Biochem Parasitol 157: 205–216.
27. Roger E, Grunau C, Pierce RJ, Hirai H, Gourbal B, et al. (2008) Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite (*Schistosoma mansoni*) Interacting with Its Invertebrate Host (*Biomphalaria glabrata*). PLoS neglected tropical diseases 2: e330.
28. Theron A, Pages JR, Rognon A (1997) *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. Exp Parasitol 85: 1–9.
29. Guillou F, Roger E, Mone Y, Rognon A, Grunau C, et al. (2007) Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. Mol Biochem Parasitol.
30. Chernin E (1963) Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus*. J Parasitol 49: 353–364.
31. Coustau C, Mitta G, Dissous C, Guillou F, Galinier R, et al. (2003) *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni* excretory-secretory products differentially affect gene expression in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. Parasitology 127: 533–542.
32. Vergote D, Bouchut A, Sautiere PE, Roger E, Galinier R, et al. (2005) Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. Int J Parasitol 35: 215–224.
33. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem 68: 850–858.
34. Roger E, Gourbal B, Grunau C, Pierce RJ, Galinier R, et al. (2008) Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite Schistosoma mansoni. Mol Biochem Parasitol 157: 217–227.
35. Bouchut A, Sautiere PE, Coustau C, Mitta G (2006) Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. Acta Trop.
36. Kayser JP, Vallet JL, Cerny RL (2004) Defining parameters for homology-tolerant database searching. J Biomol Tech 15: 285–295.
37. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596–1599.
38. Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics (Oxford, England) 25: 1451–1452.
39. Fryer SE, Bayne CJ (1996) Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components. Dev Comp Immunol 20: 23–37.
40. Yoshino TP, Dinguirard N, Kunert J, Hokke CH (2008) Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Gene 411: 46–58.
41. Cai P, Bu L, Wang J, Wang Z, Zhong X, et al. (2008) Molecular characterization of Schistosoma japonicum tegument protein tetraspanin-2: sequence variation and possible implications for immune evasion. Biochemical and biophysical research communications 372: 197–202.
42. Schramm G, Hamilton JV, Balog CI, Wuhrer M, Gronow A, et al. (2009) Molecular characterisation of kappa-5, a major antigenic glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs. Mol Biochem Parasitol 166: 4–14.
43. Gorbushin AM, Panchin YV, Iakovleva NV (2009) In search of the origin of FREPs: characterization of Aplysia californica fibrinogen-related proteins. Dev Comp Immunol 34: 465–473.
44. Wang X, Zhao Q, Christensen BM (2005) Identification and characterization of the fibrinogen-like domain of fibrinogen-related proteins in the mosquito, *Anopheles gambiae*, and the fruitfly, *Drosophila melanogaster*, genomes. BMC Genomics 6: 114.
45. Fan C, Zhang S, Li L, Chao Y (2008) Fibrinogen-related protein from amphioxus *Branchiostoma belcheri* is a multivalent pattern recognition receptor with a bacteriolytic activity. Mol Immunol 45: 3338–3346.
46. Hertel LA, Adema CM, Loker ES (2005) Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. Dev Comp Immunol 29: 295–303.

47. Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB (2004) Invertebrate immune systems–not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol Rev 198: 10–24.
48. Léonard PM, Adema CM, Zhang S-M, Loker ES (2001) Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*. Gene 269: 155–165.
49. Zhu Y, Thangamani S, Ho B, Ding JL (2005) The ancient origin of the complement system. Embo J 24: 382–394.
50. Isaac L, Isenman DE (1992) Structural requirements for thioester bond formation in human complement component C3. Reassessment of the role of thioester bond integrity on the conformation of C3. J Biol Chem 267: 10062–10069.
51. Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann JA (2000) Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 11427–11432.
52. Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, et al. (2001) Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, Anopheles gambiae. Cell 104: 709–718.
53. Zhang H, Song L, Li C, Zhao J, Wang H, et al. (2007) Molecular cloning and characterization of a thioester-containing protein from Zhikong scallop Chlamys farreri. Mol Immunol 44: 3492–3500.
54. Blandin S, Levashina EA (2004) Thioester-containing proteins and insect immunity. Mol Immunol 40: 903–908.
55. Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD (2006) Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. PLoS biology 4: e4.
56. Dodds AW, Law SK (1998) The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and alpha 2-macroglobulin. Immunol Rev 166: 15–26.
57. Castillo MG, Goodson MS, McFall-Ngai M (2009) Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid Euprymna scolopes. Dev Comp Immunol 33: 69–76.
58. Nikapitiya C, Oh C, Whang I, Kim CG, Lee YH, et al. (2009) Molecular characterization, gene expression analysis and biochemical properties of alpha-amylase from the disk abalone, *Haliotis discus discus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 152: 271–281.
59. Matsushita H, Takenaka M, Ogawa H (2002) Porcine pancreatic alpha-amylase shows binding activity toward N-linked oligosaccharides of glycoproteins. J Biol Chem 277: 4680–4686.
60. Flajnik M, Du Pasquier L (2008) Evolution of the immune system. In: WE P, ed. Fundamental Immunology. Philadelphia: Wolters Kluwer-Lippincot-Williams and Wilkins. pp 56–124.
61. Pancer Z, Saha NR, Kasamatsu J, Suzuki T, Amemiya CT, et al. (2005) Variable lymphocyte receptors in hagfish. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 9224–9229.
62. Guo P, Hirano M, Herrin BR, Li J, Yu C, et al. (2009) Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. Nature 459: 796–801.
63. Pancer Z, Cooper MD (2006) The evolution of adaptive immunity. Annu Rev Immunol 24: 497–518.
64. Rairdan G, Moffett P (2007) Brothers in arms? Common and contrasting themes in pathogen perception by plant NB-LRR and animal NACHT-LRR proteins. Microbes Infect 9: 677–686.
65. Cannon JP, Haire RN, Schnitker N, Mueller MG, Litman GW (2004) Individual protochordates have unique immune-type receptor repertoires. Curr Biol 14: R465–466.
66. Buckley KM, Smith LC (2007) Extraordinary diversity among members of the large gene family, 185/333, from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. BMC molecular biology 8: 68.
67. Perez-Sanchez R, Ramajo-Hernandez A, Ramajo-Martin V, Oleaga A (2006) Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. Proteomics 6 Suppl 1: S226–236.
68. Berditchevski F, Odintsova E (2007) Tetraspanins as regulators of protein trafficking. Traffic (Copenhagen, Denmark) 8: 89–96.
69. Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. Faseb J 11: 428–442.
70. Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, et al. (2006) Tetraspanins on the surface of Schistosoma mansoni are protective antigens against schistosomiasis. Nature medicine 12: 835–840.
71. Mulvenna J, Moertel L, Jones MK, Nawaratna S, Lovas EM, et al. (2010) Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. Int J Parasitol 40: 543–554.
72. Wu X, Sabat G, Brown J, Zhang M, Taft A, et al. (2009) Proteomic analysis of Schistosoma mansoni proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. Mol Biochem Parasitol 164: 32–44.
73. Fontes W, Sousa MV, Aragao JB, Morhy L (1997) Determination of the amino acid sequence of the plant cytolysin enterolobin. Archives of biochemistry and biophysics 347: 201–207.
74. Iacovache I, van der Goot FG, Pernot L (2008) Pore formation: an ancient yet complex form of attack. Biochim Biophys Acta 1778: 1611–1623.
75. Sher D, Fishman Y, Zhang M, Lebendiker M, Gaathon A, et al. (2005) Hydralysins, a new category of beta-pore-forming toxins in cnidaria. J Biol Chem 280: 22847–22855.
76. Bouchut A, Coustau C, Gourbal B, Mitta G (2007) Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. Parasitology 134: 575–588.
77. Schmidt O, Soderhall K, Theopold U, Faye I (2010) Role of adhesion in arthropod immune recognition. Annual review of entomology 55: 485–504.
78. Yang ZF, Ho DW, Lau CK, Lam CT, Lum CT, et al. (2005) Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. International immunology 17: 1391–1397.
79. Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM (2003) Cystatins. Biochem Soc Symp. pp 179–199.
80. Bayne CJ (2009) Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. Mol Biochem Parasitol 165: 8–18.
81. Brannstrom K, Sellin ME, Holmfeldt P, Brattsand M, Gullberg M (2009) The *Schistosoma mansoni* protein Sm16/SmSLP/SmSPO-1 assembles into a nine-subunit oligomer with potential To inhibit Toll-like receptor signaling. Infect Immun 77: 1144–1154.
82. Volohonsky G, Steinert S, Levashina EA (2010) Focusing on complement in the antiparasitic defense of mosquitoes. Trends Parasitol 26: 1–3.
83. Obbard DJ, Callister DM, Jiggins FM, Soares DC, Yan G, et al. (2008) The evolution of TEP1, an exceptionally polymorphic immunity gene in *Anopheles gambiae*. BMC evolutionary biology 8: 274.
84. Blandin SA, Wang-Sattler R, Lamacchia M, Gagneur J, Lycett G, et al. (2009) Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. Science 326: 147–150.
85. Blandin SA, Levashina EA (2007) Phagocytosis in mosquito immune responses. Immunol Rev 219: 8–16.
86. Blandin SA, Marois E, Levashina EA (2008) Antimalarial responses in *Anopheles gambiae*: from a complement-like protein to a complement-like pathway. Cell host & microbe 3: 364–374.
87. van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ (2007) Macrophage complement receptors and pathogen clearance. Cell Microbiol 9: 2095–2102.
88. Bender RC, Bayne CJ (1996) Purification and characterization of a tetrameric alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. Biochem J 316(Pt 3): 893–900.
89. Adema CM, Hanington PC, Lun C-M, Rosenberg GH, Aragon AD, et al. (2010) Differential transcriptomic responses of Biomphalaria glabrata (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, Schistosoma mansoni and Echinostoma paraensei (Digenea, Platyhelminthes). Molecular Immunology 47: 849–860.
90. Theron A, Coustau C (2005) Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? J Helminthol 79: 187–191.
91. Beaumont HJ, Gallie J, Kost C, Ferguson GC, Rainey PB (2009) Experimental evolution of bet hedging. Nature 462: 90–93.

Partie 2

EFFECTEURS IMMUNITAIRES
ET
COURSE AUX ARMEMENTS
DANS L'INTERACTION *S. MANSONI* / *B. GLABRATA*

Publication n°3

Moné Y., Mitta G., Duval D., Gourbal B.E. (2010). Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Experimental Parasitology, 125(2), 70-75

Publication n°4

Moné Y., Ribou A.C., Cosseau C., Duval D., Mitta G., Gourbal B.E. (2011). An example of molecular coevolution: ROS and ROS scavenger levels in *S. mansoni/B. glabrata* interactions. International Journal for Parasitology. Sous presse.

Les ROS sont les effecteurs majeurs de la réponse immunitaire chez *B. glabrata*. Plusieurs études ont montré que *S. mansoni* est sensible au stress oxydant et que le parasite dispose de systèmes antioxydants lui permettant de lutter contre la réponse de l'hôte (Hahn *et al.* 2001b; Mourao *et al.* 2009). Lors de mon stage de master, une analyse protéomique des produits d'excrétion-sécrétion du parasite a permis de mettre en évidence la présence de nombreuses enzymes antioxydantes qui seraient essentielles pour permettre l'implantation du parasite dans l'hôte (cf. Annexe 1).

Durant ce travail de thèse, nous avons testé l'effet de l'amphotéricine B (AmB) sur la capacité d'infestation de *S. mansoni*. AmB est une molécule connue principalement pour son activité antifongique, cependant elle est également active sur les procaryotes, les protozoaires et les métazoaires. Son activité sur les cellules est liée au stress oxydant qu'elle induit. Les résultats de cette étude montrent que l'exposition de *miracidia* à l'AmB engendre une diminution drastique du succès d'infestation (mesuré par la prévalence chez le mollusque). Cet effet de l'AmB semble être lié au stress oxydant qu'elle génère chez le miracidium ce qui entraînerait une baisse des capacités du parasite à lutter contre le stress oxydant de l'hôte une fois que le miracidium a pénétré le mollusque. Le travail présenté dans la publication n°3 montre *in vivo* que le stress oxydant induit par le traitement et la baisse de la capacité antioxydante du parasite qui s'en suit ont un effet négatif sur le succès d'infestation.

Dans le contexte d'une dynamique coévolutive entre hôte et parasite, il est attendu que *S. mansoni* soit capable de développer une réponse adaptée au stress oxydant généré par *B. glabrata*. Les hypothèses théoriques telle que celle de la Reine Rouge prévoient qu'il existe une correspondance étroite entre les mécanismes d'infectivité du parasite et les mécanismes de défense de l'hôte. Cependant, ces hypothèses théoriques sont souvent avancées mais rarement testées expérimentalement et restent largement du domaine conceptuel. Pour tester cette hypothèse nous avons comparé la capacité de l'hôte à générer un stress oxydant et la capacité du parasite à y répondre. Cette comparaison a été effectuée en nous focalisant sur des souches d'hôtes et de parasites d'origine géographiques différentes ayant coévolué de façon indépendante.

Les résultats de cette étude montrent une concordance phénotypique entre la production de ROS par l'hôte et la capacité antioxydante du parasite. Ces résultats sont donc en accord avec les hypothèses évolutives théoriques. Cette concordance phénotypique reflète une adaptation réciproque entre les deux protagonistes, et constitue une illustration en populations naturelles de la coévolution de traits fonctionnels directement impliqués dans la réussite ou l'échec de l'infestation.

Experimental Parasitology 125 (2010) 70–75

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*

Yves Moné, Guillaume Mitta, David Duval, Benjamin E.F. Gourbal *

Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5244, CNRS, EPHE, UPVD, Biologie & Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan, 52 Ave. Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 September 2009
Received in revised form 10 December 2009
Accepted 29 December 2009
Available online 11 January 2010

Keywords:
Amphotericin B
Schistosoma mansoni
Miracidium
Biomphalaria glabrata
Reactive oxygen species (ROS)

ABSTRACT

In the present study, we examined the effect of amphotericin B on larval stages (miracidia and primary sporocyst) of the helminth *Schistosoma mansoni*, the causative agent of human schistosomiasis. Amphotericin B (AmB) is a polyene macrolide that disturbs the function of the cell membrane; it is widely used as prophylactic antimycotic agent in *in vitro* culture. We show for the first time that *S. mansoni* miracidia infectivity is considerably reduced after AmB treatment. Moreover we demonstrate that AmB does not affect the development, growth, viability, and behavior of miracidia and primary sporocysts. Our data indicate that AmB effects on *S. mansoni* sporocyst prevalence are linked to the oxidative properties of AmB. These may alter the capacity of sporocysts to respond to the oxidative stress generated by the snail immune defence system.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis or bilharzia is a tropical parasitic disease affecting 200 million humans in 74 countries, causing 200,000 deaths annually. It is the second most important tropical disease in terms of morbidity after malaria. Schistosomiasis is caused by flatworms of the genus *Schistosoma*, with the most common causative species being *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, and *Schistosoma mansoni* (Chitsulo et al., 2004; Gryseels et al., 2006).

The cycle of the parasite is complex. It requires humans as definitive host and certain freshwater snail species as intermediate hosts. Infection occurs in water by the free-living larval stages (cercaria for the definitive host and miracidia for the intermediate host). Significant attention has been paid to freshwater snails over the past because of their both medical and epidemiological importance as intermediate hosts for schistosome parasites. Moreover, the interaction between *S. mansoni* and the snail *Biomphalaria glabrata* provides a model of choice in evolutionary biology to investigate the host–parasite coevolutionary dynamics (Beltran and Boissier, 2008; Beltran et al., 2008; Bouchut et al., 2008; Roger et al., 2008a,b,c; Steinauer, 2009). In this context, the *in vitro* maintenance of schistosome intramolluscan stages is a valuable tool to investigate host–parasite interaction, particularly at the molecular level (Coustau and Yoshino, 2000). Thus, *in vitro* culture is used often in this model to obtain pure parasites and/or secretion products to identify the molecules involved in host–parasite interplay (Bender et al., 2002; Guillou et al., 2007; Roger et al., 2008a,b,c), to perform pharmacological investigations (Mattos et al., 2006), or to study parasite development (Azzi et al., 2009).

To avoid the risk of contamination in those *in vitro* culture, antimicrobial substances were widely used, mainly streptomycin, penicillin (as antibiotics) and amphotericin B (as antimycotic) (Smyth, 1990). It is known that antimicrobials can have side effects and consequently may affect the cultivated organisms (Kuhlmann, 1995). Moreover, recent work has demonstrated activity of AmB against helminth parasites (Olds et al., 1981; Reuter et al., 2003).

In this paper we describe the effect of an antimicrobial mix on the miracidium infectivity. This antimicrobial substance is a mixture of two antibiotics, penicillin (PnG) and streptomycin (StrS) and one antimycotic: amphotericin B (AmB). Herein we show that AmB decreases the infectivity of the miracidium, the snail infective larval stage of schistosome parasite. To understand this anti-parasitic effect better, the mode of action of AmB was examined.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

The host–parasite association *B. glabrata–S. mansoni* originated from Brazil, and has been maintained in the laboratory for several years. Miracidia from *S. mansoni* were hatched from eggs axenically recovered from infected hamster (*Mesocricetus auratus*) livers after 50 days according as described procedures (Roger et al.,

* Corresponding author. Fax: +33 (0) 4 68 66 22 81.
E-mail address: benjamin.gourbal@univ-perp.fr (B.E.F. Gourbal).

0014-4894/$ - see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.exppara.2009.12.024

2008a,b,c). Briefly, livers were collected and kept in sterile 0.85% saline, containing a 1× antibiotic/antimycotic mixture (100 U/ml penicillin G, 0.1 mg/ml streptomycin sulfate, 0.25 μg/ml amphotericin B). The livers were homogenized and the eggs were filtered, washed and transferred to natural mineral water (Volvic) to allow miracidia to hatch under illumination.

2.2. Effect of antimicrobial substances on S. mansoni miracidia infectivity

Different antimicrobial substances were added directly into the dish containing the miracidia, and they were incubated for 3 h before snail infection. Five groups of miracidia were used: a control group (untreated miracidia), an antibiotic/antimycotic (AM) mixture 1× treated group, a penicillin G (PnG) treated group (100 U/ml), a streptomycin sulfate (StrS) treated group (0.1 mg/ml), a PnG (100 U/ml)/StrS (0.1 mg/ml) treated group, and an amphotericin B (AmB) treated group (0.25 μg/ml). For each group, 20 snails (5–7 mm diameter) were exposed individually to 10 miracidia. Following exposure snails were kept in water at a constant temperature of 26 °C and fed on lettuce *ad libitum*.

The infected or non-infected status of the exposed snails was detected by the observation of the mother sporocysts (Sp1) in the head–foot region. The snails were fixed 15 days post-exposure as described (Theron et al., 2008). Briefly, the snails were relaxed in water containing an excess of crystalline menthol for 6 h. The snail shell was removed and the body was fixed in modified Raillet–Henry's solution (930 ml distilled water, 6 g sodium chloride, 50 ml formol 40%, 20 ml acetic acid). The presence of Sp1 in each snail was determined by dissection of the head–foot zone and visual inspection. The Sp1 were readily observable as translucent white bodies within an opaque yellow tissue background.

2.3. Effect of antimicrobial substances on S. mansoni miracidia swimming behavior

Four groups of miracidia were formed and incubated during 3 h in Volvic water containing different antimicrobial substances AM 1×, PnG (100 U/ml), StrS (0.1 mg/ml), and AmB (0.25 μg/ml). An additional control experiment was done with untreated miracidia. The miracidia were filmed, their swimming behavior (sinuosity, rotation) was observed and their linear swimming speed was determined using the video analysis software Kinovea (http://www.kinovea.org).

2.4. Effect of antimicrobial substances on S. mansoni miracidia in vitro transformation to sporocysts and sporocyst viability

Miracidia were submitted to *in vitro* transformation to obtain primary sporocysts (Sp1). Miracidia were cultured for 24 h in sterile Chernin's balanced salt solution (CBSS) (Chernin, 1963), containing StrS (0.1 mg/ml) and PnG (100 U/ml) mixture (used as control), AM 1×, or AmB (0.25 μg/ml). The experiments were conducted two times in triplicate on 24 well plates with 20 sporocysts per well.

The percentage of transformed miracidia was determined directly by the observation of remaining miracidia not transformed after 24 h of culture. The viability of the Sp1 was assessed by two different methods (i) Sp1 were observed with a light microscope and considered alive when their motility and/or the beating of the flame cells' flagella was observed; (ii) the Sp1 were exposed to trypan blue and observed using a light microscope. Sp1 were considered dead when intra-sporocyst trypan blue accumulation could be observed.

2.5. Effect of AmB on B. glabrata hemocyte reactive oxygen species (ROS) production

Biomphalaria glabrata hemocytes were recovered after hemolymph puncture as previously described (Bouchut et al., 2006). Briefly, for each testing condition 500 μl of hemolymph were recovered and centrifuged (600*g*, 10 min) to pellet the hemocytes. Hemocytes were washed three times in PBS (phosphate buffered saline) to remove hemoglobin. Hemocytes were then incubated in 500 μl of PBS (control), or PBS containing (i) 1 μM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), (ii) 0.25 μM AmB, (iii) 1 μM PMA + 0.25 μM AmB. After 4 h 500 μl of nitroblue tetrazolium (NBT) was added to each sample and incubated at 20 °C for 60 min. The four samples were then centrifuged (600*g*, 10 min) and the hemocyte pellets were resuspended in 70% MeOH. Samples were centrifuged (600*g*, 10 min), the supernatant was discarded, 200 μl of dimethylsulfoxide (DMSO)/2 M KOH solution was added and samples were mixed vigorously. Absorbance of supernatants was read in a spectrophotometer at 620 nm vs. a DMSO/KOH blank. For each condition, values were expressed as OD for 5×10^4 hemocytes. The experiments were conducted two times in triplicate for each sample. The ROS-mediated (reactive oxygen species) reduction of NBT results in the precipitation of insoluble blue formazan which can be quantified spectrophotometrically in hemocytes or in hemocytes after treatment with the antimycotic AmB and the respiratory burst stimulator PMA. This protocol was adapted from a published method (Anderson and Brubacher, 1995).

2.6. Effect of AmB on S. mansoni sporocysts resistance to oxidative stress

Miracidia were cultured 24 h in sterile Chernin's balanced salt solution (CBSS), containing StrS (0.1 mg/ml) and PnG (100 U/ml) mixture (used as control), or AmB (0.25 μg/ml). After 24 h of culture, increasing amounts of H_2O_2 were added to the culture medium of primary sporocysts (Sp1). Five concentrations of H_2O_2 were tested: 0, 200, 400, 800 and 1600 μM. After 4 h, the viability of Sp1 was assessed as described above.

The experiments were conducted two times in triplicate on 24 well plates with 20 sporocysts per well.

2.7. Effect of AmB on S. mansoni sporocysts total antioxidant capacity

Quantitative measurement of the cumulative antioxidant capacity of sporocysts was determined following exposition to different AmB concentrations. Total antioxidant activity was measured using the Antioxidant Assay Kit (Sigma). For each test, 2000 sporocysts were *in vitro* transformed and cultured in sterile Chernin's balanced salt solution (CBSS), containing 0; 0.25; 0.5; or 1.25 μg/ml of AmB. After 24 h fully transformed sporocysts were recovered by gentle centrifugation (800*g*, 5 min, 4 °C), sonicated (3 pulses of 20 s), centrifuged to pellet cell debris (12,000*g*, 15 min, 4 °C) and antioxidant capacity of supernatant was determined following manufacturer's recommendations. Protein amount in the supernatant was determined using Bradford protein quantification assay and used as a correcting factor. The experiment was done six times for each AmB concentration tested.

2.8. Statistical analysis

Results of miracidia infection, miracidia transformation and sporocysts viability were analyzed using a two-tailed Fisher's Exact test. Results of miracidia linear swimming speed and hemocyte ROS production were analyzed using the Kruskal–Wallis test. Results of AmB effects on sporocysts resistance to oxidative stress and antioxidant capacity were analyzed using the Student *t*-test.

Levels of confidence lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of antimicrobial substances on S. mansoni miracidia infectivity

We assayed the effect of miracidia treatment with antimicrobial substances on infectivity (Fig. 1). Miracidia treated with 1× AM and AmB display significant prevalence decrease ($P < 0.006$ and $P < 0.005$, respectively) compared to the control. We observed a reduction of more than 50% of *S. mansoni* miracidia infectivity after those two treatments. Prevalence for the control was 65% and only 32.5% for 1× AM and 25% for AmB (Fig. 1). There is no significant difference between AM 1× and AmB treatments. In addition neither StrS nor PnG nor both drugs associated had effects on miracidia infectivity compared to the control (Fig. 1). These results permit us to conclude that AmB is reducing *S. mansoni* miracidia infectivity and that no synergistic or antagonistic effects could be observed with the other antimicrobial substances tested here.

3.2. Effect of antimicrobial substances on S. mansoni miracidia swimming behavior

Swimming behavior of miracidia was investigated after treatment with antimicrobial substances. Linear swimming speed (Fig. 2A), sinuosity and miracidia swimming rotation (data not show) did not differ from that of the control. The linear swimming speed was of 1.35, 1.18, 1.17, 1.21, and 1.16 mm/s for the control, 1× AM, AmB, PnG, and StrS, respectively. No significant differences were observed between those values (Kruskal–Wallis; $P = 0.63$). Thus, none of the molecules tested have an effect on swimming behavior of miracidia.

3.3. Effect of antimicrobial substances on S. mansoni miracidia in vitro transformation to sporocysts and sporocysts viability

In this experiment the use of antimicrobial molecules in the culture medium was necessary to avoid microbial contamination. Thus, a PnG/StrS mixture was used as control. Miracidia transformation and sporocyst viability was compared between this control and 1× AM or AmB (see Fig. 2B). Miracidia transformation did not differ from that of the control. The percentage of transformed miracidia to sporocysts was 97%, 96% and 98% for the control, 1× AM, and AmB, respectively. The sporocysts viability after 24 h in culture was very good with 93.2%, 93.8%, and 91.9% of live sporocysts for the control, 1× AM, and AmB (Fig. 2B.1). Miracidia and sporocysts did not show any tegumental lysis or shape modifications when comparing the control and AmB (Fig. 2B.2). Motility, beating of the flame cells' flagella or trypan blue efflux were the same for all samples. To conclude, none of the molecules tested seem to have an effect on miracidia transformation and sporocyst viability.

3.4. Effect of AmB on B. glabrata hemocyte reactive oxygen species (ROS) production

Here we tried to quantify the ROS production of *B. glabrata* hemocytes after treatment with AmB in the presence or absence of PMA, a respiratory burst stimulator. The ROS produced by the hemocytes reduce NBT and the optical density (OD) of reduced NBT was quantified. Intracellular ROS production by AmB treated and PMA stimulated cells did not differ from that of untreated/unstimulated control cells (Fig. 2C). The OD of reduced NBT for 5×10^4 hemocytes was 0.084, 0.083, 0.088 and 0.095 for the control, PMA, AmB and AmB/PMA, respectively (Fig. 2C). No significant differences were observed between those values (Kruskal–Wallis; $P = 0.84$). It seems that AmB did not affect *B. glabrata* hemocyte ROS production, with or without burst stimulation.

3.5. Effect of AmB on S. mansoni sporocysts resistance to oxidative stress

Resistance of Sp1 to oxidative stress was investigated after treatment with AmB. Here we used exposure to H_2O_2 for 4 h as oxidative stress. Different concentrations of H_2O_2 were used. No significant differences between AmB treated and untreated sporocysts (control) were observed for 0, 200, 400 and 800 μM of H_2O_2 (Fig. 3). However, for 1600 μM a significant difference was noted (Student *t*-test; $P = 0.048$) (Fig. 3). Viability values were 95.5% and 99.3% for AmB treated and untreated, respectively. This suggests that Sp1 exposed to AmB would be less able to respond to oxidative stress.

3.6. Effect of AmB on S. mansoni sporocysts total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity of sporocysts was determined after exposition to increase concentrations of AmB (Fig. 4). Sporocysts antioxidant activity decreases when AmB concentrations increase.

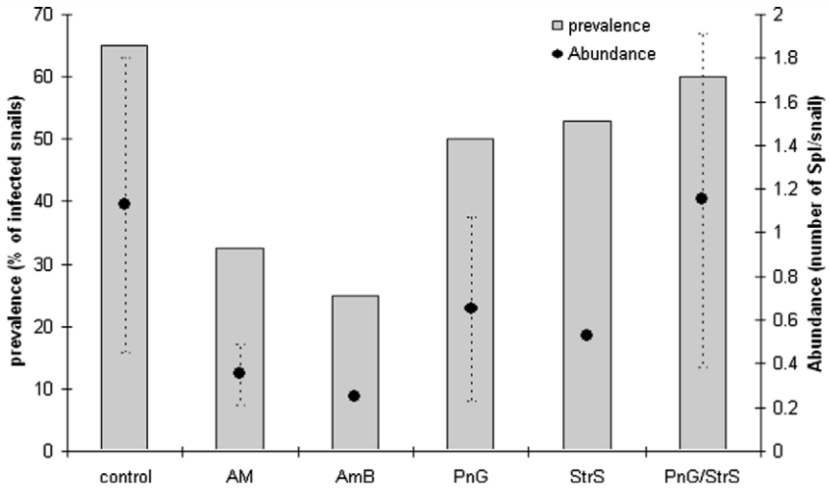


Fig. 1. Prevalence and abundance of *S. mansoni* sporocysts in *B. glabrata* exposed to miracidia treated with different antimicrobial substances. The snails were individually exposed to 10 miracidia treated either by 1× AM, 100 U/ml PnG, 10 mg/ml StrS, 100 U/ml PnG with 10 mg/ml StrS or 0.25 μg/ml AmB. The control was untreated miracidia. The asterisks indicate treatment for which the decrease of prevalence is significant ($P < 0.05$).

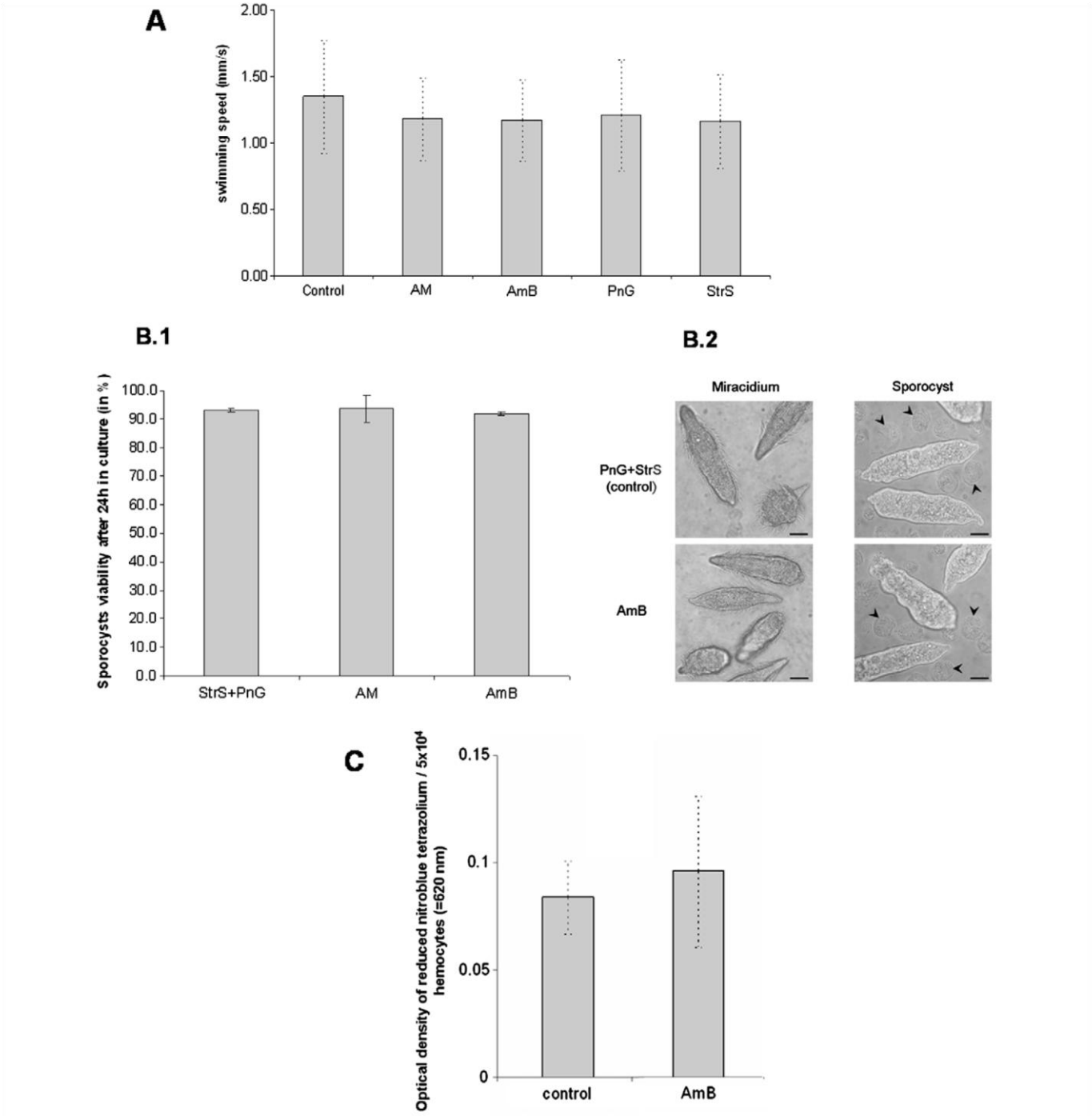


Fig. 2. Influence of the antimicrobial substances on *S. mansoni* and *B. glabrata* behavioral and physiological traits. (A) Linear swimming speed of miracidia exposed to 1× AM, 100 U/ml PnG, 10 mg/ml StrS, or 0.25 μg/ml AmB. (B.1) Viability % of sporocysts after 24 h in CBSS medium containing a mixture of 100 U/ml PnG and 10 mg/ml StrS used as control or 1× AM or 0.25 μg/ml AmB. (B.2) *S. mansoni* miracidia and cultivated sporocysts in presence or absence of 0.25 μg/ml AmB. Miracidia and sporocysts were exposed to AmB for 3 and 24 h, respectively. The detached ciliated plates in the sporocysts culture were indicated with black arrows. Scale bars are 35 μm. (C) AmB (0.25 μg/ml) effect on ROS production by *B. glabrata* hemocytes stimulated or not by PMA. The ROS production was assessed by the reduction of nitroblue tetrazolium measured spectrophotometrically at 620 nm.

Antioxidant concentration was 214.02 μM when no AmB was present in the culture medium and significantly decreased to 105.08 μM when 1.25 μg/ml of AmB was added to the culture medium (Student *t*-test; $P = 0.00107$) (Fig. 4). To conclude it seems that AmB affect directly the total antioxidant capacity of sporocysts.

4. Discussion

AmB is known to be an antifungal agent that binds to sterols (cholesterol and ergosterol) in the fungal cell wall, forming transmembrane channels resulting in osmotic lysis and death of the organism (HsuChen and Feingold, 1973a,b; Reuter et al., 2003).

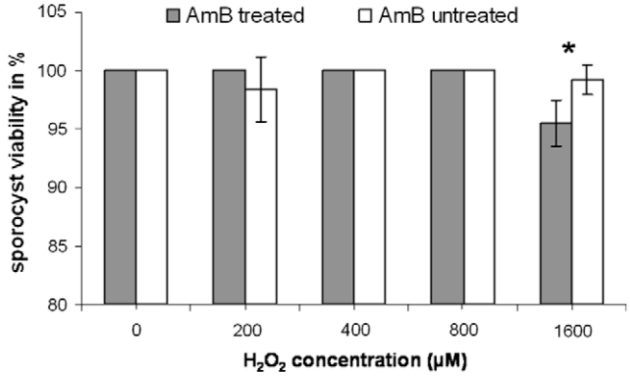


Fig. 3. Sporocyst viability 4 h after exposure to different H_2O_2 concentrations. The sporocysts were treated with AmB (0.25 µg/ml) for 24 h in CBSS medium or untreated. The asterisk indicate significant difference ($P < 0.05$) of viability between AmB treated and untreated sporocysts.

On the other hand, several studies suggest that AmB has an effect on prokaryotes and eukaryotes (protozoan and metazoan) (Cruz et al., 1980; Lachaud et al., 2009; Olds et al., 1981; Reuter et al., 2003; Thomas et al., 1973). The protective effect against those pathogens was linked mainly to AmB immunomodulatory effects and induction of macrophage activation (Beccari et al., 1991; Kumar and Chakrabarti, 2000; Little et al., 1978; Olds et al., 1981; Wilson et al., 1991; Wolf and Massof, 1990). However, on helminths AmB was shown to act by two different ways. Alveolar echinococcosis caused by the parasitic cestode *Echinococcus multilocularis* was significantly reduced by AmB treatment (Reuter et al., 2003). AmB seems to act directly on the parasite cell membrane. This destructive effect suppressed parasite growth and development (Reuter et al., 2003). With the helminth *S. mansoni*, AmB treatment increases resistance in mice to a challenge with *S. mansoni* cercariae (Olds et al., 1981). AmB treatment was effective in protecting mice by killing schistosomula, the migrating larval stage of the parasite. This study demonstrated activation of murine macrophages by AmB, which contributes to enhanced mice resistance to infection (Olds et al., 1981).

In our study we investigated the effect of AmB on the *S. mansoni* larval stage interacting with the invertebrate host *B. glabrata*. To our knowledge, we demonstrate for the first time a reduction of *S. mansoni* miracidia infectivity after AmB treatment (Fig. 1). We observed a reduction of Sp1 prevalence of more than 50% after treatment of miracidia with AmB (Fig. 1).

Based on previous work conducted on the AmB effect on helminthes, we tried to determine the mechanisms by which AmB reduces *S. mansoni* miracidia infectivity. A direct deleterious effect on miracidia was considered. We investigated the effect of AmB on parasite and host behavior and physiological traits but no significant differences were noted (Fig. 2).

Thus AmB would not be able to impair (i) the capacity of *S. mansoni* miracidia to find and penetrate into snail host in aquatic environment, (ii) the capacity of *S. mansoni* miracidia to transform into sporocysts, (iii) the sporocysts growth, development and viability. The present results showed that AmB did not have any direct deleterious effect on miracidia and sporocysts.

To go further we looked at the immunomodulatory effect of AmB. In vertebrates AmB was known to activate macrophage oxidative burst by the production of reactive oxygen metabolites (Wilson et al., 1991; Wolf and Massof, 1990). In invertebrate host of *S. mansoni, B. glabrata*, the internal defense system is mediated by either humoral and/or cell components (Ataev and Coustau, 1999; Bayne et al., 2001). The most important effectors of immunity in molluscs are the circulating hemocytes. These phagocytic cells are able to distinguish foreign, non-self material, and encapsulate, kill and eliminate invaders such as parasite sporocysts (de Jong-Brink et al., 2001; Hahn et al., 2001). Several studies have indicated that reactive oxygen species (ROS), like hydrogen peroxide, produced by hemocytes play a crucial role in the killing of the parasite (Adema et al., 1994; Bayne et al., 2001; Dikkeboom et al., 1988; Hahn et al., 2001). In the present study we investigated the *in vitro* effect of AmB on *B. glabrata* hemocyte ROS production. ROS were quantified by NBT reduction after hemocytes treatment with AmB alone or in combination with the respiratory burst stimulator PMA. Intracellular ROS production by AmB treated and PMA stimulated hemocytes did not differ from that of untreated/unstimulated control cells (Fig. 2C). It seems that AmB did not affect *B. glabrata* immune effectors. Unlike vertebrates it seems that AmB did not induce immunomodulatory effect in the invertebrate's phagocytic cells and did not activate hemocyte oxidative burst.

Decreased prevalence of *S. mansoni* sporocysts after AmB treatment observed in the present paper would thus neither be related to a direct deleterious effect on the parasite's membrane nor to activation of invertebrate host immunity. However, AmB may induce oxidative damage in conjunction with other oxidizing agents (Brajtburg et al., 1985). Thus we investigated the resistance of Sp1 to H_2O_2 oxidative stress after treatment with AmB. A significant difference was noted between AmB treated and untreated sporocysts (Fig. 3). This suggests that Sp1 exposed to AmB are less able to respond to oxidative stress. To go further and clarify the influence of AmB on parasite antioxidant activity, we measure the total antioxidant capacity of the sporocysts after treatment with AmB. The results show that AmB treatment causes a decrease of the sporocyst antioxidant capacity in a dose-dependant manner. Living organisms have a large number of antioxidants, including macro- and micro-molecules, and enzymes that play a central role in preventing oxidative stress. AmB affects the global antioxidant

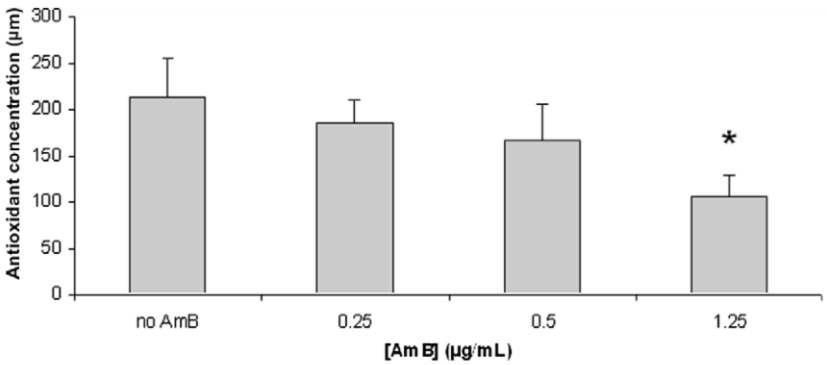


Fig. 4. Total antioxidant capacity of sporocysts exposed to different concentrations of AmB. The sporocysts were treated with AmB (0.25; 0.5; 1.25 µg/ml) for 24 h in CBSS medium or untreated. The asterisk indicate significant difference ($P < 0.05$) of antioxidant concentration between AmB treated and untreated sporocysts.

capacity of the parasite and thus directly reduces its ability to respond to oxidative stress.

It is known that miracidia and sporocysts use antioxidant molecules and ROS scavengers to protect themselves against hemocyte-mediated cytotoxicity (Bernal et al., 2006; Connors et al., 1991; Guillou et al., 2007; Knudsen et al., 2005; Perez-Sanchez et al., 2006; Roger et al., 2008a,b,c). If parasite antioxidant molecules were used to overcome AmB oxidant effects, those molecules would not be available and effective against ROS snail host activities. Thus sporocysts would not be able to protect themselves from a second oxidative stress that occurred when sporocysts are confronted by snail hemocytes ROS products (Bayne, 2009; Bayne et al., 2001; Bender et al., 2005).

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS. We thank Bernard Dejean and Anne Rognon, for technical assistance. We are grateful to Dr. Michael Freitag and Dr. Christoph Grunau for their critical reading of the manuscript.

References

Adema, C.M., van Deutekom-Mulder, E.C., van der Knaap, W.P., Sminia, T., 1994. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. Parasitology 109 (Pt. 4), 479–485.

Anderson, R.S., Brubacher, L.L., 1995. Intracellular Superoxide Production by Quantitative Nitroblue Tetrazolium Reduction. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA.

Ataev, G.L., Coustau, C., 1999. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. Developmental and Comparative Immunology 23, 187–198.

Azzi, A., Cosseau, C., Grunau, C., 2009. *Schistosoma mansoni*: developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors. Experimental Parasitology 121, 288–291.

Bayne, C.J., 2009. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. Molecular and Biochemical Parasitology 165, 8–18.

Bayne, C.J., Hahn, U.K., Bender, R.C., 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. Parasitology 123 (Suppl.), S159–S167.

Beccari, T., Mazzolla, R., Constanzi, E., Datti, A., Barluzzi, R., Bistoni, F., Orlacchio, A., 1991. Amphotericin B stimulates secretion of beta-hexosaminidase from mouse adherent spleen cells. Biochemistry International 24, 235–241.

Beltran, S., Boissier, J., 2008. Schistosome monogamy: who, how, and why? Trends in Parasitology 24, 386–391.

Beltran, S., Cezilly, F., Boissier, J., 2008. Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. PLoS One 3, e3328.

Bender, R.C., Bixler, L.M., Lerner, J.P., Bayne, C.J., 2002. *Schistosoma mansoni* sporocysts in culture: host plasma hemoglobin contributes to in vitro oxidative stress. The Journal of Parasitology 88, 14–18.

Bender, R.C., Broderick, E.J., Goodall, C.P., Bayne, C.J., 2005. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H_2O_2 than susceptible snails. The Journal of Parasitology 91, 275–279.

Bernal, D., Carpena, I., Espert, A.M., De la Rubia, J.E., Esteban, J.G., Toledo, R., Marcilla, A., 2006. Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infections. Proteomics 6, 2835–2843.

Bouchut, A., Sautiere, P.E., Coustau, C., Mitta, G., 2006. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. Acta Tropica 98, 234–246.

Bouchut, A., Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Coustau, C., Mitta, G., 2008. The compatibiuty polymorphism in invertebrate host/trematodes interactions: research of molecular determinants. Parasite 15, 304–309.

Brajtburg, J., Elberg, S., Schwartz, D.R., Vertut-Croquin, A., Schlessinger, D., Kobayashi, G.S., Medoff, G., 1985. Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 27, 172–176.

Chernin, E., 1963. Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus*. The Journal of Parasitology 49, 353–364.

Chitsulo, L., Loverde, P., Engels, D., 2004. Schistosomiasis. Nature Review Microbiology 2, 12–13.

Connors, V.A., Lodes, M.J., Yoshino, T.P., 1991. Identification of a *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory–secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology 58, 387–395.

Coustau, C., Yoshino, T.P., 2000. Flukes without snails: advances in the in vitro cultivation of intramolluscan stages of trematodes. Experimental Parasitology 94, 62–66.

Cruz, F.S., Marr, J.J., Berens, R.L., 1980. Prevention of transfusion-induced Chagas' disease by amphotericin B. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29, 761–765.

de Jong-Brink, M., Bergamin-Sassen, M., Solis Soto, M., 2001. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. Parasitology 123 (Suppl.), S129–S141.

Dikkeboom, R., Bayne, C.J., van der Knaap, W.P., Tijnagel, J.M., 1988. Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. Parasitology Research 75, 148–154.

Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L., 2006. Human schistosomiasis. Lancet 368, 1106–1118.

Guillou, F., Roger, E., Mone, Y., Rognon, A., Grunau, C., Theron, A., Mitta, G., Coustau, C., Gourbal, B.E., 2007. Excretory–secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. Molecular and Biochemical Parasitology 155, 45–56.

Hahn, U.K., Bender, R.C., Bayne, C.J., 2001. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. The Journal of Parasitology 87, 778–785.

HsuChen, C.C., Feingold, D.S., 1973a. Polyene antibiotic action on lecithin liposomes: effect of cholesterol and fatty acyl chains. Biochemical and Biophysical Research Communications 51, 972–978.

HsuChen, C.C., Feingold, D.S., 1973b. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on lecithin membrane models (liposomes). Antimicrobial Agents and Chemotherapy 4, 309–315.

Knudsen, G.M., Medzihradszky, K.F., Lim, K.C., Hansell, E., McKerrow, J.H., 2005. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. Molecular and Cellular Proteomics 4, 1862–1875.

Kuhlmann, I., 1995. The prophylactic use of antibiotics in cell culture. Cytotechnology 19, 95–105.

Kumar, S., Chakrabarti, R., 2000. Amphotericin B both inhibits and enhances T-cell proliferation: inhibitory effect is mediated through H(2)O(2) production via cyclooxygenase pathway by macrophages. Journal of Cellular Biochemistry 77, 361–371.

Lachaud, L., Bourgeois, N., Plourde, M., Leprohon, P., Bastien, P., Ouellette, M., 2009. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfected with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. Clinical Infectious Diseases 48, e16–e22.

Little, J.R., Plut, E.J., Kotler-Brajtburg, J., Medoff, G., Kobayashi, G.S., 1978. Relationship between the antibiotic and immunoadjuvant effects of amphotericin B methyl ester. Immunochemistry 15, 219–224.

Mattos, A.C., Kusel, J.R., Pimenta, P.F., Coelho, P.M., 2006. Activity of praziquantel on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 101 (Suppl. 1), 283–287.

Olds, G.R., Stewart, S.J., Ellner, J.J., 1981. Amphotericin B-induced resistance to *Schistosoma mansoni*. Journal of Immunology 126, 1667–1670.

Perez-Sanchez, R., Ramajo-Hernandez, A., Ramajo-Martin, V., Oleaga, A., 2006. Proteomic analysis of the tegument and excretory–secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. Proteomics 6 (Suppl. 1), S226–S236.

Reuter, S., Merkle, M., Brehm, K., Kern, P., Manfras, B., 2003. Effect of amphotericin B on larval growth of *Echinococcus multilocularis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, 620–625.

Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Pierce, R.J., Galinier, R., Mitta, G., 2008a. Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology 157, 217–227.

Roger, E., Grunau, C., Pierce, R.J., Hirai, H., Gourbal, B., Galinier, R., Emans, R., Cesari, I.M., Cosseau, C., Mitta, G., 2008b. Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). PLoS Neglected Tropical Diseases 2, e330.

Roger, E., Mitta, G., Mone, Y., Bouchut, A., Rognon, A., Grunau, C., Boissier, J., Theron, A., Gourbal, B.E., 2008c. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach. Molecular and Biochemical Parasitology 157, 205–216.

Smyth, J.D., 1990. In Vitro Cultivation of Parasitic Helminths. CRC, Boca Raton.

Steinauer, M.L., 2009. The sex lives of parasites: investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni*. International Journal for Parasitology 39, 1157–1163.

Theron, A., Coustau, C., Rognon, A., Gourbiere, S., Blouin, M.S., 2008. Effects of laboratory culture on compatibility between snails and schistosomes. Parasitology 135, 1179–1188.

Thomas, M.Z., Medoff, G., Kobayashi, G.S., 1973. Changes in murine resistance to *Listeria monocytogenes* infection induced by amphotericin B. The Journal of Infectious Diseases 127, 373–377.

Wilson, E., Thorson, L., Speert, D.P., 1991. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 35, 796–800.

Wolf, J.E., Massof, S.E., 1990. In vivo activation of macrophage oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. Infection and Immunity 58, 1296–1300.

ARTICLE IN PRESS

International Journal for Parasitology xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara

An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions

Yves Moné [a], Anne-Cécile Ribou [b], Céline Cosseau [a], David Duval [a], André Théron [a], Guillaume Mitta [a], Benjamin Gourbal [a,*]

[a] Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5244, CNRS Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France
[b] Institut de Modélisation et d'Analyse en Géo-Environnement et Santé (laboratoire IMAGES), EA4218 Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 October 2010
Received in revised form 24 December 2010
Accepted 24 January 2011
Available online xxxx

Keywords:
Host-parasite co-evolution
Schistosoma mansoni
Biomphalaria glabrata
Reactive oxygen species (ROS)
ROS scavengers

ABSTRACT

The co-evolution between hosts and parasites involves huge reciprocal selective pressures on both protagonists. However, relatively few reports have evaluated the impact of these reciprocal pressures on the molecular determinants at the core of the relevant interaction, such as the factors influencing parasitic virulence and host resistance. Here, we address this question in a host-parasite model that allows co-evolution to be monitored in the field: the interaction between the mollusc, *Biomphalaria glabrata*, and its trematode parasite, *Schistosoma mansoni*. Reactive oxygen species (ROS) produced by the haemocytes of *B. glabrata* are known to play a crucial role in killing *S. mansoni*. Therefore, the parasite must defend itself against oxidative damage caused by ROS using ROS scavengers in order to survive. In this context, ROS and ROS scavengers are involved in a co-evolutionary arms race, and their respective production levels by sympatric host and parasite could be expected to be closely related. Here, we test this hypothesis by comparing host oxidant and parasite antioxidant capabilities between two *S. mansoni/B. glabrata* populations that have co-evolved independently. As expected, our findings show a clear link between the oxidant and antioxidant levels, presumably resulting from sympatric co-evolution. We believe this work provides the first supporting evidence of the Red Queen Hypothesis of reciprocal evolution for functional traits at the field-level in a model involving a host and a eukaryotic parasite.
© 2011 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Understanding the co-evolution of host-parasite interactions represents a challenge in evolutionary biology. Parasites cause substantial deleterious effects on their hosts, and therefore represent a major driving force in their evolution (Howard, 1991). Similarly, the host immune defenses represent the major selective pressure driving the evolution of parasites. For parasites to survive and develop in the host they must adapt to the host-defence system or they will die. This parallel co-evolution of host-parasite interactions can be viewed as an arms race in which both the host and the parasite develop mechanisms to circumvent the weapons developed by their opponent. In this context of reciprocal co-evolution, illustrated by Van Valen (1974), under the Red Queen Hypothesis it is assumed that the parasitic genes responsible for infectivity will evolve alongside the host defence genes, resulting in adaptation of the interactions between local host and parasite populations (Dybdahl and Storfer, 2003). To date, however, only a few studies have sought to verify this prediction and convincing experiments have only been reported for models involving viruses, bacteria and unicellular eukaryotes (Lohse et al., 2006; Forde et al., 2008).

Demonstrating co-evolution in an animal host-parasite system is not straightforward and most prior discussions of such processes have been indirect, as in studies describing local adaptation when compatibility is higher between sympatric host-parasite combinations than between allopatric combinations (Gasnier et al., 2000; Gagneux et al., 2006; Munoz-Antoli et al., 2010), or studies that have focused on only one trait of the interaction, such as host resistance (Green et al., 2000) or parasite infectivity (Little et al., 2006). Moreover it is important to take into account that non-co-evolutionary mechanisms could also explain correlations between the traits of interacting species and that the absence of correlated traits is not evidence for an absence of co-evolution (Nuismer et al., 2007, 2010; Yoder and Nuismer, 2010). However we assume that the direct examination of reciprocal selection in both the host and the parasite could provide supporting evidence of co-evolution.

Two relatively recent studies investigated this reciprocal response more thoroughly. In the first, reciprocal changes in resistance and infectivity were identified for co-evolving *Potamopyrgus* snail hosts and their trematode parasites; however, while these changes were identified using prevalence phenotypes, they were

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 30 19 23 12; fax: +33 (0)4 68 66 22 81.
E-mail address: benjamin.gourbal@univ-perp.fr (B. Gourbal).

0020-7519/$36.00 © 2011 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

not supported by the studied functional markers (Koskella and Lively, 2007). The second report provided experimental support for the reciprocity of adaptation costs, rapid genetic changes and increased genetic diversity during the co-evolution of a multicellular host, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and its pathogenic bacteria, the Gram-positive bacterium, *Bacillus thuringiensis* (Schulte et al., 2010). In both papers, co-evolution was studied using laboratory strains selected by experimental evolutionary approaches, and only the second paper focused on molecular changes induced by the co-evolutionary process. Both papers were based on an "over time" approach in which the evolution of phenotypes was monitored over the course of experimental laboratory generations. Other empirical studies have been based on a "point time" approach in which the pattern of co-variations between host-parasite populations or strains that co-evolved independently were assessed at a single experimental time point (Forde et al., 2004; Morgan et al., 2005).

Here, we investigated the reciprocal evolution of molecular mechanisms directly at the core of the host-parasite interaction in a natural system of co-evolution, by comparing host and parasite populations that have co-evolved independently. As a model, we used the interaction between the trematode, *Schistosoma mansoni* (responsible for human intestinal schistosomiasis), and its mollusc intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. This interaction is a model of choice for the study of potential co-evolutionary dynamics (Webster and Davies, 2001; Webster et al., 2004; Beltran and Boissier, 2008; Beltran et al., 2008; Bouchut et al., 2008; Roger et al., 2008a, 2008b, 2008c; Steinauer, 2009).

During its intramolluscal stage, the parasite must cope with the snail's immune system. One of the main immune effectors in molluscs are the reactive oxygen species (ROS) produced by haemocytes (the circulating immune cells of snails) (Hahn et al., 2000, 2001a; de Jong-Brink et al., 2001; Mourao et al., 2009b). Previous studies conducted by Hahn and co-workers demonstrated that hydrogen peroxide (H_2O_2) plays a crucial role in the killing of *S. mansoni* sporocysts (Hahn et al., 2001a, 2001b). Furthermore, haemocytes from *S. mansoni*-resistant snails were shown to generate significantly more H_2O_2 than susceptible snails, perhaps due at least in part to the former having constitutively elevated levels of the mRNA encoding the copper/zinc superoxide dismutase (Cu-ZN SOD) (Goodall et al., 2004; Bender et al., 2005, 2007). To resist ROS-mediated attacks, the *S. mansoni* larvae produce ROS-detoxifying enzymes (Vermeire et al., 2006; Guillou et al., 2007; Vermeire and Yoshino, 2007; Roger et al., 2008c; Wu et al., 2009), several of which appear to be secreted by sporocysts (Guillou et al., 2007; Wu et al., 2009). Supporting this, a recent report showed that antioxidant enzymes produced by *S. mansoni* sporocysts are directly involved in protecting the pathogen against immune cell-mediated oxidative stress (Mourao et al., 2009b).

In this context, the snail-produced ROS and the parasite-produced ROS scavengers are involved in a co-evolutionary arms race, and we can hypothesise that their production levels will be closely related. Here, we tested this hypothesis by comparing host oxidant and parasite antioxidant abilities for two *S. mansoni*/*B. glabrata* strains that have evolved independently, originated from different geographical endemic zones and which are found to display significant differences in compatibility.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Our laboratory has received the permit # A66040 for experiments on animals from both the French Ministry of Agriculture and Fishing and the French Ministry of National Education, Research and Technology. Housing, breeding and care of the mice followed the ethical requirements of French government. The experimenter possesses the official certificate for animal experimentation delivered by both ministries (Décret #87–848 du 19 octobre 1987; number of the authorisation 007083).

2.2. Biological materials

Two strains of *S. mansoni* were used in this study: a Brazilian strain (*Sm*BRE) and a Guadeloupean strain (*Sm*GH2). Each strain was maintained: (i) in their sympatric strain of *B. glabrata* (*Bg*BRE and *Bg*GUA, respectively); and (ii) in hamsters (*Mesocricetus auratus*), as described previously (Théron et al., 1997).

Miracidia from *Sm*BRE and *Sm*GH2 were hatched from eggs axenically recovered from 60-day-infected hamster livers, according to the previously described procedure (Roger et al., 2008c). Briefly, livers were collected and kept overnight at 4 °C in sterile saline solution (NaCl 150 mM) containing an antibiotic/antimycotic mixture (penicillin 100 units/ml, streptomycin 0.1 mg/ml, amphotericin B 0.25 μg/ml; Sigma). The livers were then homogenised and the eggs were filtered out, washed, and transferred to spring water. The miracidia were allowed to hatch out under illumination.

2.3. Schistosome-snail compatibility: snail exposure, infection rates and intensities

The compatibilities of the tested snail-schistosome combinations were evaluated by monitoring the infection rates (% of snails infected) and the intensity of infection (number of mother sporocysts (SpI) developed) amongst snails individually challenged with different numbers of miracidia. As the miracidial dose increased, a larger fraction of the phenotypic diversity in the parasitic isolate was sampled; thus, dose–response curves are much more informative than single-dose challenges when examining the dynamics of compatibility between two host-parasite combinations (Théron et al., 2008).

For each experiment, snails (7–9 mm in diameter) were exposed individually to a fixed number of miracidia in approximately 10 ml of water for 8 h. Following exposure to miracidia, the snails were replaced in their original containers until their infection status (presence of SpI) was assessed. For the detection of SpI, the snails were fixed 15 days post-exposure, following previously described methods (Gerard et al., 1995; Moné et al., 2010b). In brief, each snail was relaxed in pond water containing an excess of crystalline menthol for 6 h, the body was removed and fixed in modified Raillet–Henry's solution, exhaustive dissection of the head-foot zone was performed, and the number of SpI present in each snail (readily observable as translucent white bodies within an opaque grey tissue background) was determined.

Dose–response curves were obtained by challenging individual snails (30–40 snails per treatment) with doses of one, 10, 20, 30 and 50 miracidia. Compatibility was measured for the two sympatric combinations (*Sm*BRE versus *Bg*BRE and *Sm*GH2 versus *Bg*GUA) and the two allopatric combinations (*Sm*BRE versus *Bg*GUA and *Sm*GH2 versus *Bg*BRE).

2.4. Cytotoxicity of H_2O_2 on S. mansoni sporocysts

H_2O_2 cytotoxicity was measured using the Roche Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), which is based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from dead and lysed cells into the supernatant. Four hundred miracidia each of *Sm*BRE and *Sm*GH2 were submitted to in vitro transformation to obtain primary sporocysts (Sp1). Briefly, the miracidia were cultured for 24 h in sterile Chernin's balanced salt solution (CBSS) (Chernin, 1963), containing an antibiotic/

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

antimycotic mixture (penicillin 100 units/ml, streptomycin 0.1 mg/ml, amphotericin B 0.25 μg/ml; Sigma). The sporocysts were then exposed to four different concentrations of H_2O_2 (0, 75, 150 and 200 μM) for 2 h and cytotoxicity was examined according to the manufacturer's instructions. As a positive control, we measured LDH release from Sp1 that had been lysed with the provided lysis solution (high control, HC); this was taken as 100% LDH release. To correct for the background, we measured LDH levels in Sp1-free H_2O_2-treated culture medium (substance control, SC). All measured values were assayed in triplicate. The percentage of specific H_2O_2-induced LDH release was determined as: % cytotoxicity = [(experimental result − SC)/(HC − SC)] × 100.

2.5. Effect of H_2O_2 on S. mansoni sporocyst mortality

Two independent experiments were conducted in triplicate on 24-well plates containing 20 Sp1 (representing *Sm*BRE or *Sm*GH2) per well. The Sp1 were in vitro transformed as described above (see Section 2.2), and exposed to 0, 200, 400, 800 or 1600 μM of H_2O_2 (hydrogen peroxide 35%, FLUKA, Germany) for 4 h. Mortality was assessed under a light microscope, with the Sp1 considered "dead" when we failed to observe motility and/or the beating of the flame-cell flagella.

2.6. The total antioxidant capacity of S. mansoni sporocysts

The cumulative (total) antioxidant capacity of the sporocysts was quantified for the two parasite strains, *Sm*BRE and *Sm*GH2, using an Antioxidant Assay Kit (Sigma). For each test, 2000 sporocysts were in vitro transformed as described above. After 24 h, fully transformed sporocysts were recovered by gentle centrifugation (800*g*, 5 min, 4 °C). The samples were then disrupted by sonication (three pulses of 20 s each) and pelleted by centrifugation (12,000*g*, 15 min, 4 °C), and the antioxidant capacity of each supernatant was determined following the manufacturer's recommendations. The amount of protein in each supernatant was determined using a Bradford protein assay kit and used as a correcting factor. The experiment was performed six times per strain.

2.7. Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR analyses were conducted to compare the expression of parasite antioxidant enzymes suspected to play key roles in the detoxification of host-induced oxidative stress. Real-time PCR analyses were performed using a LightCycler 2.0 system (Roche Applied Science) and a LightCycler Faststart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Applied Science). Total RNA extractions from miracidia were performed using the Trizol Reagent (Life Technologies, USA) and the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed according to previously described procedures (Guillou et al., 2004). qPCR amplification was performed using 2.5 μl of cDNA in a final volume of 10 μl containing 3 mM $MgCl_2$, 0.5 μM of each primer and 1 μl of master mix. The primers were designed using either the LightCycler probe design software or the web-based Primer3 plus interface (http://www.bioinformatics.nl/cgibin/primer3plus/primer3plus.cgi) and are given in Table 1. The following Light-Cycler run protocol was used: denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification and quantification at 95 °C for 10 s, 60 °C for 5 s and 72 °C for 16 s, a melting curve of 60–95 °C with a heating rate of 0.1 °C/s and continuous fluorescence measurement, and then a cooling step to 40 °C. For each reaction, the cycle threshold (Ct) was determined using the "Fit Point Method" of the LightCycler Software, version 3.3. The PCR reactions were performed in duplicate and the mean Ct value was calculated. For each sample, the expression level of the target gene was normalised with regard to the expression of two constitutively expressed genes (28S rRNA and α tubulin). The expression ratio (R) was calculated according to the formula: $R = 2(\Delta Ct)$, where ΔCt represents Ct (target gene) − Ct (constitutively expressed gene).

2.8. ROS detection in single cells

The cell-permeable fluorescent oxygen probe, 1-pyrenebutyric acid (PBA), can be used for the measurement of free radicals in solution (Oter and Ribou, 2009) and in living cells (Ribou et al., 2004; Rharass et al., 2006), with the fluorescence intensity and lifetime of PBA decreasing proportionately to the free-radical concentration. Measurement of the fluorescent lifetime offers many advantages over intensity based measurements when working in vivo, not the least that the measurements are independent of the absolute intensity of emitted light and the fluorophore concentration, thereby avoiding artifacts arising from optical losses. Moreover, these probes do not require a reaction with ROS, are usually stable and the fluorescent lifetime is not modified by probe degradation or variations in its intracellular accumulation.

2.8.1. Staining and fixation

Haemolymph samples were recovered from *Bg*BRE and *Bg*GUA snails, and aliquots (150 μl) were put in a Sykes–Moore chamber. After 4 h, the adhered haemocytes were rinsed with Hank's buffered salt solution (HBSS) and stained for 20 min with PBA (Acros Organics, Belgium; 0.10 μM in 1% ethanol). The haemocytes were then rinsed three times and placed in HBSS for measurements. For fixation experiments, haemocytes were treated as described above except that after the final rinsing step, the cells were killed by incubation for 10 min in Baker solution (10% paraformaldehyde in 1% aqueous calcium chloride). In the latter case, the experiments were performed within 1 h after cell killing, in order to avoid probe reorganization (Ribou et al., 2004).

Table 1
Primer sequences for quantitative reverse transcription-PCR in this study.

Gene name and SchistoDB ID	Amplicon length	Smp_scaffold	Forward primer (5′ to 3′)	Reverse primer (5′ to 3′)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) Smp_056970	125	000155	TGGCCGTGGAGCGATGCAAA	CGTCTGGTGTTGGGACGCGG
Glutathione-*S*-transferase omega Smp_152710	148	000154	ACAGCTCTAGTTGTCGACCAAACATC	ACGCGGTCAACGTAAGGGCA
Glutathione-*S*-transferase 28 kD (GST 28) Smp_054160	128	000143	CGGACGCGGACGTGCTGAAT	CAGGCAATCGTCCGCCTGGA
Glutathione-*S*-transferase 26 kD (GST 26) Smp_163610	104	000249	GCAAAGCTGGTGGTTTGGGGC	TGCATGACCTTCCTGTTCGTCAAG
Glyoxalase II Smp_091010	124	000428	ATGGCCTTCATTGCTTTGGACAGA	ACCACAATGCTGACCAGATCCAAGT
Thioredoxin peroxidase (TPX) Smp_158110	101		CAAAGGCCTTGTACAACCAACTCGT	CGTTTCGCCACACATCGCCG
Superoxide dismutase (SOD) Smp_176200.2	100	000615	AGTGGACTCAAGGCTG	GCATTACCAGTTACTTTGCT

Gene names are given according to the SchistoDB accession numbers (http://schistodb.net/schistodb20/). Their respective scaffolds are included in the table. Smp_163610 primer sequences are given according to the mRNA sequence of the gene (XM_002582157.1) due to inconsistency in the genome assembly. α-tubulin and 28S primers sequences were previously published (Bahia et al., 2006; Roger et al., 2008a).

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

2.8.2. ROS quantification by fluorescent-lifetime measurement of single cells

The fluorescent decay of single living cells loaded with PBA was recorded using time-resolved microfluorimetry, as previously described (Ribou et al., 2003). Briefly, a laser (nitrogen laser NL100; Stanford Research Systems, USA) delivered monochromatic 337-nm pulses, each with a half-amplitude pulse-width of 3 ns, and an objective (40×; Unitron) was used to concentrate the excitation beam on the microscopic sample. Emitted photons were collected and focused on a photomultiplier 1P28 (Hamamatsu Corporation, Japan). A diaphragm placed on the emission pathway allowed the selection of signals from single cells, while a 404-nm bandpass filter (half bandwidth; 40 nm) also located along the emission pathway was used to select the pyrene emission. Each signal was digitalized by a digital oscilloscope (TDS 3032C; Tektronix, USA). The fluorescent decay of single PBA-loaded cells selected by the 404-nm filter could be resolved into three exponential curves. The time constants (i.e. lifetimes) and amplitude values of each exponential curve in the decay were obtained using the downhill simplex method (Nelder and Mead, 1965). The first two decays corresponded to the intrinsic fluorescence of the cell attributed to the reduced form of NAD(P)H. The third long-time constant (>100 ns), which was characteristic of pyrene derivatives, was related to the ROS concentration through the Stern–Volmer equation (Stern and Volmer, 1919) that describes collisional fluorescent quenching of a probe (i.e. PBA) by a quencher (i.e. free radicals). The method has been described in several papers (Ribou et al., 2003, 2004; Rharass et al., 2006). We calculated the variation of intracellular ROS concentrations as follows:

$$[\mathrm{ROS}]/[\mathrm{ROS}]_{\mathrm{m}} = [t_{\mathrm{m}}(t_0 - t)]/[t(t_0 - t_{\mathrm{m}})] \quad (1)$$

where t is the fluorescent lifetime measured for 108 single haemocytes originating from eight *Bg*BRE snails and 111 cells from eight *Bg*GUA snails; t_{m} is the mean of all lifetimes; and t_0 is the fluorescent lifetime in the absence of ROS (measured from dead haemocytes fixed with Baker solution). In this equation, $[\mathrm{ROS}]_{\mathrm{m}}$ is the mean of the concentrations from all tested cells (219 cells). We assumed that fixation ended all cellular activity and ROS production. In the presented data, the mean ROS concentration has been assigned an arbitrary value of one.

2.9. H_2O_2 production and release by B. glabrata haemocytes

The H_2O_2 production by haemocytes was measured using Amplex® Red (Invitrogen). Haemolymph was collected from the head-foot regions of *Bg*BRE and *Bg*GUA snails (7–11 mm in diameter) as previously described (Bouchut et al., 2006), and the number of haemocytes per µl of haemolymph was quantified using a cell counter (Z Series Coulter Counter; Beckman Coulter); 226.2 ± 50.6 and 241.2 ± 102.1 cells/µl were obtained for *Bg*BRE and *Bg*GUA, respectively. The haemolymph of four snails was pooled and 45,000 haemocytes per well were dispensed to a 96-well plate for each strain. The haemocytes were allowed to adhere and spread for 1 h at 26 °C. The plate was then centrifuged (600*g* for 10 min), the plasma was removed, the adhered haemocytes were washed three times with HBSS, and the wells were treated with Amplex® Red reaction mixture (100 µl per well, prepared according to the manufacturer's instructions). Optical density was measured with a microplate reader at 570 nm during the following 1 h (at 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 min). The results are expressed as Amplex Red O.D. at 570 nm/45,000 cells.

2.10. Biomphalaria glabrata superoxide anion plasma content

The plasma content of superoxide anion was monitored via the superoxide-mediated reduction of nitroblue tetrazolium (NBT), which results in the precipitation of an insoluble blue formazan that can be quantified spectrophotometrically. Briefly, haemolymph was collected from *Bg*BRE and *Bg*GUA snails as described above. Haemocytes were removed by centrifugation (1500*g* for 15 min), and then 50 µl of plasma from each snail was mixed with 50 µl of 0.1% NBT (Sigma) dissolved in PBS; (Na_2HPO_4 8.41 mM, NaH_2PO_4 1.65 mM, NaCl 45.34 mM, pH 7.45). Formazan blue formation was measured with a microplate reader at 620 nm over the course of 3 h (at 5, 10, 15, 30, 60, 90, 180 min). NBT-free plasma was used as a control, and triplicate experiments were conducted for 10 individuals per strain.

2.11. Statistical analyses

The normality of our experimental data was assessed using the Shapiro–Wilk normality test (Shapiro and Wilk, 1965). Our data on the effect of H_2O_2 cytotoxicity on *S. mansoni* sporocysts (LDH test), *B. glabrata* hemocyte H_2O_2 production, and superoxide anion plasma content were all found to be normally distributed ($P > 0.05$), and were subsequently analysed using the student's *t*-test. Our data on the effect of H_2O_2 on *S. mansoni* sporocyst mortality and the total antioxidant capacity of sporocysts were not normally distributed ($P < 0.05$), and were subsequently analysed using the Mann–Whitney test. The results of the ROS concentration assays in each mollusc strain were analysed using the Mann–Whitney test. The Kolmogorov–Smirnov two-samples test was utilised to determine whether the ROS concentrations were similarly distributed in haemocytes from *Bg*BRE and *Bg*GUA.

3. Results

3.1. Effect of H_2O_2 on S. mansoni sporocysts

Two different assays were conducted to test the effect of H_2O_2 on the two strains of *S. mansoni* sporocysts (*Sm*BRE and *Sm*GH2) (Fig. 1). First, an LDH test was used to examine the cytotoxicity of H_2O_2 on sporocysts of each strain. Our results revealed that the susceptibility to H_2O_2 was significantly higher for SmGH2 than *Sm*BRE (Fig. 1A). When exposed to 200 µM H_2O_2, *Sm*GH2 sporocysts showed 25.8% cytotoxicity (i.e. 25.8% of the cells had lysed and released their LDH content), whereas no changes were observed for *Sm*BRE at the same H_2O_2 concentration (Fig. 1A). However, although cell lysis occurred in *Sm*GH2, the sporocysts were still alive at this concentration. To investigate possible between-strain differences in mortality, we next exposed sporocytes to increasing concentrations of H_2O_2 and examined motility and the beating of the flame-cell flagella, which were taken as distinguishing between living and dead larvae. No difference between the two strains was observed until the concentration of H_2O_2 reached 1600 µM (Fig. 1B). At this concentration, 31.2% and 2.6% of the *Sm*GH2 and *Sm*BRE sporocysts were dead, respectively; this difference is statistically significant (student's *t*-test; $P = 0.017$). These results suggest that *Sm*GH2 sporocysts are more susceptible to H_2O_2 than *Sm*BRE sporocysts.

3.2. The total antioxidant capacity of S. mansoni sporocysts

To investigate potential differences in the constitutive antioxidant abilities of sporocysts from *Sm*BRE and *Sm*GH2, we measured the cumulative antioxidant activities of these two strains (Fig. 2). Our results revealed that the antioxidant ability of *Sm*GH2 was significantly lower than that of *Sm*BRE (approximately 13% less; Mann–Whitney test, $P = 0.0001$).

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

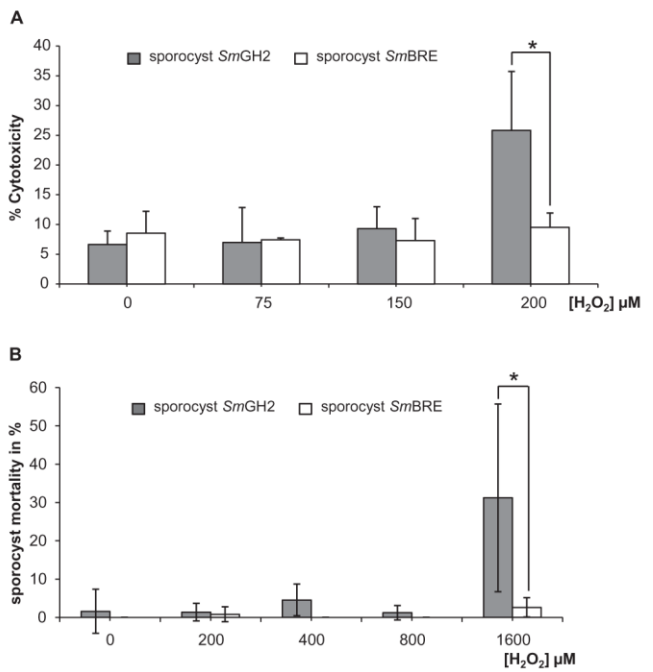


Fig. 1. Effect of hydrogen peroxide (H_2O_2) on *Schistosoma mansoni* sporocysts. (A) Cytotoxicity amongst *S. mansoni* sporocysts 2 h after exposure to different H_2O_2 concentrations. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) in the cytotoxic effect of H_2O_2 on *S. mansoni* Guadeloupean strain (*Sm*GH2) versus *S. mansoni* Brazilian strain (*Sm*BRE) sporocysts. (B) Percent sporocyst mortality after 4 h exposure to different H_2O_2 concentrations. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) in the mortality rates of *Sm*GH2 versus *Sm*BRE sporocysts.

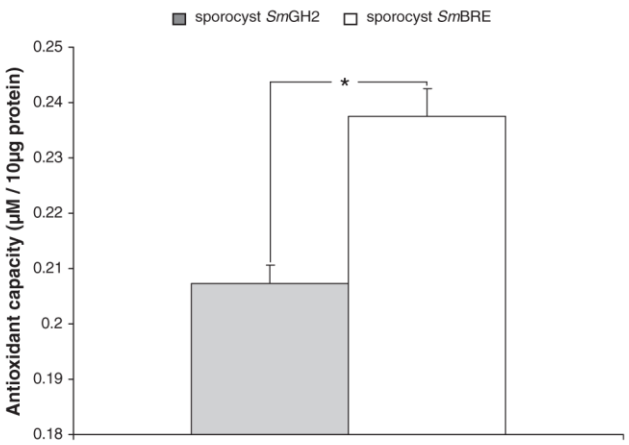


Fig. 2. Constitutive total antioxidant capacities of *Schistosoma mansoni* Guadeloupean strain (*Sm*GH2) and *S. mansoni* Brazilian strain (*Sm*BRE) sporocysts. Values are expressed as µM of antioxidant activity per 10 µg of sporocyst proteins. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

3.3. qRT-PCR of ROS-scavenger expression amongst S. mansoni strains

qRT-PCR was used to compare the expression of parasite antioxidant enzymes suspected to play key roles in the detoxification of host-induced oxidative stress (Table 1) (Guillou et al., 2007). Notably, Cu-Zn SOD (Smp_176200.2) was found to be expressed at a significantly higher level in *Sm*BRE than in *Sm*GH2 (2.7-fold; $P = 0.017$) (Fig. 3). In contrast, no difference was observed in the expression levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Smp_056970.1), GST omega (Smp_152710.1), GST 28 kD (Smp_054160), GST 26 kD (Smp_163610), glyoxalase II (Smp_091010) or thioredoxin peroxidase (TPX, Smp_158110) (data not shown).

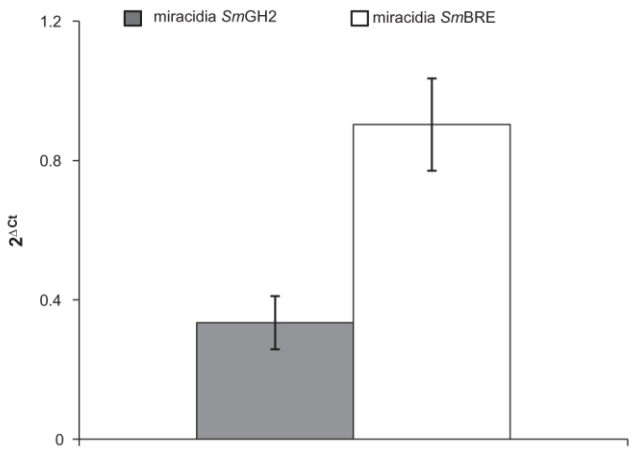


Fig. 3. Ratios of Zn–Cu superoxide dismutase (Zn–Cu SOD, Smp_176200.2) transcript levels in the two strains of *Schistosoma mansoni* miracidia (Guadeloupean strain, *Sm*GH2 and Brazilian strain, *Sm*BRE). Ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relative to the expression levels of 28 s rRNA and α-tubulin. The histogram represents the average values of duplicates ± S.D. The expression ratio was calculated according to the formula: $R = 2(\Delta Ct)$, where ΔCt represents Ct (target gene) – Ct (constitutively expressed gene).

3.4. Intracellular ROS measurements in single B. glabrata haemocytes

We monitored intracellular ROS levels in single haemocytes, using PBA. This method allows global ROS to be measured without interference from the reactive hydroxyl radical or H_2O_2. PBA fluorescent lifetimes were measured for 108 and 111 individual haemocytes originating from eight *Bg*BRE and eight *Bg*GUA snails, respectively. *Bg*BRE haemocytes produced significantly (11.2%) more ROS than *Bg*GUA haemocytes (Mann–Whitney test; $P = 0.009$) (Fig. 4A). Fig. 4B shows the distribution of haemocytes from both strains according to their ROS concentrations, which were calculated from the ratio given in Eq. (1) (see Section 2.8.2). Although the cells from both *Bg*BRE and *Bg*GUA samples were distributed around the mean ROS concentration, their distributions were significantly different (Kolmogorov–Smirnov test, $P = 0.012$). Amongst the haemocytes producing more than 1.5-fold of the mean ROS concentration, 68.8% were from *Bg*BRE strain, while only 31.2% were from *Bg*GUA. Conversely, amongst the haemocytes that showed the lowest ROS concentrations (<0.7-fold of the mean ROS concentration) 38.1% were from *Bg*BRE and 62% were from *Bg*GUA (Fig. 4B). By recording the fluorescent lifetimes of single cells loaded with PBA, we also obtained the relative concentrations of free and bound NAD(P)H (an indicator of metabolic change) in each cell. However there was no significant difference in the quantity of bound and free NAD(P)H (mean ratio = 0.60 for both strains; data not shown), suggesting that the strains had similar levels of metabolism. Thus, the only molecular difference observed between the two strains was the level of ROS production.

3.5. H_2O_2 production and release by B. glabrata haemocytes

We assessed H_2O_2 production and secretion by haemocytes of both strains using Amplex Red. Fig. 5 shows the cumulative amount of H_2O_2 constitutively released by haemocytes of each strain over 1 h. The maximum level of H_2O_2 production was reached at 20 min for *Bg*GUA and at 40 min for *Bg*BRE after addition of Amplex Red substrate. In total, *Bg*BRE haemocytes produced

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

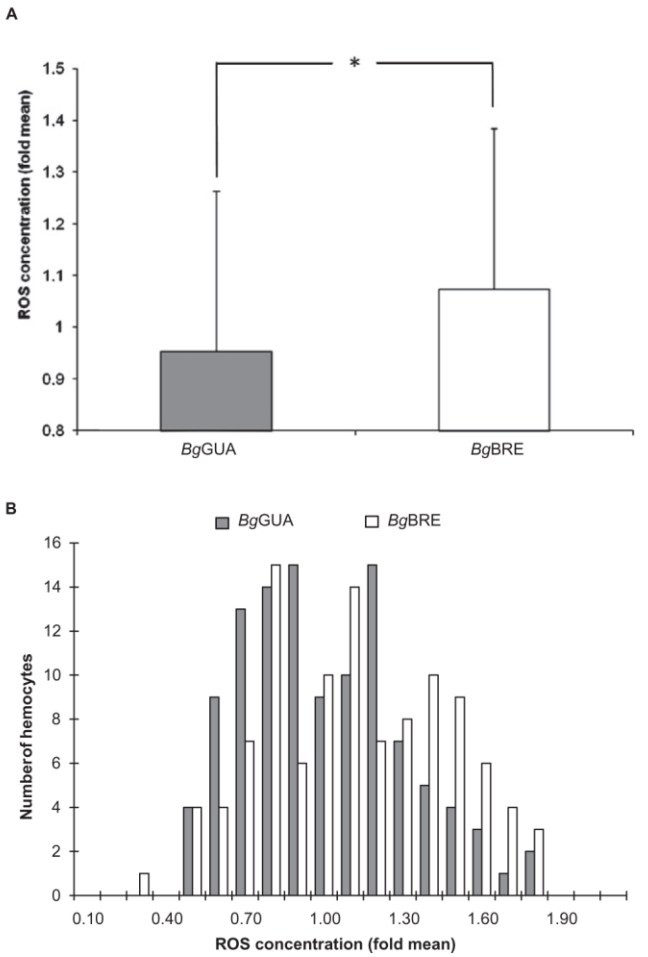


Fig. 4. Intracellular reactive oxygen species (ROS) measurements in single *Biomphalaria glabrata* haemocytes. (A) Global ROS concentration in each snail strain. The histogram represents the ROS concentrations in arbitrary units (-fold mean) for the *B. glabrata* Guadeloupean strain, *Bg*GUA and Brazilian strain, *Bg*BRE. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) in ROS production by haemocytes of the two snail strains. (B) ROS concentrations in hemocyte populations from *Bg*GUA and *Bg*BRE snails. The histograms represent the fluorescent lifetimes of 1-pyrenebutyric acid (PBA)-loaded haemocytes from eight each of *Bg*GUA and *Bg*BRE; 108 single haemocytes from eight *Bg*BRE and 111 haemocytes from eight individuals of *Bg*GUA snails were assessed. The *x* axis represents the fluorescent lifetime in nanoseconds, while the *y* axis corresponds to the number of cells.

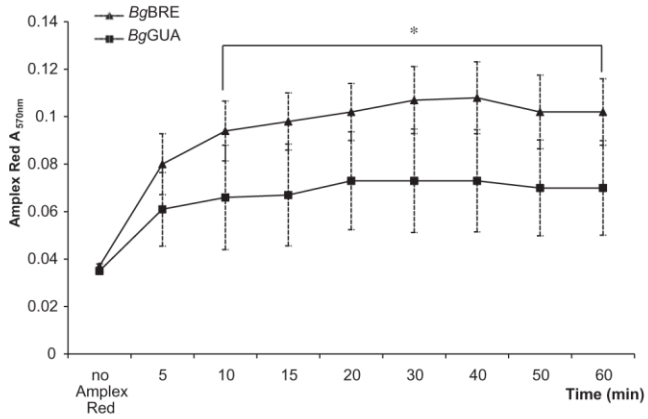


Fig. 5. Hydrogen peroxide (H_2O_2) production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes. Cumulative production of H_2O_2 was measured using Amplex Red. The data are presented as the mean (±S.D.) of Amplex Red absorbance at 570 nm ($A_{570\ nm}$) per 45,000 cells over five replicates. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) in H_2O_2 production from haemocytes of *B. glabrata* Guadeloupean strain, *Bg*GUA, versus Brazilian strain, *Bg*BRE.

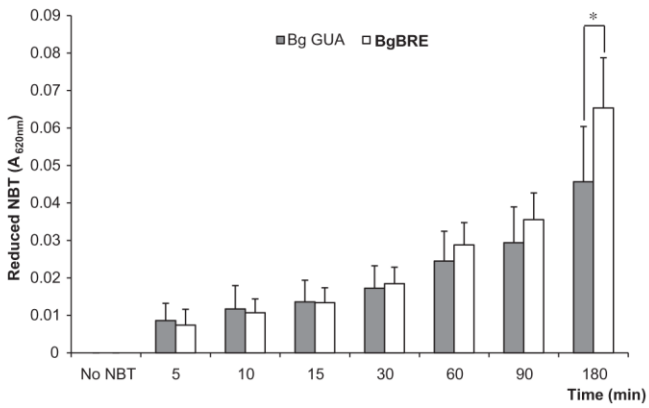


Fig. 6. Constitutive superoxide anion plasma content in *Biomphalaria glabrata* Guadeloupean strain, *Bg*GUA, versus Brazilian strain, *Bg*BRE. The superoxide anion plasma content was assessed by spectrophotometric measurement (620 nm) of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. At 3 h after initiation of the reaction, the BgBRE plasma contained significantly more superoxide anion than that from *Bg*GUA (the asterisk indicates a significant difference; $P < 0.05$).

significantly more (1.44-fold; mean value) H_2O_2 than *Bg*GUA haemocytes (student's *t*-test; $P < 0.05$) (Fig. 5).

3.6. Biomphalaria glabrata superoxide anion plasma content

To our knowledge, all spectrophotometric methods currently available for the determination of H_2O_2 are based on the measurement of red or orange pigments, making these methods unsuitable for use on *B. glabrata* plasma samples, which are already tinted red by haemoglobin. Consequently, we used NBT to measure the amount of superoxide anion (O_2^-; a precursor of H_2O_2) produced in both strains. As shown in Fig. 6, at 3 h after addition of NBT *Bg*BRE plasma contained significantly more (44% more) superoxide anion than *Bg*GUA plasma (student's *t*-test; $P = 0.0007$).

3.7. Compatibility of sympatric and allopatric S. mansoni/B. glabrata combinations

Sympatric pairings of *S. mansoni* and *B. glabrata* originating from Brazil and Guadeloupe were previously shown to display different levels of compatibility that remained remarkably stable across laboratory generations (Théron et al., 2008). We first used dose–response curves obtained by challenging snails with increasing doses of miracidia to confirm that similar differences could be observed between our strains. At doses of 10 or more miracidia/snail, *Sm*BRE/*Bg*BRE showed an infection rate of 100%, while *Sm*GH2/*Bg*GUA had an infection rate of approximately half that, at around 55%. Interestingly, differences were also observed for the number of parasites (SpI) that develop within the snails. The infection intensity rose gradually as the challenge doses increased for *Sm*BRE/*Bg*BRE, reaching 16.18 ± 0.86 parasites/snail at the 50-miracidia dose. In contrast, the infection intensity for *Sm*GH2/*Bg*GUA remained low regardless of the challenge dose, varying between 1.6 ± 0.20 and 3.2 ± 0.64 parasites/snail (Fig. 7).

When we tested the heterologous combinations, we found that the *Sm*BRE/*Bg*GUA pairing showed a substantial level of compatibility, with infection rates of 80–90% (not significantly different from the 100% achieved by the *Sm*BRE/*Bg*BRE pairing), but with lower parasite intensities (9.8 ± 0.89 for the 50-miracidia dose) compared with the sympatric combination (16.18 ± 0.86

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

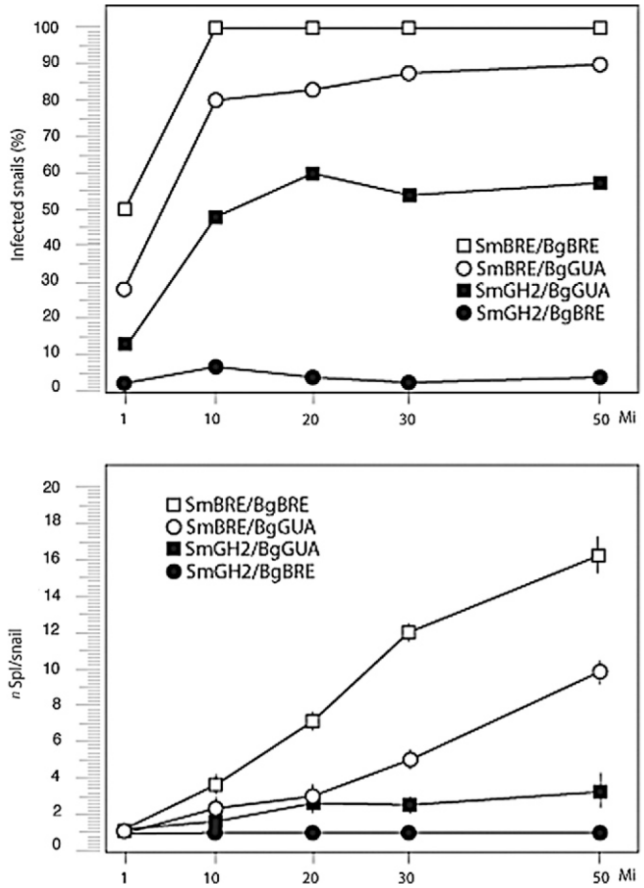


Fig. 7. Infection rates and intensities in sympatric and allopatric *Schistosoma mansoni/B. glabrata* combinations. The percentage of snails infected and the intensity of infection: number of mother sporocysts (Spl) developed (*n* Spl) was measured after individual snails were challenged with different miracidial doses (1, 10, 20, 30 or 50 miracidia (Mi)).

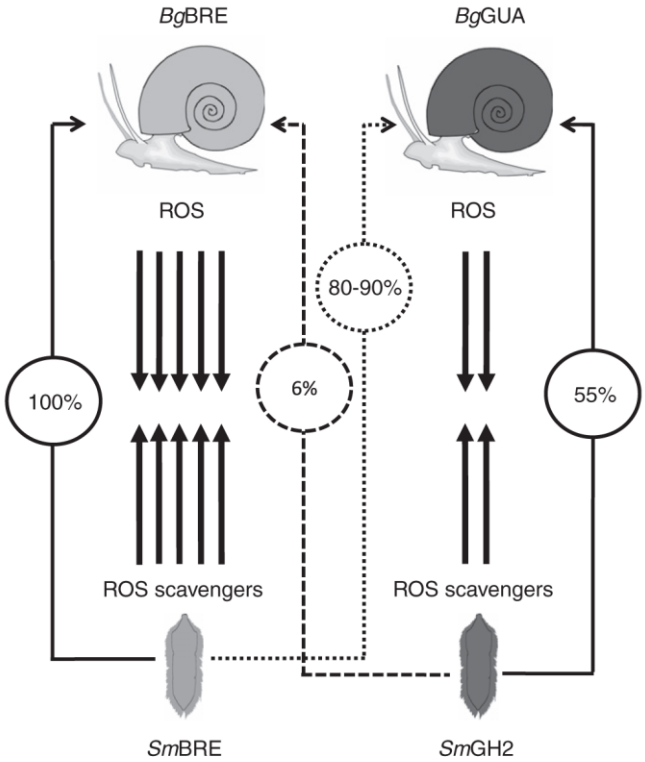


Fig. 8. Schematic representation of our reactive oxygen species (ROS)-based co-evolutionary hypothesis. The percentage of prevalence is indicated for each *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni* combination. The number of arrows represents the differential host oxidant (ROS) or parasite antioxidant (ROS scavenger) capabilities. *B. glabrata* Brazilian strain, *Bg*BRE, and Guadeloupean strain, *Bg*GUA; *S. mansoni* Brazilian strain, *Sm*BRE, and Guadeloupean strain, *Sm*GH2.

parasites/snail at the 50-miracidia dose). In contrast, the *Sm*GH2/*Bg*BRE combination showed very little infectivity, with infection rates <6% and ~1 parasite/snail regardless of the challenge dose (Fig. 7).

3.8. ROS, ROS scavengers and compatibility in sympatric and allopatric S. mansoni/B. glabrata combinations

The above-described results indicated that levels of ROS and ROS scavengers were correlated in both sympatric combinations, with high-level ROS/ROS scavenger production in the Brazilian combination, but lower-level ROS/ROS scavenger production in the Guadeloupean combination. If high levels of *S. mansoni* ROS scavenger are correlated with better resistance of the intramolluscan stage of the parasite (as we hypothesised), we would expect *Sm*GH2 to have a relatively low ability to infect the allopatric *Bg*BRE snails, while *Sm*BRE would have a high ability to infect the allopatric *Bg*GUA snails. This hypothesis was verified in our model, as shown in Fig. 8.

4. Discussion

Snail-schistosome compatibility and infection rates result from a complex interplay between the host's defence mechanisms and the parasite's infectivity strategies. Due to selective pressures exerted by the parasite on the host and vice versa, co-evolutionary dynamics may be observed (Janzen, 1980; Howard, 1991). Between-population or between-strain differences in the outcomes of such evolutionary processes may be expected due to differences in the epidemiological and environmental conditions, and/or genetic architectures. Such differential selection patterns could explain, at least in part, the geographical and/or strain-specific compatibility variations seen in snail-schistosome interactions (Théron et al., 2008). At present, however, there is relatively little empirical evidence demonstrating reciprocal molecular adaptations in both host and parasite.

Here, we investigated the interaction between *S. mansoni* and the snail, *B. glabrata*, as this interaction is a popular model for the study of co-evolutionary dynamics (Beltran and Boissier, 2008; Beltran et al., 2008; Bouchut et al., 2008; Roger et al., 2008a, 2008b, 2008c; Steinauer, 2009). We confirmed that there are different levels of compatibility between two geographical strains of *S. mansoni* and their sympatric snail hosts, *B. glabrata* (Fig. 7) that both have co-evolved independently. We compared the host oxidant and parasite antioxidant abilities that appear to form the core of the attack/defence interactions of these two pairings.

ROS are the main effectors of the snail immune system; they are highly reactive and can trigger irreversible cell damage. Indeed, ROS produced by the haemocytes of *B. glabrata* are known to play a crucial role in the killing of *S. mansoni* (Hahn et al., 2000, 2001a, 2001b; Bender et al., 2005; Bayne, 2009). Conversely, *S. mansoni* possess antioxidant systems capable of counteracting the ROS produced by their host's immune system. *Schistosoma mansoni* is exposed to ROS in both their intermediate (snail) and definitive (human or mammalian) hosts, and produce oxidative-stress

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

scavengers in their excretory-secretory products (ESP) during all stages of their life cycle (Mei and LoVerde, 1997; Curwen et al., 2004; Zelck and Von Janowsky, 2004; Knudsen et al., 2005; van Balkom et al., 2005; Bernal et al., 2006; Dzik, 2006; Perez-Sanchez et al., 2006; Cass et al., 2007; Guillou et al., 2007; Mourao et al., 2009a; Wu et al., 2009). Therefore, the success or failure of host invasion by *S. mansoni* depends at least in part on its ability to defend itself against oxidative damage (Mourao et al., 2009a). In this system, therefore, ROS and ROS scavengers should be involved in a co-evolutionary arms race, and we would expect their respective production levels in sympatric host/parasite combinations to be closely related.

As previous studies have established that H_2O_2 is the main ROS involved in killing *S. mansoni* sporocysts, probably due to its stability and capacity to cross cell membranes (Hahn et al., 2001a; Bienert et al., 2006), we studied the susceptibility of two strains of *S. mansoni* to H_2O_2. Our results showed a clear intrinsic difference between parasites isolated from two different geographical regions: the intramolluscan stages of Guadeloupean *S. mansoni* (*Sm*GH2) were more sensitive to H_2O_2 than those of the Brazilian strain (*Sm*BRE) (Fig. 1). Moreover, we observed a difference in antioxidant potential between strains, with *Sm*GH2 displaying a lower level of antioxidant activity than *Sm*BRE (Fig. 2). Thus, *Sm*BRE has a more efficient antioxidant system, which would seem to explain its higher level of resistance to H_2O_2-mediated oxidative damage.

In order to identify the molecular pathways involved in these differential antioxidant properties, we investigated the strain-specific transcription levels of genes encoding various antioxidant enzymes, including GAPDH (Smp_056970.1), GST omega (Smp_152710.1), GST28 (Smp_054160), GST26 (Smp_163610), glyoxalase II (Smp_091010), thioredoxin peroxidase, and Cu-Zn SOD (Smp_176200.2) (Guillou et al., 2007; Vermeire and Yoshino, 2007; Roger et al., 2008c; Mourao et al., 2009a; Wu et al., 2009). Amongst these candidates, only the Cu-Zn SOD mRNA displayed differential expression, with expression levels that were 2.7-fold higher in *Sm*BRE than in *Sm*GH2 (Fig. 3). This finding is consistent with our protein-level results from a previous proteomic study (Roger et al., 2008c), and these observations collectively suggest that Cu-Zn SOD plays a key role in the antioxidant strategy of *S. mansoni*. The involvement of Cu-Zn SOD in ROS detoxification is a recurring and intriguing question, because it is capable of dismutating the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) to produce H_2O_2 (Zelck and Von Janowsky, 2004; Guillou et al., 2007; Mourao et al., 2009a). The hypothesis currently used to explain the role of *S. mansoni* Cu-Zn SOD in ROS detoxification is based on a suspected peroxidative function (Yim et al., 1993, 1996; Kim and Kang, 1997; Bayne et al., 2001). In short, it has been proposed that *S. mansoni* Cu-Zn SOD could use its own dismutation product (H_2O_2) to produce hydroxyl radicals (HO**.**) that are less toxic for sporocysts (Bayne et al., 2001).

In a co-evolutionary context, the between-strain differences in ROS susceptibility and antioxidant activity of these *S. mansoni* strains suggest that there could be comparable differences in the ROS production capabilities of the host snail strains. To test this hypothesis, we investigated ROS production by the two snail strains. First, we used a fluorescence-based method (Rharass et al., 2006) to investigate the hemocyte production of free-radicals such as nitric oxide and superoxide anion. This approach revealed that *Bg*BRE snails produced more free radicals than *Bg*GUA snails (Fig. 4A). Moreover, a distribution analysis of free-radical concentrations in single haemocytes showed that the cells producing higher concentrations of ROS came from *Bg*BRE individuals, while those producing lower levels of free radicals were from *Bg*GUA snails (Fig. 4B).

However, although our results revealed that global ROS production differed between BgBRE and BgGUA, oxidants can differ in their reactivity and efficient parasite killing requires that the host produce the right oxidant (Bayne et al., 2001). As previous studies have demonstrated the crucial role of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the killing of *S. mansoni* sporocysts (Hahn et al., 2001a; Goodall et al., 2004; Bender et al., 2005, 2007), we investigated potential differences in hemocyte H_2O_2 production between the snail strains. Our results showed that haemocytes from *Bg*BRE constitutively produced more H_2O_2 than those from *Bg*GUA (Fig. 5). We then examined the H_2O_2 content of plasma from these snails. As technical restrictions make it impossible to directly measure H_2O_2 in plasma, we measured the superoxide anion, which is a precursor of H_2O_2 (Selkirk et al., 1998). Our results confirmed that *Bg*BRE plasma contained significantly more superoxide anion than *Bg*GUA plasma (Fig. 6). All of these data were obtained from haemocytes harvested from uninfected snails and without cell stimulation. Notably, no difference in ROS production was observed when these haemocytes were stimulated by the addition of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) to culture medium (data not shown).

Taken together, our data show that: (i) the production of ROS in general and H_2O_2 (the main ROS acting against *S. mansoni* sporocysts) in particular differ between the two snail strains; and (ii) this H_2O_2 production seems to be correlated with the level of ROS scavengers produced by sympatric parasites. *Bg*BRE snails produce higher amounts of H_2O_2 and interact naturally with *Sm*BRE, which have better resistance against oxidative stress, while *Bg*GUA snails produce less H_2O_2 and are sympatric with *Sm*GH2, which is more susceptible to ROS. If our hypothesis is accurate, therefore, we would expect our cross-infection experiments to reveal differences: (i) in the infective potential of our two *S. mansoni* strains; and (ii) in the resistance potential of our two *B. glabrata* strains.

Indeed, the results of the infection and cross-infection experiments showed significant differences in the infection rates and intensities (Fig. 7). The factors and mechanisms underlying these differences are not yet known, but may include historical epidemiological conditions, differential selective pressures in the transmission areas, genotypic diversities in the host and parasitic isolates, recognition mechanisms developed through the matching-phenotypes model, and intraspecific competition amongst sporocysts (for details, see Théron et al., 1997, 2008; Théron and Coustau, 2005; Bech et al., 2010). Notably, the host-parasite combination characterised by the higher infection rates and parasite intensities (*Sm*BRE/*Bg*BRE) was also characterised by a higher ROS-production capacity by the host and a higher ROS-scavenging ability by the parasite. In contrast, the host-parasite combination with lower infection rates and parasite intensities (*Sm*GH2/*Bg*GUA) showed lower ROS production by the host and lower ROS scavenging by the parasite (Fig. 8). These observations argue for the presence of reciprocal adaptation between the ROS and ROS scavenger traits. This was further supported by the results from our allopatric cross-infections. The *Sm*GH2 strain, which had co-evolved with its sympatric snail (*Bg*GUA) to produce lower levels of ROS, could not effectively infect high-ROS-producing *Bg*BRE snails (Figs. 7 and 8). Conversely, the *Sm*BRE strain, which had co-evolved with a host that produced more ROS (*Bg*BRE), could easily infect low-ROS-producing *Bg*GUA snails (Figs. 7 and 8). Interestingly, however, the infection success of *Sm*BRE was lower for the allopatric combination than the sympatric pairing (Figs. 7 and 8), suggesting that the oxidative factors probably act in combination with other factors to determine the outcome of the *B. glabrata*/*S. mansoni* interaction.

Within hosts, immune effectors exert the main selective pressure on parasites (Loker and Adema, 1995; Damian, 1997). However, another factor that helps to define the interaction is the efficiency of parasite recognition by snail immune receptors, and the ability of the parasite to escape this recognition. We previously discovered a group of polymorphic antigens of *S. mansoni* (the *S.*

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

mansoni polymorphic mucins, *Sm*PoMucs) (Roger et al., 2008a, 2008b, 2008c), and recently showed that these antigens are recognised by diversified *B. glabrata* immune receptors (the fibrinogen-related proteins, FREPs) (Moné et al., 2010a). These reports on the molecular interactions underlying snail-schistosome compatibility suggest that co-evolutionary (reciprocal adaptation) processes probably occur through a combination of changes in general resistance (ROS/ROS scavengers) and more specific interactions (FREPs/*Sm*PoMucs). In non-specific resistance/infectivity interactions involving density-dependant forces (e.g., the number of developing parasites within the host), co-evolution leads to global increases in the amount of attack/defence products, such as the interplay of ROS and ROS scavengers described herein. In highly specific genotype-by-genotype interactions, such as recognition/evasion processes, however, co-evolution leads to increases in the diversification and/or polymorphisms amongst specific molecules, as observed for FREPs and *Sm*PoMucs.

Even if the success of infection is not exclusively based on the levels of ROS and ROS scavengers, our model of dynamic co-evolution predicts that a change in parasite virulence or host resistance would be associated with life history trade-offs (reallocation of resources), with increased production of a molecule under co-evolutionary pressure yielding indirect negative consequences for other functions (development, growth, fecundity, reproductive rate, etc.) (Green et al., 2000; Lohse et al., 2006; Forde et al., 2008). Indeed, this kind of trade-off has been observed in our model, as a previous study showed that cumulative cercarial production was twofold higher for the *Sm*GH2/*Bg*GUA combination than for the *Sm*BRE/*Bg*BRE (Théron et al., 1997). This could indicate that *Sm*BRE has made a tradeoff by investing in the production of ROS scavengers at the expense of producing cercariae.

In summary, host-parasite interactions are dynamic biological systems in which the host's defence mechanisms face the parasite's infectivity mechanisms, leading to a co-evolutionary arms race (Combes, 2000; Howard and Jack, 2007).

Developing correlation approaches to studying co-evolution have some limitations. Indeed the correlations between traits of interacting species cannot always provide unequivocal evidence for co-evolution. Reciprocity could also occur and an absence of correlated traits is not evidence for an absence of co-evolution (Nuismer et al., 2007, 2010; Yoder and Nuismer, 2010). Non-co-evolutionary mechanisms could explain correlations between the traits of interacting species. For example, the correlation could result from a colonisation process in which a parasite species with new potential arrived in a new environment and is more well-adapted to the sympatric interacting species. In other interaction models correlated traits could evolve if the abiotic or biotic environments favour similar traits in both of the interacting species. For example, a biotic selection that affects only one of the interacting species can itself cause trait matching. This can occur if interactions have potent fitness consequences for only one of the species or if the outcome of interactions depends on the phenotype of only one of the species. These one-way interactions can generate correlations that are indistinguishable from those that evolve due to co-evolutionary processes (Nuismer et al., 2007, 2010; Yoder and Nuismer, 2010). In our model of interest *B. glabrata* could be infected by a lot of pathogens species (other than *S. mansoni*) that represent a selective pressure that could enhance snail ROS production. In this context, schistosomes for which the specificity for the intermediate snail host is very high will still succeed in infecting the snails, only if they are able to circumvent ROS by increasing their ROS scavenger production.

However, Nuismer et al. (2007, 2010) state that correlation could occur if interactions are mediated by a mechanism of phenotype matching such as that which takes place for host-parasite interactions. This phenotype matching process was proposed for our *S. mansoni*/*B. glabrata* model of interest (Théron and Coustau, 2005).

Therefore whatever are the mechanisms involved in the apparition of trait correlation between two interacting species, our present results reveal the existence of phenotypic matching between host and parasitic strains in terms of their attack (ROS production) and defence (ROS scavenging) traits. To our knowledge, this work provides the first example of a clear link between the level of oxidant and antioxidant molecules possibly resulting from sympatric co-evolution, and provides supporting evidence for a field illustration of the Red Queen Hypothesis (Van Valen, 1974) and its predictions of a functional trait in a metazoan host/parasite model. Detailed mechanistic studies will be conducted in multiple populations to fully confirm the link between correlated traits and the Red Queen context.

Acknowledgments

We thank Bernard Dejean and Anne Rognon for technical assistance; Dr. Carole Blanchard for advice on measuring ROS levels in plasma; and Julien Portela for helping with the ROS titration experiments. The work received funding from the Schistophepigen (ANR-07-BLAN-0119-02) and BiomGenIm (ANR-07-BLAN-0214-03) programs of the French National Agency for Research, Centre National de la Recherche Scientifique, and Université de Perpignan Via Domitia. The funders had no role in the study design, data collection, data analysis, the decision to publish or manuscript preparation.

References

Bahia, D., Avelar, L., Mortara, R.A., Khayath, N., Yan, Y., Noel, C., Capron, M., Dissous, C., Pierce, R.J., Oliveira, G., 2006. SmPKC1, a new protein kinase C identified in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 345, 1138–1148.

Bayne, C.J., 2009. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. Mol. Biochem. Parasitol. 165, 8–18.

Bayne, C.J., Hahn, U.K., Bender, R.C., 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. Parasitology 123 (Suppl), S159–167.

Bech, N., Beltran, S., Portela, J., Rognon, A., Allienne, J.F., Boissier, J., Theron, A., 2010. Follow-up of the genetic diversity and snail infectivity of a *Schistosoma mansoni* strain from field to laboratory. Infect. Genet. Evol. 10, 1039–1045.

Beltran, S., Boissier, J., 2008. Schistosome monogamy: who, how, and why? Trends Parasitol. 24, 386–391.

Beltran, S., Cezilly, F., Boissier, J., 2008. Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. PLoS ONE 3, e3328.

Bender, R.C., Broderick, E.J., Goodall, C.P., Bayne, C.J., 2005. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H2O2 than susceptible snails. J. Parasitol. 91, 275–279.

Bender, R.C., Goodall, C.P., Blouin, M.S., Bayne, C.J., 2007. Variation in expression of *Biomphalaria glabrata* SOD1: a potential controlling factor in susceptibility/resistance to *Schistosoma mansoni*. Dev. Comp. Immunol. 31, 874–878.

Bernal, D., Carpena, I., Espert, A.M., De la Rubia, J.E., Esteban, J.G., Toledo, R., Marcilla, A., 2006. Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infections. Proteomics 6, 2835–2843.

Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochim. Biophys. Acta 1758, 994–1003.

Bouchut, A., Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Coustau, C., Mitta, G., 2008. The compatibility polymorphism in invertebrate host/trematodes interactions: research of molecular determinants. Parasite 15, 304–309.

Bouchut, A., Sautiere, P.E., Coustau, C., Mitta, G., 2006. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* model: potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. Acta Trop. 98, 234–246.

Cass, C.L., Johnson, J.R., Califf, L.L., Xu, T., Hernandez, H.J., Stadecker, M.J., Yates 3rd, J.R., Williams, D.L., 2007. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. Mol. Biochem. Parasitol. 155, 84–93.

Chernin, E., 1963. Observations on hearts explanted in vitro from the snail Australorbis glabratus. The Journal of parasitology 49, 353–364.

Combes, C., 2000. Selective pressure in host-parasite systems. J. Soc. Biol. 194, 19–23.

Curwen, R.S., Ashton, P.D., Johnston, D.A., Wilson, R.A., 2004. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. Mol. Biochem. Parasitol. 138, 57–66.

Damian, R.T., 1997. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. Parasitology 115 (Suppl.), S169–S175.
de Jong-Brink, M., Bergamin-Sassen, M., Solis Soto, M., 2001. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. Parasitology 123 (Suppl.), S129–S141.
Dybdahl, M.F., Storfer, A., 2003. Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. Trends ecol. evol. 18, 523–530.
Dzik, J.M., 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. Acta Biochim. Pol. 53, 33–64.
Forde, S.E., Thompson, J.N., Bohannan, B.J., 2004. Adaptation varies through space and time in a coevolving host-parasitoid interaction. Nature 431, 841–844.
Forde, S.E., Thompson, J.N., Holt, R.D., Bohannan, B.J., 2008. Coevolution drives temporal changes in fitness and diversity across environments in a bacteria–bacteriophage interaction. Evolution 62, 1830–1839.
Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., de Jong, B.C., Narayanan, S., Nicol, M., Niemann, S., Kremer, K., Gutierrez, M.C., Hilty, M., Hopewell, P.C., Small, P.M., 2006. Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 2869–2873.
Gasnier, N., Rondelaud, D., Abrous, M., Carreras, F., Boulard, C., Diez-Banos, P., Cabaret, J., 2000. Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. Int. J. Parasitol. 30, 573–578.
Gerard, C., Balzan, C., Theron, A., 1995. Spatial distribution patterns of the sporocyst infrapopulation of *Schistosoma mansoni* within its mollusc host (*Biomphalaria glabrata*): an unusual phenotype of aggregation. J. Parasitol. 81, 310–312.
Goodall, C.P., Bender, R.C., Broderick, E.J., Bayne, C.J., 2004. Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). Mol. Biochem. Parasitol. 137, 321–328.
Green, D.M., Kraaijeveld, A.R., Godfray, H.C., 2000. Evolutionary interactions between *Drosophila melanogaster* and its parasitoid *Asobara tabida*. Heredity pt. 5 85, 450–458.
Guillou, F., Mitta, G., Dissous, C., Pierce, R., Coustau, C., 2004. Use of individual polymorphism to validate potential functional markers: case of a candidate lectin (BgSel) differentially expressed in susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 138, 175–181.
Guillou, F., Roger, E., Moné, Y., Rognon, A., Grunau, C., Theron, A., Mitta, G., Coustau, C., Gourbal, B.E., 2007. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. Mol. Biochem. Parasitol. 155, 45–56.
Hahn, U.K., Bender, R.C., Bayne, C.J., 2000. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. Dev. Comp. Immunol. 24, 531–541.
Hahn, U.K., Bender, R.C., Bayne, C.J., 2001a. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 87, 778–785.
Hahn, U.K., Bender, R.C., Bayne, C.J., 2001b. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. J. parasitol. 87, 292–299.
Howard, J.C., 1991. Immunology, disease and evolution. Nature 352, 565–567.
Howard, J.C., Jack, R.S., 2007. Evolution of immunity and pathogens. Eur. J. Immunol. 37, 1721–1723.
Janzen, D.H., 1980. When is it coevolution? Evolution 34, 611–612.
Kim, S.M., Kang, J.H., 1997. Peroxidative activity of human Cu, Zn-superoxide dismutase. Mol. Cells 7, 120–124.
Knudsen, G.M., Medzihradszky, K.F., Lim, K.C., Hansell, E., McKerrow, J.H., 2005. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. Mol. Cell. Proteomics 4, 1862–1875.
Koskella, B., Lively, C.M., 2007. Advice of the rose: experimental coevolution of a trematode parasite and its snail host. Evolution 61, 152–159.
Little, T.J., Watt, K., Ebert, D., 2006. Parasite-host specificity: experimental studies on the basis of parasite adaptation. Evolution 60, 31–38.
Lohse, K., Gutierrez, A., Kaltz, O., 2006. Experimental evolution of resistance in *Paramecium caudatum* against the bacterial parasite *Holospora undulata*. Evolution 60, 1177–1186.
Loker, E.S., Adema, C.M., 1995. Schistosomes, echinostomes and snails: comparative immunobiology. Parasitology today 11, 120–124.
Mei, H., LoVerde, P.T., 1997. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. Exp. Parasitol. 86, 69–78.
Moné, Y., Gourbal, B., Duval, D., Du Pasquier, L., Kieffer-Jaquinod, S., Mitta, G., 2010a. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e813.
Moné, Y., Mitta, G., Duval, D., Gourbal, B.E., 2010b. Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 125, 70–75.
Morgan, A.D., Gandon, S., Buckling, A., 2005. The effect of migration on local adaptation in a coevolving host-parasite system. Nature 437, 253–256.
Mourao, M.d.M., Dinguirard, N., Franco, G.R., Yoshino, T.P., 2009a. Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e550.
Mourao, M.M., Dinguirard, N., Franco, G.R., Yoshino, T.P., 2009b. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e502.
Munoz-Antoli, C., Marin, A., Trelis, M., Toledo, R., Esteban, J.G., 2010. Sympatric and allopatric experimental infections of the planorbid snail *Gyraulus chinensis* with miracidia of *Euparyphium albuferensis* (Trematoda: Echinostomatidae). J. Helminthol., 1–5.
Nelder, J.A., Mead, R., 1965. A simplex method for function minimization. Comput. J. 7, 308–313.
Nuismer, S.L., Gomulkiewicz, R., Ridenhour, B.J., 2010. When is correlation coevolution? Am. Nat. 175, 525–537.
Nuismer, S.L., Ridenhour, B.J., Oswald, B.P., 2007. Antagonistic coevolution mediated by phenotypic differences between quantitative traits. Evolution 61, 1823–1834.
Oter, O., Ribou, A.C., 2009. Quenching of long lifetime emitting fluorophores with paramagnetic molecules. J. Fluoresc. 19, 389–397.
Perez-Sanchez, R., Ramajo-Hernandez, A., Ramajo-Martin, V., Oleaga, A., 2006. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. Proteomics 6 (Suppl. 1), S226–236.
Rharass, T., Vigo, J., Salmon, J.M., Ribou, A.C., 2006. Variation of 1-pyrenebutyric acid fluorescence lifetime in single living cells treated with molecules increasing or decreasing reactive oxygen species levels. Anal. Biochem. 357, 1–8.
Ribou, A.C., Vigo, J., Kohen, E., Salmon, J.M., 2003. Microfluorometric study of oxygen dependence of (1"-pyrene butyl)-2-rhodamine ester probe in mitochondria of living cells. J. Photochem. Photobiol. B 70, 107–115.
Ribou, A.C., Vigo, J., Salmon, J.M., 2004. Lifetime of fluorescent pyrene butyric acid probe in single living cells for measurement of oxygen fluctuation. Photochem. Photobiol. 80, 274–280.
Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Pierce, R.J., Galinier, R., Mitta, G., 2008a. Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 157, 217–227.
Roger, E., Grunau, C., Pierce, R.J., Hirai, H., Gourbal, B., Galinier, R., Emans, R., Cesari, I.M., Cosseau, C., Mitta, G., 2008b. Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). PLoS Negl. Trop. Dis. 2, e330.
Roger, E., Mitta, G., Mone, Y., Bouchut, A., Rognon, A., Grunau, C., Boissier, J., Theron, A., Gourbal, B.E., 2008c. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach. Mol. Biochem. Parasitol. 157, 205–216.
Schulte, R.D., Makus, C., Hasert, B., Michiels, N.K., Schulenburg, H., 2010. Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 7359–7364.
Selkirk, M.E., Smith, V.P., Thomas, G.R., Gounaris, K., 1998. Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. Int. J. Parasitol. 28, 1315–1332.
Shapiro, S.S., Wilk, M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52, 591–611.
Steinauer, M.L., 2009. The sex lives of parasites: investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni*. Int. J. Parasitol. 39, 1157–1163.
Stern, O., Volmer, M., 1919. The extinction period of fluorescence. Physikalische Zeitschrift 20, 183–188.
Théron, A., Coustau, C., 2005. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? J. Helminthol. 79, 187–191.
Théron, A., Coustau, C., Rognon, A., Gourbiere, S., Blouin, M.S., 2008. Effects of laboratory culture on compatibility between snails and schistosomes. Parasitology 135, 1179–1188.
Théron, A., Pages, J.R., Rognon, A., 1997. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. Exp. Parasitol. 85, 1–9.
van Balkom, B.W.M., van Gestel, R.A., Brouwers, J.F.H.M., Krijgsveld, J., Tielens, A.G.M., Heck, A.J.R., van Hellemond, J.J., 2005. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. J. Proteome Res. 4, 958–966.
Van Valen, L., 1974. Molecular evolution as predicted by natural selection. J. Mol. Evol. 3, 89–101.
Vermeire, J.J., Taft, A.S., Hoffmann, K.F., Fitzpatrick, J.M., Yoshino, T.P., 2006. *Schistosoma mansoni*: DNA microarray gene expression profiling during the miracidium-to-mother sporocyst transformation. Mol. Biochem. Parasitol. 147, 39–47.
Vermeire, J.J., Yoshino, T.P., 2007. Antioxidant gene expression and function in in vitro-developing *Schistosoma mansoni* mother sporocysts: possible role in self-protection. Parasitology 134, 1369–1378.
Webster, J.P., Davies, C.M., 2001. Coevolution and compatibility in the snail-schistosome system. Parasitology 123 (Suppl.), S41–56.
Webster, J.P., Gower, C.M., Blair, L., 2004. Do hosts and parasites coevolve? Empirical support from the *Schistosoma* system. Am. Nat. 164 (Suppl. 5), S33–51.
Wu, X.J., Sabat, G., Brown, J.F., Zhang, M., Taft, A., Peterson, N., Harms, A., Yoshino, T.P., 2009. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. Mol. Biochem. Parasitol. 164, 32–44.
Yim, M.B., Chock, P.B., Stadtman, E.R., 1993. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. J. Biol. Chem. 268, 4099–4105.
Yim, M.B., Kang, J.H., Yim, H.S., Kwak, H.S., Chock, P.B., Stadtman, E.R., 1996. A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu, Zn-superoxide dismutase mutant: an enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5709–5714.
Yoder, J.B., Nuismer, S.L., 2010. When does coevolution promote diversification? Am. Nat. 176, 802–817.
Zelck, U.E., Von Janowsky, B., 2004. Antioxidant enzymes in intramolluscan *Schistosoma mansoni* and ROS-induced changes in expression. Parasitology 128, 493–501.

Please cite this article in press as: Moné, Y., et al. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* interactions. Int. J. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.007

DISCUSSION

DISCUSSION

Il y a de cela trente ans environ, en la quasi absence de données empiriques sur la structure génétique des populations de parasites, l'idée prédominante était que ces populations devaient être caractérisées par un haut niveau de consanguinité et une faible diversité génétique intra-populationnelle. On supposait alors que ces caractéristiques étaient liées principalement à la multiplication asexuée de certains stades du cycle de vie, à la dérive génétique, ou aux effets fondateurs (Price 1980). Cependant, avec le développement des études de génétique des populations et des enquêtes épidémiologiques moléculaires ces paradigmes ont été remis en cause. Ces systèmes biologiques apparaissent beaucoup plus complexes qu'on ne le pensait et présentent un niveau élevé de diversité génétique qui est le résultat de la course aux armements à laquelle ils se livrent avec leur(s) hôte(s). Ils constituent de bons modèles pour étudier les conséquences de la sélection naturelle sur des espèces faisant face à un environnement stressant. Un parasite quel qu'il soit a toujours besoin d'au moins un hôte pour achever son cycle de développement. Dans cette interaction nécessaire, il doit faire face au système immunitaire de l'hôte qui représente l'une des principales forces évolutives pour les parasites. Les parasites doivent s'adapter et/ou contourner l'immunité afin d'infecter et de se développer dans le milieu hôte. Réciproquement, l'hôte fait face à un environnement fluctuant : les parasites, auxquels il doit s'adapter. Les parasites représentent ainsi l'un des facteurs clés jouant sur les processus de sélection dans les populations hôtes (Bongfen *et al.* 2009). Ces pressions sélectives réciproques influencent les traits d'histoire de vie des deux protagonistes comme la virulence des parasites et la résistance des hôtes (Green *et al.* 2000b; Little *et al.* 2006b; Koskella & Lively 2007).

Les interactions hôte-parasite constituent donc des systèmes biologiques extrêmement dynamiques dans lesquels la confrontation des mécanismes de défense des hôtes et d'infectivité des parasites conduit à une véritable course coévolutive. Dans ce contexte une attention toute particulière a été portée au polymorphisme génotypique et phénotypique jouant sur ces facteurs clés. L'immunité des Invertébrés repose sur trois étapes principales: (i) la reconnaissance assurée par les Pattern Recognition Receptors (PRR); (ii) l'activation de réseaux de régulation et (iii) la mise en œuvre de mécanismes effecteurs assurés par des

molécules et cellules de défense qui attaquent et éliminent les molécules ou organismes reconnus comme « non-soi » (Medzhitov & Janeway 1997).

L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence les déterminants moléculaires impliqués dans cette course aux armements et ce à différents niveaux, aussi bien au niveau des mécanismes de reconnaissance du parasite qu'au niveau des mécanismes effecteurs qui conduisent à l'élimination du parasite.

Dans l'interaction *B. glabrata*/*S. mansoni*, cette course aux armements se traduit en populations naturelles par un polymorphisme de compatibilité caractérisé par la coexistence de couples hôte-parasite compatibles et incompatibles (Théron & Coustau 2005). Afin d'identifier les molécules impliquées dans ce polymorphisme de compatibilité, une approche protéomique comparative a été menée sur des extraits de sporocystes compatibles (C) et incompatibles (IC) vis-à-vis de la même souche de mollusque. Cette approche a permis l'identification de protéines différentiellement représentées entre les deux souches, parmi lesquelles se trouvent des enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant et des glycoprotéines très polymorphes de type mucine : les *Sm*PoMucs (Roger *et al.* 2008c). Ces *Sm*PoMucs se sont révélées particulièrement intéressantes pour deux raisons principales. Tout d'abord, il s'agit de mucines qui sont connues pour jouer un rôle important dans les interactions hôte-parasite notamment dans la protection du parasite, l'immunomodulation ou encore l'évasion immunitaire (Hicks *et al.* 2000; Theodoropoulos *et al.* 2001). Par ailleurs, leur étude approfondie au niveau génomique et transcriptionnel a révélé un haut degré de polymorphisme (Roger *et al.* 2008a; Roger *et al.* 2008b). Ceci est particulièrement intéressant car le maintien et l'évolution de la dynamique co-évolutive dans ces systèmes hôte-parasite pourraient reposer en partie sur la diversification et/ou le polymorphisme des molécules jouant un rôle clé au cœur de l'interaction (théorie de la Reine Rouge (Van Valen 1974)). Dans ce contexte mon travail de thèse a permis pour la première fois de mettre en évidence des variants moléculaires polymorphes potentiellement antigéniques chez un parasite métazoaire (*S. mansoni*) en interaction avec un hôte invertébré (*B. glabrata*). Pour étudier de façon complète ce polymorphisme de compatibilité et donc la course aux armements qui joue au sein de ce modèle, il nous a fallu rechercher les molécules partenaires des *Sm*PoMucs chez le mollusque. Pour cela nous avons développé une approche de co-précipitation d'extraits protéiques de sporocystes C et IC et d'extraits plasmatiques du mollusque afin de rechercher d'enventuels complexes immuns (interactome). Parmi les protéines précipitées, nous avons trouvé plusieurs glycoprotéines de *S. mansoni*, dont les *Sm*PoMucs, et plusieurs lectines de *B. glabrata* dont les FREPs qui sont des récepteurs immunitaires diversifiés. Une approche de

coimmunoprécipitation nous a permis de confirmer que les *Sm*PoMucs interagissaient bien avec les FREPs au sein du même complexe moléculaire. Ainsi, pour la première fois nous avons montré que des récepteurs immunitaires diversifiés d'un Invertébré (les FREPs de *B. glabrata*) interagissaient avec des variants antigéniques polymorphes d'un parasite métazoaire (*S. mansoni*) (cf. Partie 1, publication n°2).

Au cours de cette thèse, nous avons en outre montré que cette dynamique co-évolutive jouait également au niveau des mécanismes effecteurs de l'immunité dans ce même modèle. Chez *B. glabrata*, les ROS sont les principaux effecteurs de l'immunité. Plusieurs études ont montré que les ROS produits par l'hôte et les antioxydants produits par le parasite jouaient un rôle crucial dans l'issue de l'interaction (Hahn *et al.* 2001b, a; Bender *et al.* 2005; Guillou *et al.* 2007; Bayne 2009; Mourao *et al.* 2009). Dans la course aux armements qui a lieu entre l'hôte et le parasite il est attendu que les pressions de sélections conduisent à une correspondance entre le niveau de production de ROS par *B. glabrata* et la capacité antioxydante de *S. mansoni*. La comparaison de souches de *B. glabrata* et de *S. mansoni* issues d'isolats géographiques différents (ayant donc coévoluées de manière indépendante) nous a permis de montrer qu'il existe bien une adéquation entre capacité oxydante de l'hôte et capacité antioxydante du parasite (cf Partie 2, publication n°4).

1. Lectines et glycoprotéines actrices de la reconnaissance immunitaire

Les lectines sont des protéines capables de reconnaître des carbohydrates de manière spécifique et réversible. Elles jouent à ce titre un rôle majeur dans l'immunité innée (Sharon & Lis 2004). Par leur capacité à lier les motifs glucidiques des glycoconjugués, les lectines remplissent la fonction de PRR (Pattern Recognition Receptors) pour reconnaître les pathogènes et déclencher la réponse immunitaire (Dam & Brewer 2010). Elles peuvent ainsi jouer un rôle d'agglutinines, d'opsonines ou bien de récepteurs de surface (Sharon 2008).

Dans les interactions Mollusque/Trématode, la reconnaissance du non-soi par les lectines est largement documentée (Horak & van der Knaap 1997). Plusieurs études sur le modèle *B. glabrata/S. mansoni* ont fait état de la présence d'opsonines, de lectines, ou d'agglutinines dans les tissus ou l'hémolymphe du mollusque et de leur importance dans la réponse immunitaire de l'hôte (Bretting *et al.* 1983; Bayne *et al.* 1985; Boswell & Bayne

1985; Monroy & Loker 1993; Hertel *et al.* 1994). Récemment, certaines lectines de *B. glabrata* ont été caractérisées comme une galectine (BgGal) (Yoshino *et al.* 2008) ou encore les FREPs (Adema *et al.* 1997b; Zhang *et al.* 2004; Hanington *et al.* 2010a).

L'approche globale (interactome) que nous avons menée ne fait que confirmer l'importance des lectines et des glycoprotéines dans l'interaction *B. glabrata/S. mansoni*. En effet, cette approche a permis de mettre en évidence la co-précipitation de glycoprotéines de *S. mansoni* (*Sm*PoMucs, glycoprotéine K5 et tétraspannine) et de lectines de *B. glabrata* dont les FREPs et une nouvelle lectine (galactose-binding like lectin) qui présente des similarités pour une agglutinine liant le galactose du gastéropode *Helix pomatia* (H-lectin ; (Sanchez *et al.* 2006)). Ces éléments suggèrent que la reconnaissance du parasite par l'hôte pourrait être multifactorielle et qu'elle impliquerait une combinaison de récepteurs immunitaires (lectines de l'hôte) et différents glycoconjugués du parasite. La présence dans ce précipité de *Sm*PoMucs (glycoprotéines extrêmement polymorphes) et des FREPs (lectines diversifiées), laissait supposer une interaction possible entre ces deux protagonistes.

1.1 Le complexe immun *Sm*PoMuc-FREP-TEP

Par une approche protéomique comparative, nous avons identifié les *Sm*PoMucs comme une des différences majeures entre les protéomes des souches de *S. mansoni* compatibles et incompatibles (cf. Partie 1, publication n°1). Leur étude approfondie a permis de montrer qu'il s'agit de glycoprotéines de type mucine, exprimées uniquement dans les stades interagissant avec le mollusque et qu'elles étaient hautement polymorphes (Roger *et al.* 2008a; Roger *et al.* 2008b). Ces protéines sont composées d'une partie N-terminale variable constituée d'unités répétées de 9 acides aminés (UR) disposés en tandem qui peuvent être répétées jusqu'à une centaine de fois, et d'une partie C-terminale relativement constante qui permet de distinguer 3 groupes principaux de *Sm*PoMucs (groupes 1, 2 et 3). Le polymorphisme joue à la fois sur le nombre d'UR mais également sur la nature de ces UR (il existe 2 types d'UR, r1 et r2). De plus, ces UR portent des sites potentiels de O-glycosylation (Ser, Thr, Pro) et il a pu être montré que les *Sm*PoMucs sont hautement glycosylées. Il semble que le polymorphisme de la région N-terminale influence le statut de glycosylation des *Sm*PoMucs conduisant ainsi à un polymorphisme de glycosylation (Roger *et al.* 2008a; Roger *et al.* 2008b).

Le polymorphisme des *Sm*PoMucs est si fort que chaque individu (chaque larve de *S. mansoni*) exprime une combinaison de variants *Sm*PoMuc qui lui est propre. Les glycosylations portées par les *Sm*PoMucs pourraient être la cible de molécules de reconnaissance de type lectine du mollusque. Compte tenu de leur haut degré de polymorphisme, les *Sm*PoMucs pourraient interagir avec les FREPs polymorphes et diversifiées de *B. glabrata* (cf. introduction 1.2.2.e Les Fibrinogen related proteins (FREPs) de *B. glabrata*). Pour tester cette hypothèse nous avons développé une approche par coimmunoprécipitation (cf. Partie 1, publication n°2). Cette approche a permis de mettre en évidence un complexe protéique contenant les *Sm*PoMucs, les FREPs (en particulier FREP2) et un troisième partenaire appartenant à la famille des protéines à thioester (thioester-containing protein ou TEP) que nous avons appelé BgTEP (cf. Partie 1, publication n°2).

1.1.1 Les FREPs de *B. glabrata*, molécules partenaires des *Sm*PoMucs

En ce qui concerne les FREPs, un des peptides identifiés en spectrométrie de masse suite à l'approche de co-immunoprecipitation est spécifique de l'isoforme FREP2. FREP2 contient un seul domaine IgSF, le gène codant FREP2 a été entièrement séquencé. L'exon 1 code le peptide signal, tandis que les exons 2 et 3 codent le domaine IgSF et une partie de la région ICR, l'exon 4 codant le reste de l'ICR et le domaine FBG. Le domaine IgSF de FREP2 présente des similarités de séquence avec le domaine de type V des immunoglobulines cependant la présence d'un intron dans la séquence qui code ce domaine est un cas unique chez les Invertébrés (Léonard *et al.* 2001). La diversification des FREPs au niveau individuel a été mise en évidence pour le domaine IgSF1 de FREP3 (Zhang *et al.* 2004), cependant il n'existait aucune données concernant la diversité de FREP2, c'est pourquoi nous nous sommes intéressé à la diversité individuelle de FREP2. L'analyse des ADNc correspondant à FREP2 chez 5 individus a révélé la présence de 23 séquences différentes, un de ces individus exprime 8 isoformes de FREP2 or les expériences de Southern-blot (menées par l'équipe de Sam Loker aux Etats-Unis) estiment à 3 le nombre de loci de FREP2 par haplotype (Zhang & Loker 2004). Ces résultats suggèrent donc l'intervention de mécanismes générateurs de diversité au niveau somatique. Comme aucun évènement de recombinaison n'a été mis en évidence, cette diversification serait due à des mutations ponctuelles avec un fort biais pour les transitions (A/G et T/C) impliquant peut être du « RNA editing » (Buckley *et al.* 2008b).

La présence de FREP2 dans le complexe moléculaire avec *Sm*PoMuc suggère que cette FREP pourrait jouer un rôle important dans la réponse de *B. glabrata* à une infestation par *S. mansoni*. Cette hypothèse est corroborée par une étude qui a montré que l'expression de FREP2 est augmentée dans les premières heures (12-24 heures) après l'infection de *B. glabrata* par *S. mansoni* (Hertel *et al.* 2005). Plus récemment, des études par microarray de la réponse transcriptionnelle de *B. glabrata* à une infection par *S. mansoni* ont également rapporté une augmentation précoce de l'expression de FREP2 (Adema *et al.* 2010; Hanington *et al.* 2010b). De plus, des études au niveau protéique (Zhang *et al.* 2008) indiquent aussi que les FREPs seraient impliquées non seulement dans la reconnaissance de parasites métazoaires tels que les Trématodes (*S. mansoni* et *E. paraensei*), mais aussi dans celle d'autres pathogènes comme des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*), à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) ou des champignons (*Saccharomyces cerevisiae*). En effet, en fonction du challenge immunologique, ce ne sont pas les mêmes familles de FREPs qui sont impliquées dans la réponse, par exemple les FREPs 2 et 4 semblent participer à la reconnaissance des trématodes alors que ce sont d'autres FREPs (sûrement les FREPs à deux domaines IgSF comme FREP3 ou FREP7) qui reconnaissent les bactéries et les levures. Il existerait donc une spécialisation fonctionnelle des différentes familles de FREPs dans la reconnaissance des pathogènes.

Les FREPs présentent entre elles de fortes similarités de séquence au niveau protéique, l'identification d'un peptide spécifique de FREP2 indique clairement la présence de FREP2 dans le complexe *Sm*PoMuc-FREP-TEP, cependant la présence d'autres FREPs ne peut pas être exclue. Les FREPs pourraient en effet s'organiser en multimères, l'association de FREPs différentes (combinatoire) pourrait donc augmenter leur capacité de reconnaissance (Zhang *et al.* 2008).

1.1.2 La Thioester-containing protein de *B. glabrata* (BgTEP)

BgTEP constitue le troisième membre du complexe *Sm*PoMuc-FREP-TEP, il appartient à la famille des protéines à thioester dont tous les membres sont impliqués dans l'immunité. La présence de ce troisième partenaire dans le complexe *Sm*PoMuc-FREP-TEP indique donc clairement son rôle immunitaire (cf Partie 1, publication n°2). Le rôle des TEPs dans l'immunité des Invertébrés a été décrit dans d'autres systèmes hôte-parasite, en

particulier dans l'interaction entre *Plasmodium* (agent de la malaria) et le moustique vecteur *Anopheles gambiae* (Levashina *et al.* 2001; Blandin *et al.* 2004; Blandin *et al.* 2009).

La famille des TEPs regroupe des molécules impliquées dans la reconnaissance des pathogènes et dans l'activation des effecteurs de la réponse immunitaire. Chez les Vertébrés, les membres de cette famille sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire (Dodds & Law 1998) :

- les α-2-macroglobulines (A2M) qui sont des inhibiteurs de protéases impliqués dans l'élimination des protéases produites par les pathogènes
- les facteurs C3, C4 et C5 du complément qui se lient à la surface des pathogènes et induisent leur élimination soit par phagocytose, soit par leur participation à la formation du complexe lytique.

La caractéristique majeure des TEPs est la présence d'un pont β-cystéinyl-γ-glutamyl thioester intramoléculaire (Figure 11). Ce pont thioester est extrêmement réactif (une molécule d'eau suffit pour le rompre), pour éviter toute inactivation précoce il est protégé au sein de la protéine native. Les TEPs sont sécrétées sous forme inactive, elles sont activées par clivage protéolytique. Ce clivage entraîne un changement conformationnel, le pont thioester est alors exposé et peut réagir avec des groupements amines ou hydroxyles présents à proximité (ceux présents au niveau de la surface des pathogènes par exemple), créant ainsi des liaisons covalentes entre les TEPs et leurs cibles (Figure 11). Les facteurs du complément se lient aux surfaces des pathogènes, alors que les A2M se lient aux protéases. Le changement conformationnel, induit par l'activation protéolytique et la liaison de la TEP à sa cible, expose le domaine C-terminal de la protéine qui contient un domaine d'interaction avec les récepteurs des cellules phagocytaires (α-2-macroglobuline receptor-binding domain) permettant ainsi l'élimination du complexe TEP-cible par endocytose par récepteur (Dodds & Law 1998; Blandin & Levashina 2004). Dans le cas du complément, le clivage génère deux fragments: le fragment C-terminal contenant le thioester lié à sa cible et le fragment N-terminal qui induit le processus inflammatoire par chimiotactisme au niveau du site d'infection.

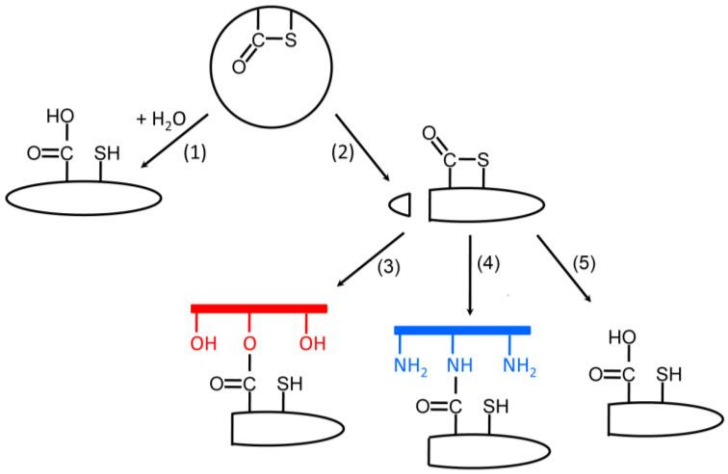


Figure 11. Propriétés de la liaison thioester (modifié d'après Dodds & Law 1998)
La liaison thioester est extrêmement réactive. Dans la TEP inactive, cette liaison est protégée à l'intérieur de la protéine où elle ne peut réagir qu'avec de petites molécules nucléophiles comme H_2O (1). L'activation protéolytique (2) de la TEP entraîne un changement conformationnel (représenté ici par le passage du cercle à l'ovale) qui expose la liaison thioester. Celle-ci peut alors réagir avec les groupements hydroxyles (3) ou amines (4) proches. Les liaisons thioester qui n'ont pas réagi rapidement avec les groupements hydroxyles ou amines sont inactivées par hydrolyse (5) ce qui limite la dispersion de ces molécules très réactives.

Les TEPs ne sont pas l'apanage des Vertébrés, elles ont été identifiées chez les Invertébrés aussi bien chez les Deutérostomiens que les Protostomiens. Les composants du système du complément ont été identifiés chez tous les Deutérostomiens (Nonaka & Yoshizaki 2004) alors que les A2M sont présentes chez les Deutérostomiens et chez les Protostomiens. A l'exception des TEPs d'insectes, toutes les TEPs identifiées chez les Protostomiens ont été isolées par leurs propriétés d'inhibiteurs de protéases (Spycher *et al.* 1987; Enghild *et al.* 1990; Thogersen *et al.* 1992; Bender & Bayne 1996; Kopacek *et al.* 2000; Levashina *et al.* 2003).

Le modèle dans lequel le rôle immunitaire de la TEP chez un Invertébré a été le plus étudié est le cas de l'interaction entre *A. gambiae* et *Plasmodium berghei* (parasite de Rongeurs). L'analyse du génome d'*A. gambiae* a révélé la présence de 15 ORF correspondant à des TEPs dont 4 séquences alléliques, l'une d'entre elle TEP1 a été particulièrement étudiée dans le groupe d'Elena Levashina à Strasbourg. Il a d'abord été démontré que TEP1 joue un rôle crucial dans la phagocytose de bactéries et dans l'élimination des ookinètes de *P. berghei* (l'ookinète est le stade du parasite présent dans l'intestin du moustique). En effet, l'opsonisation des bactéries par TEP1 est nécessaire pour activer leur phagocytose par les

hémocytes. TEP1 est secrétée par les hémocytes, puis clivée dans l'hémolymphe. La partie C-terminale de TEP1 se lie ensuite à la surface des bactéries (à Gram positif et à Gram-négatif) et des ookinètes (Levashina *et al.* 2001; Blandin *et al.* 2004). Chez les moustiques sensibles au parasite, le knockout de TEP1 provoque une augmentation de 5 fois du nombre d'ookinètes dans le tube digestif, tandis que les moustiques résistants deviennent sensibles (Blandin *et al.* 2004). Parmi les 19 séquences de TEPs dans le génome de l'anophèle, celle de TEP16 est fortement similaire à TEP1, ces deux séquences constituent en réalité deux allèles du même gène. TEP1 est exprimée dans les souches de moustiques sensibles (elle est désormais appelée TEP1s « s » pour sensible) et TEP16 est exprimée dans les souches de moustiques résistantes (elle est nommée TEP1r « r » pour résistant). La comparaison des séquences des deux allèles montre que la majorité des substitutions sont concentrées dans la région qui contient le site thioester, et donc impliquée dans la liaison au substrat (Baxter *et al.* 2007). Très récemment, il a été montré que le polymorphisme de ce seul gène est impliqué dans le polymorphisme de résistance d'*A. gambiae* à *P. berghei* (Blandin *et al.* 2009). De plus, il a été montré que TEP1 participe à un complexe moléculaire avec deux protéines appartenant à la famille des LRR : *Anopheles Plasmodium* responsive Leucine-rich repeat protein 1 (APL1) et Leucine-Rich IMmune protein 1 (LRIM1). Les expériences de knockdown sur APL1 ou LRIM1 montrent que le complexe formé par APL1 et LRIM1 est requis pour la stabilité de la forme clivée de TEP et sa liaison à *Plasmodium* (Fraiture *et al.* 2009; Povelones *et al.* 2009).

Dans notre étude, nous avons identifié une TEP de *B. glabrata*, BgTEP, qui fait partie du complexe moléculaire incluant BgBRA-FREP2 et *Sm*PoMucs. Nous avons caractérisé pour la première fois l'ORF complet codant BgTEP. L'analyse de la séquence du précurseur révèle la présence d'un peptide signal et les domaines protéiques présents dans les protéines à thioester tels que le site thioester, un domaine «complement component» et le domaine de liaison au récepteur de l'A2M (α-2-macroglobuline receptor-binding domain). BgTEP possède également 6 résidus cystéines à des positions conservées dans sa partie C-terminale, cette signature est propre aux TEPs d'Invertébrés. De plus, nous avons mené une analyse phylogénétique qui montre que BgTEP appartient au groupe formé par les TEPs d'Invertébrés qui est distinct du groupe formé par les A2M et les facteurs du complément. Les peptides identifiés par l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) sont présents uniquement dans la partie C-terminale de BgTEP, ce qui suggère que BgTEP subit un clivage comme les autres TEPs et donc uniquement la partie C-terminale active de la protéine participerait au complexe *Sm*PoMuc-FREP-TEP (cf. Partie 1, publication n°2).

La fonction de BgTEP au sein du complexe immun reste à élucider, cependant nous pouvons supposer qu'elle joue un rôle d'opsonine, favorisant ainsi la liaison du complexe FREPs-*Sm*PoMucs aux hémocytes. Elle serait donc impliquée dans le processus d'encapsulation et plus particulièrement dans la structuration de la capsule hémocytaire autour du parasite (Figure 12).

1.2 Le complexe *Sm*PoMuc-FREP-TEP au cœur du polymorphisme de compatibilité

L'interaction entre FREPs et *Sm*PoMucs amène à reconsidérer notre vision de l'immunité chez les Invertébrés. En effet, il semblerait que ces animaux soient capables de développer une réponse immunitaire plus complexe que ce qui avait été supposé jusqu'alors. Cette réponse serait basée sur la reconnaissance spécifique d'épitopes de pathogènes (et non plus de motifs conservés) au moyen de répertoire individuel de récepteurs diversifiés. Ainsi, chaque individu pourrait reconnaître un ensemble d'antigènes parasitaires grâce à son répertoire de récepteurs immunitaires de quelques dizaines voir centaines de molécules. Cependant ce répertoire serait moins fourni que dans le cas des Vertébrés qui comptent plusieurs milliards de sites de combinaison antigénique possibles et générés de manière somatique. Ainsi les Invertébrés ne pourraient reconnaître qu'une partie seulement de tous les antigènes auxquels ils pourraient être confrontés. Comme nous l'avons montré dans l'introduction, plusieurs travaux récents ont mis en évidence chez des espèces différentes d'Invertébrés des molécules diversifiées qui pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance immunitaire. Cette fonction supposée est toujours basée sur la structure de ces molécules et/ou la structure des gènes qui les codent. Cependant ces travaux ne fournissent aucun autre élément qui permette d'envisager plus avant une telle fonction. Notre étude est la première à aborder ce problème en recherchant leurs cibles antigéniques. L'identification des *Sm*PoMucs en tant que partenaires moléculaires des FREPs renforce grandement l'idée d'une fonction de récepteurs immunitaires pour les FREPs et de la nature antigénique des *Sm*PoMucs.

En outre, les FREPs et les *Sm*PoMucs pourraient constituer les déterminants moléculaires du polymorphisme de compatibilité rencontré en populations naturelles même si d'autres lectines et glycoprotéines pourraient également être impliquées. La compatibilité dépend à la fois de l'hôte et du parasite, elle est liée au génotype de l'hôte et à celui du parasite : elle résulte d'une confrontation génotype/génotype, le phénotype de l'hôte (infecté

ou non infecté) dépend du génotype du parasite et le phénotype du parasite (infectant ou non infectant) dépend du génotype de l'hôte (Lambrechts *et al.* 2006). Ce lien entre le polymorphisme génotypique et phénotypique de l'hôte et du parasite a fait l'objet de nombreuses études théoriques et dès 2005 André Théron et Christine Coustau avaient mis en avant la théorie du « matching phenotype » ou « matching molecular variant » afin d'expliquer la compatibilité dans les systèmes hôte/parasite. Toutefois des études empiriques illustrant ce lien dans le contexte adaptatif et co-évolutif restent rares, en particulier du fait de la difficulté de suivre les variations génotypiques et/ou phénotypiques dans ces modèles. Ici nous répondons partiellement à cette problématique en fournissant pour la première fois un support mécanistique à la théorie. Dans ce contexte, la confrontation d'un répertoire individuel de récepteurs diversifiés (FREPs) et d'un répertoire d'antigènes polymorphes (*Sm*PoMucs) conduirait à une reconnaissance différentielle de chaque individu parasite par chaque individu hôte. Ainsi, l'issue compatible ou incompatible d'une interaction *B. glabrata/S. mansoni* serait testée indépendamment pour chaque couple hôte-parasite. Le succès ou l'échec de l'infection dépendrait alors de la concordance ou de la non concordance des phénotypes de l'hôte (répertoire de FREPs) et du parasite (répertoire de *Sm*PoMucs) (Théron & Coustau 2005).

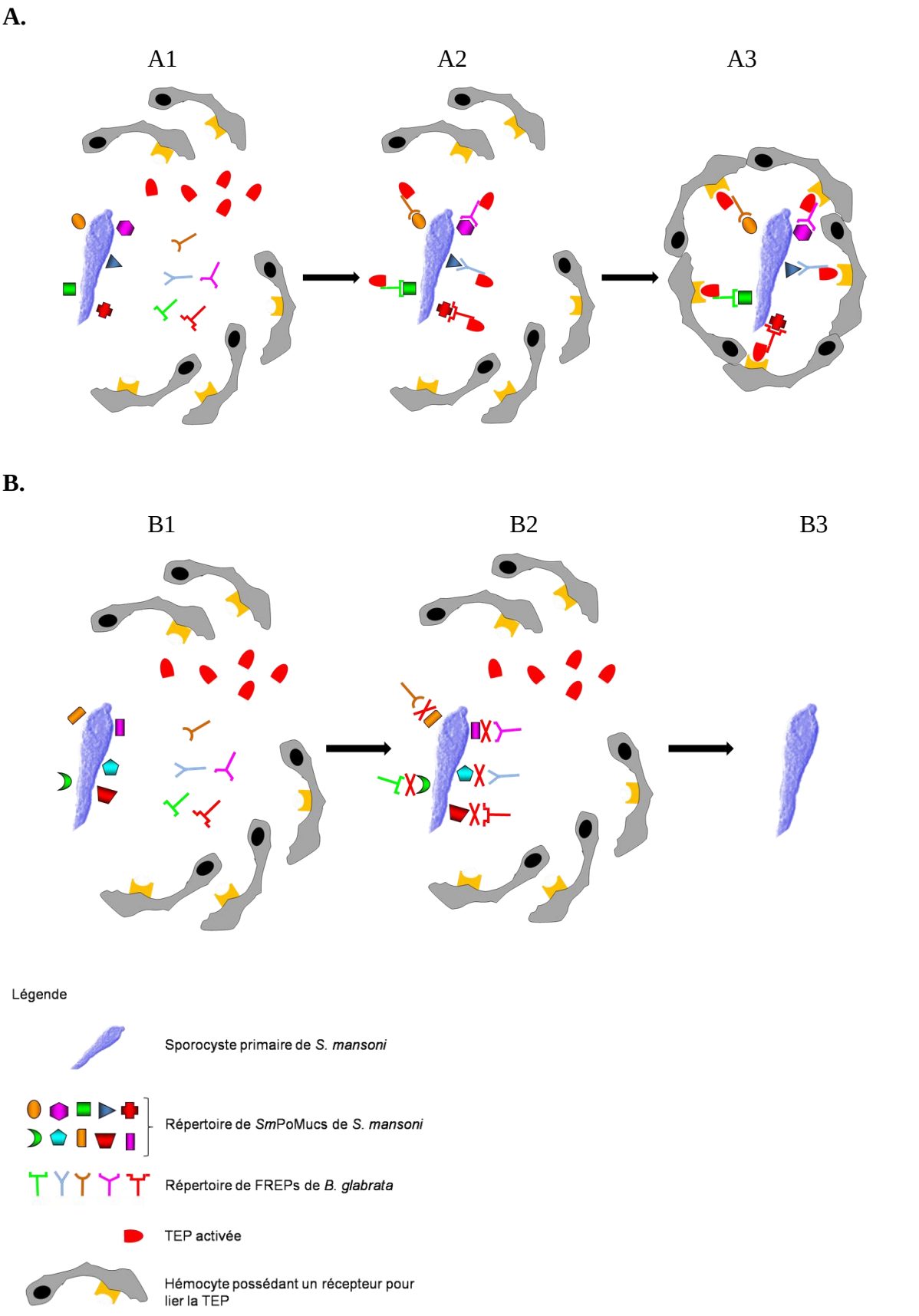


Figure 12. Représentation schématique du rôle des différents composants du complexe immun dans le cas d'une interaction incompatible et compatible (Cf. légende page suivante)

Légende de la figure 12

A. Dans le cas d'une interaction incompatible, le répertoire de *Sm*PoMucs du parasite et le répertoire de FREPs de l'hôte seraient concordants (A1). Les *Sm*PoMucs seraient reconnues par une ou des FREPs de l'hôte et la TEP lierait le complexe FREP-*Sm*PoMucs (A2) jouant alors un rôle d'opsonine. La TEP serait l'intermédiaire permettant la structuration de la capsule hémocytaire autour du parasite (A3).

B. Dans le cas d'une interaction compatible, les répertoires de *Sm*PoMucs et de FREPs ne seraient pas concordants (B1), les *Sm*PoMucs ne seraient pas reconnues par les FREPs (B2) et le parasite poursuivrait un développement normal sans être affecté par le système de défense du mollusque (B3).

2. Coévolution et effecteurs de l'immunité dans le modèle *B. glabrata / S. mansoni*

La survie des parasites dépend de leur capacité à résister aux mécanismes mis en place par l'hôte pour les détruire, comme par exemple la production de composés toxiques tels que les ROS, et réciproquement les hôtes répondent aux contre-mesures mises en place par le parasite. La course aux armements entre hôtes et parasites s'exprime donc aussi au niveau des mécanismes effecteurs de l'immunité. Dans ce contexte, les hypothèses théoriques comme celle de la Reine Rouge prédisent une concordance entre les traits phénotypiques de l'hôte comme la capacité à détruire le parasite et ceux du parasite tels que la défense contre les effecteurs immunitaires de l'hôte. Cependant, ces hypothèses théoriques restent largement du domaine conceptuel. La mise en évidence expérimentale d'une telle concordance requiert un modèle adapté où il est possible de suivre simultanément des traits fonctionnels de l'hôte et ceux du parasite qui y répondent. Bien souvent, les études sur la coévolution hôte-parasite se limitent à décrire des compatibilités plus élevées pour des systèmes hôte-parasite en conditions sympatriques par rapport à des conditions allopatriques. Ces compatibilités différentielles reflètent les adaptations réciproques des parasites et des hôtes (Gasnier *et al.* 2000; Gagneux *et al.* 2006; Munoz-Antoli *et al.* 2010). Certaines études se focalisent sur l'évolution d'un trait phénotypique particulier comme la résistance de l'hôte ou l'infectivité du parasite, cependant, la plupart ne considèrent qu'un seul des protagonistes de l'interaction : soit l'hôte, soit le parasite. Ainsi, dans l'interaction entre *D. melanogaster* et la guêpe parasitoïde *Asobara tabida*, il a été montré une augmentation de la résistance de l'hôte au cours des générations, cependant aucune modification de l'infectivité du parasitoïde n'a été mise en évidence en raison d'un nombre trop faible de générations d'*A. tabida* au cours de

l'expérience (Green *et al.* 2000a). Concernant l'infectivité du parasite, une étude menée sur le crustacé *D. magna* et la bactérie *Pasteuria ramosa* a montré que des passages successifs du parasite sur des hôtes de même génotype (clones) peuvent entraîner à long terme une augmentation de l'infectivité du parasite. Cependant, cette infectivité accrue du parasite n'est effective que vis-à-vis de la lignée d'hôte sur laquelle le parasite a été sélectionné, l'infectivité de ce dernier étant moindre vis-à-vis d'un clone d'hôte différent (Little *et al.* 2006a).

Seule une étude d'évolution expérimentale récente menée sur le nématode *Caenorhabditis elegans* et la bactérie pathogène *Bacillus thuringiensis* s'est intéressée à la réciprocité des modifications phénotypiques et génétiques chez les deux protagonistes (Schulte *et al.* 2010). En considérant 48 générations d'hôtes, les auteurs comparent des populations d'hôtes et de parasites en interaction avec des populations qui ne sont pas en interaction, et donc non soumises à une coévolution. Ces expériences mettent en évidence dans les populations qui coévoluent une augmentation de la virulence du parasite (taux de mortalité des hôtes infectés) et réciproquement une augmentation de la résistance de l'hôte (taux de survie des hôtes infectés). La diversité génétique des populations d'hôtes et de parasites en interaction est également affectée, ainsi la diversité génétique augmente au sein de chaque population de parasites mais également entre des populations différentes. En ce qui concerne l'hôte, c'est principalement au niveau interpopulationnel que la diversité génétique augmente. Dans tous les cas, la réponse du parasite est plus forte que la réponse de l'hôte. Ceci semble corrélé au fait que la vitesse d'évolution des parasites est plus grande que celle des hôtes, en raison d'effectifs plus importants et d'un temps de génération plus court. Enfin, dans ce modèle ce sont les échanges de matériel génétique entre bactéries et les mutations chez l'hôte qui semblent constituer les mécanismes générateurs de diversité dans les populations qui coévoluent. Cette étude montre également que la coévolution entraîne des réponses adaptatives différentes telles que l'augmentation des traits de vie directement impliqués dans l'interaction comme la virulence du parasite ou la résistance de l'hôte, mais aussi une diminution des autres traits de vie (taille, croissance, reproduction) ce qui traduit un coût à l'adaptation (Schulte *et al.* 2010).

L'interaction *B. glabrata/S. mansoni* est un modèle de choix pour étudier l'adaptation réciproque de traits fonctionnels qui jouent un rôle clé dans la réussite ou l'échec de l'interaction. Chez *B. glabrata* les ROS constituent les principaux effecteurs immunitaires impliqués dans la destruction du parasite. *S. mansoni* possèdent des molécules antioxydantes, les ROS scavengers, pour contrecarrer les ROS de l'hôte. Dans ce contexte, la coévolution

devrait conduire à une concordance entre le stress oxydant généré par l'hôte et la capacité antioxydante du parasite.

2.1 ROS et ROS scavengers : des acteurs essentiels de l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni*

Les ROS constituent des effecteurs immunitaires importants chez les Invertébrés (Nappi & Ottaviani 2000; Anderson 2001). Chez *B. glabrata*, ils semblent jouer un rôle clé dans la réponse anti-schistosome (Bayne 2009).

Les hémocytes de *B. glabrata* possèdent les enzymes nécessaires pour produire des ROS notamment la NADPH oxydase qui est responsable de la production de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ (cf. introduction 2.1). Cette production peut être stimulée *in vitro* par certains carbohydrates connus pour être présents à la surface de *S. mansoni* (mannose, fucose, galactose), ce qui suggère l'implication de lectines dans le déclenchement de la réponse effectrice des hémocytes (Hahn *et al.* 2000). L'inhibition des enzymes impliquées dans la production des ROS a un effet négatif sur la capacité des hémocytes à détruire les sporocystes de *S. mansoni* (Hahn *et al.* 2001b; Bender *et al.* 2005). Le premier ROS généré est l'anion superoxyde qui constitue le précurseur des autres ROS dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est le plus délétère pour *S. mansoni* (Hahn *et al.* 2001b). Les travaux de Bender *et al.* (2005) ont montré que les hémocytes issus d'une souche de *B. glabrata* présentant une faible compatibilité vis-à-vis de *S. mansoni* (souche 13-16-R1) produisent davantage de H_2O_2 que ceux issus d'une souche fortement compatible (souche M-line). Le peroxyde d'hydrogène est issu de la dismutation de l'anion superoxyde, cette réaction est catalysée par une métalloenzyme, la superoxyde dismutase à cuivre et zinc (Cu/Zn SOD). Cette enzyme jouerait donc un rôle central dans l'activité cytotoxique des hémocytes. Constitutivement, le niveau d'expression et l'activité de la Cu/Zn SOD sont deux fois plus élevés dans les hémocytes de mollusques faiblement compatibles que dans ceux de mollusques fortement compatibles (Goodall *et al.* 2004). Le haut niveau de Cu/Zn SOD dans les souches de *B. glabrata* à faible compatibilité serait à l'origine d'une capacité cytotoxique plus importante des hémocytes et expliquerait leur capacité à détruire le parasite. L'étude du polymorphisme du gène codant la Cu/Zn SOD dans les souches 13-16-R1 et M-line de *B. glabrata* a révélé l'existence de 3 allèles A, B et C. L'allèle B est significativement associé avec une faible compatibilité alors que l'allèle C est associé avec une forte compatibilité, cependant la présence/absence de ces allèles ne détermine pas seule la compatibilité de l'interaction *B. glabrata*/*S. mansoni*

(Goodall *et al.* 2006). La corrélation entre différents allèles codant la Cu/Zn SOD et la compatibilité différentielle de souches de mollusques suggèrent très fortement que les ROS soient des facteurs qui participent avec d'autres (tels que les FREPs par exemple) au déterminisme de la compatibilité entre *B. glabrata* et *S. mansoni.*

Comme cela a été montré dans l'introduction, les parasites disposent de moyens pour répondre au stress oxydant généré par l'hôte. En ce qui concerne *S. mansoni*, il a été montré que les produits d'excrétion-sécrétion du parasite (ES) (libérés au cours de la transformation du miracidium en sporocyste) possèdent une activité antioxydante et seraient donc impliqués dans la lutte contre les ROS produits par *B. glabrata* (Connors *et al.* 1991). Plus récemment, deux études protéomiques des ES de *S. mansoni*, dont une menée au laboratoire dans le cadre de mon Master (Annexe 1), ont conduit à l'identification de plusieurs enzymes antioxydantes dont la GST, la Cu/Zn SOD, et la Prx (Guillou *et al.* 2007; Wu *et al.* 2009). La transformation du miracidium en sporocyste s'accompagne d'un remaniement tégumentaire important au cours duquel le parasite (*post-miracidium*) est dépourvu de tégument protecteur, les tissus internes (lame basale, muscles) sont donc exposés au système de défense de l'hôte. Ce remaniement tégumentaire aboutit à la formation d'un nouveau tégument syncytial grâce à la fusion des membranes de vésicules d'exocytose (Pan 1996). Durant cette transition, le *post-miracidium* serait particulièrement sensible au stress oxydant issu d'une part du milieu intérieur de l'hôte (l'hémolymphe du mollusque est un milieu oxydant) et d'autre part de l'activité hémocytaire. La libération de molécules antioxydantes à proximité de la larve dans les premières heures de la transformation permettrait au parasite de résister à la cytotoxicité induite par l'hôte (Guillou *et al.* 2007; Wu *et al.* 2009). Les travaux de Vermeire & Yoshino (2007) se sont focalisés sur les peroxyrédoxines (Prx1 et Prx2) présentes dans les ES de *S. mansoni*. Ils ont montré *in vitro* que ces enzymes sont directement responsables (au moins en partie) de l'activité antioxydante des ES vis-à-vis de H_2O_2 qui est un composé hautement toxique pour *S. mansoni*. La production et la libération de molécules antioxydantes par le parasite au tout début de son développement intramolluscal semble donc constituer un moyen de défense contre la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, la diminution de l'expression de certaines enzymes antioxydantes de *S. mansoni* (Glutathione peroxydase, GST, Prx1 et 2) par la technique d'ARN interférent entraîne *in vitro* une diminution de la survie des sporocystes exposés à H_2O_2 et également des sporocystes en contact avec des hémocytes issus d'une souche de *B. glabrata* faiblement compatible (Mourao *et al.* 2009).

Tous ces éléments montrent donc que la capacité antioxydante du parasite est importante pour la survie de ce dernier face au stress oxydant induit par les hémocytes de

l'hôte en réponse à l'infection. Cependant seules des expériences *in vitro* ont été développées pour aborder l'étude des ROS et des ROS scavengers dans l'interaction *S. mansoni/ B. glabrata.* Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié l'impact des ROS et des ROS scavengers *in vivo* sur le succès d'infestation de *S. mansoni* (cf. Partie 2, publication n°3) Notre première approche a consisté à exposer les *miracidia* à l'amphotéricine B (AmB) (Partie 2, publication n°3). Cette molécule est surtout connue pour ses propriétés antifongiques, cependant elle est également active sur les cellules animales en générant un stress oxydant. Nous avons montré que l'exposition des *miracidia* à l'AmB entraîne une diminution considérable de leur succès d'infestation (réduction de la prévalence d'environ 50%). Les sporocystes traités à l'AmB sont plus sensibles à H_2O_2, ce qui se traduit par une moindre viabilité. De plus, la capacité antioxydante globale des *miracidia* est diminuée. Il semble que le stress oxydant généré par l'AmB accapare les différentes molécules impliquées dans la détoxification des ROS et diminue donc la capacité antioxydante globale du parasite. Ce dernier n'est plus en mesure de répondre au stress oxydant supplémentaire induit par l'activité des hémocytes. Ainsi une capacité antioxydante globale du parasite réduite entraîne un effet négatif sur son succès d'infestation. Cette étude confirme donc que la capacité du parasite à contrer un stress oxydant est cruciale pour son installation dans l'hôte.

2.2 La coévolution entre ROS et ROS scavengers dans l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni*

Dans le contexte d'une course coévolutive entre hôtes et parasites, il est donc attendu qu'il existe une correspondance entre la capacité de l'hôte à générer un stress oxydant et la capacité antioxydante du parasite. Afin de tester cette hypothèse nous avons comparé les capacités oxydante et antioxydante de couples hôte-parasite qui présentent des compatibilités différentes et qui sont issus de localités géographiques différentes (SmBRE/BgBRE et SmGH2/BgGUA) et ayant coévolués de manière indépendante (cf. Partie 2, publication n°4). Les deux souches de parasites et de mollusques présentent respectivement des capacités antioxydantes et oxydantes différentes. Notre étude montre que la souche de parasite ayant les meilleures capacités antioxydantes (SmBRE) interagit naturellement avec la souche de mollusque qui produit le plus de ROS (BgBRE) et réciproquement, la souche de parasite ayant des capacités antioxydantes plus faibles (SmGH2) interagit naturellement avec la souche de mollusque dont la production de ROS est plus faible (BgGUA). De plus, les

expériences d'infections croisées montrent que le parasite SmGH2 qui a coévolué avec le mollusque BgGUA, qui produit peu de ROS, infecte moins bien le mollusque BgBRE. De même, SmBRE, qui a une capacité antioxydante plus importante que SmGH2, infecte facilement le mollusque BgGUA qui produit peu de ROS. Ces éléments indiquent qu'il existerait donc une adaptation réciproque entre les capacités oxydantes de l'hôte et les capacités antioxydantes du parasite. Ces travaux mettent en évidence pour la première fois une concordance phénotypique au niveau de traits fonctionnels directement impliqués dans le dialogue moléculaire qui détermine l'issue de l'interaction entre un hôte et un parasite. Cependant il est à noter que dans le cas de la combinaison allopatrique SmBRE/BgGUA, le succès d'infestation est inférieur à celui de la combinaison compatible, ce résultat suggère que d'autres facteurs (comme par exemple les FREPs ou les *Sm*PoMucs) sont impliqués dans l'issue de l'interaction.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence les déterminants moléculaires du polymorphisme de compatibilité qui caractérise l'interaction *B. glabrata*/*S. mansoni*. Ce polymorphisme de compatibilité reflète la dynamique co-évolutive qui joue dans ce système conduisant à une course aux armements entre hôte et parasite. Nous avons montré que ce polymorphisme de compatibilité repose sur la confrontation de molécules de l'hôte et du parasite au cours de la phase de reconnaissance et de la phase effectrice de la réponse immunitaire de l'hôte. Les effecteurs immunitaires majeurs chez *B. glabrata* sont les ROS auxquels s'opposent les ROS scavengers de *S. mansoni*. Dans ce cas, la dynamique coévolutive a conduit à une concordance phénotypique entre le niveau de ROS produits par l'hôte pour éliminer le parasite et le niveau de ROS scavengers produits par le parasite pour contrecarrer la réaction de l'hôte. Au sein de la même espèce nous avons pu mettre en évidence pour les mollusques hôtes des niveaux de production de ROS différents entre individus. A ce polymorphisme de production de ROS fait très certainement face chez le parasite un polymorphisme dans la capacité à détoxiquer ces ROS, mais la mise en évidence de ce polymorphisme à l'échelle individuelle chez le parasite est impossible à réaliser chez *S. mansoni* en raison de leur petite taille. Une approche populationnelle comparative a donc été privilégiée dans notre travail à partir d'isolats d'origines géographiques différentes et qui ont évolué de manière indépendante. La plasticité interindividuelle que nous avons pu mettre en évidence rend donc compte de pressions de sélection qui tendent à faire évoluer les traits considérés. La course aux armements se traduit ici par une adaptation réciproque quantitative de la réponse de l'hôte et du parasite.

En ce qui concerne la reconnaissance un tout autre mécanisme semble être en jeu, basé sur des adaptations réciproques qualitatives. Le polymorphisme de compatibilité résulterait dans ce cas de la confrontation de répertoires de molécules polymorphes et/ou diversifiées. En effet, nos travaux montrent, pour la première fois, l'interaction entre des molécules de reconnaissance immunitaires diversifiées, les FREPs, et des antigènes parasitaires polymorphes, les *Sm*PoMucs, dans l'interaction entre un hôte invertébré (*B. glabrata*) et un parasite métazoaire (*S. mansoni*). Ces résultats constituent une illustration de l'hypothèse théorique de la Reine Rouge qui, appliquée aux systèmes hôtes-parasite, prédit un haut niveau

de diversification et/ou de polymorphisme des molécules qui jouent un rôle clé dans l'interaction. Dans ce modèle, la dynamique coévolutive aurait donc sélectionné des répertoires de molécules de reconnaissance chez l'hôte (FREPs) et des variants antigéniques chez le parasite (*Sm*PoMucs) qui se font face lors de l'infestation et qui participent à la détermination de l'issue compatible ou incompatible de l'interaction. La mise en évidence de l'interaction FREPs-*Sm*PoMucs permet d'envisager des analyses en populations naturelles afin de tester les hypothèses théoriques telles que celle du « matching phenotype » proposée par Théron & Coustau (2005) pour expliquer ce polymorphisme de compatibilité.

A l'échelle mondiale, il existe de grandes différences des niveaux de compatibilité entre *S. mansoni* et ses hôtes intermédiaires. Ces différences sont le reflet sans doute de l'histoire évolutive du schistosome. Traditionnellement, les espèces du genre *Schistosoma* sont classées dans 4 groupes d'espèces (*S. mansoni, S. haematobium, S. indicum, et S. japonicum*) selon leur répartition géographique, leurs caractères morphologiques et leur « affinité » vis-à-vis des genres de mollusques vecteurs (Lockyer *et al.* 2003). Les travaux de phylogénie moléculaire montrent que ces parasites auraient une origine asiatique et qu'ils auraient ensuite colonisé l'Afrique il y a 12 à 19 millions d'années, puis une vaste radiation se serait engagée pour donner les espèces des groupes africains *S. mansoni* et *S. haematobium*, ainsi que le groupe *S. indicum* qui aurait colonisé l'Inde postérieurement (Lockyer *et al.* 2003). *S. mansoni* aurait été exporté d'Afrique vers l'Amérique du Sud et les Caraïbes lors du déplacement des populations africaines vers le Nouveau Monde durant la traite négrière pendant les XVIème et XVIIème siècles et aurait pu s'y implanter grâce à la présence de mollusques du genre *Biomphalaria* sur le continent sud américain (Figure 13) (Lockyer *et al.* 2003). De façon surprenante, les analyses de phylogénie moléculaire ont montré que les espèces africaines du genre *Biomphalaria* forment un clade monophylétique. Au contraire, le groupe formé par les espèces sud-américaines est paraphylétique. *B. glabrata* forme un groupe séparé des autres espèces sud-américaines et ancestral par rapport aux taxons africains (Campbell *et al.* 2000; DeJong *et al.* 2001; Théron 2005). Ces éléments suggèrent donc que le genre *Biomphalaria* aurait une origine américaine. L'ancêtre commun de *B. glabrata* et des espèces africaines actuelles, un proto-*B. glabrata*, aurait effectué une migration transatlantique d'Ouest en Est (transporté sur des radeaux de végétation ou bien par des oiseaux marins), aurait colonisé l'Afrique il y a 1 à 5 millions d'années, et serait à l'origine des 12 espèces de *Biomphalaria* connues à ce jour sur le continent Africain (Figure 13) (Morgan *et al.* 2001). L'arrivée en Afrique du genre *Biomphalaria* est postérieure à l'émergence des groupes *S. indicum, S. haematobium,* et *S. mansoni*. C'est donc un autre

genre de mollusque qui était hôte intermédiaire de l'ancêtre de *S. mansoni*. L'identité de ce mollusque reste une question ouverte, il pourrait s'agir d'une espèce du genre *Lymnaea* ou *Bulinus* (Morgan *et al.* 2002). L'ancêtre de *S. mansoni* aurait donc effectué un changement d'hôte en dépit de la distance phylogénétique qui sépare les genres *Lymnaea* et/ou *Bulinus* du genre *Biomphalaria*. Il semble donc que les Trématodes aient été capables d'effectuer des changements d'hôtes intermédiaires même si ces derniers sont éloignés phylogénétiquement (Lockyer *et al.* 2004). Le comment et le pourquoi de ce transfert d'un genre d'hôte à un autre reste peu clair. Un tel changement suggère que (i) ces nouveaux hôtes potentiels aient offert aux Schistosomes des environnements plus favorables à leur développement et donc un gain de fitness pour les parasites qui se sont finalement spécialisés pour ses nouveaux hôtes intermédiaires ; (ii) il est également possible que lors de leur arrivée en Afrique l'espèce ancestrale de *Biomphalaria* ait eu une capacité proliférative et d'expansion importante qui ait supplanté les autres espèces de mollusque laissant ainsi peu de possibilité aux parasites de trouver et d'infecter d'autres hôtes que des *Biomphalaria*.

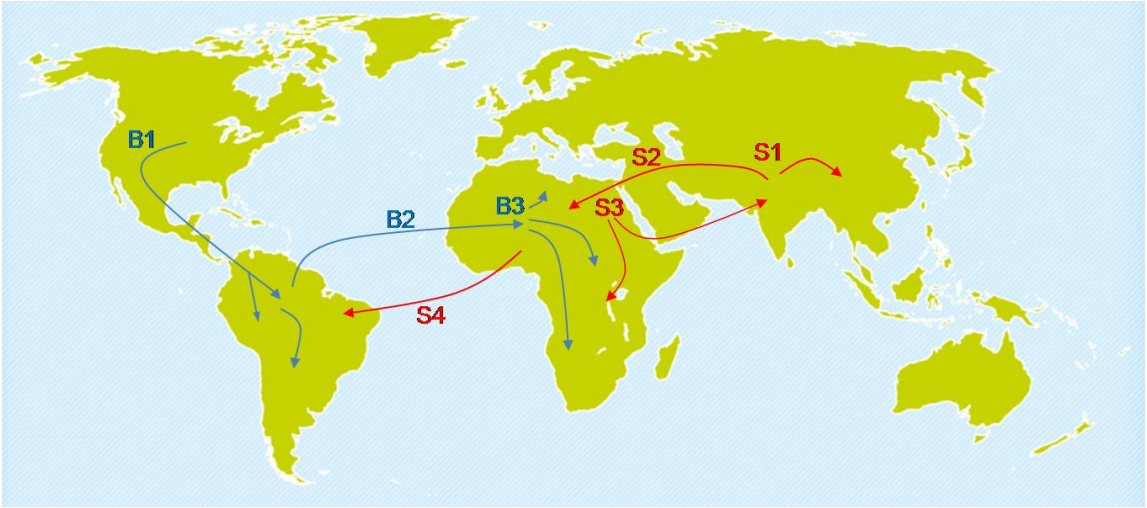


Figure 13. Histoire évolutive de *S. mansoni* et de ses hôtes intermédiaires du genre *Biomphalaria* (d'après Morgan *et al.* 2001; Lockyer *et al.* 2003; Théron 2005)

Les flèches bleues représentent la dispersion du genre *Biomphalaria* depuis son origine américaine : (B1) l'ancêtre de *Biomphalaria* migre de l'Amérique du Nord vers l'Amérique du Sud, (B2) il y a environ 1,1 à 5 millions d'années une espèce de *Biomphalaria* (un proto-*B. glabrata*) effectue une migration transatlantique d'Ouest en Est, (B3) diversification des espèces de *Biomphalaria* donnant naissance aux 12 espèces africaines actuelles (le taxon africain est monophylétique).

Les flèches rouges représentent la dispersion de *S. mansoni* depuis son origine asiatique. (S1) l'ancêtre des espèces du genre *Schistosoma* donne naissance aux espèces du groupe *S. japonicum*, (S2) l'ancêtre des *Schistosoma* migre vers l'Afrique il y a 12 à 19 millions d'années, (S3) radiation du genre *Schistosoma* en Afrique pour donner les groupes d'espèces africains *S. mansoni* et *S. haematobium* ainsi que le groupe *S. indicum* qui reviens vers l'Asie et colonise le continent indien, (S4) il y a environ 500 ans *S. mansoni* colonise l'Amérique du Sud et les Caraïbes via la traite négrière.

Quelle que soit la cause de ce transfert d'hôte il n'en reste pas moins que l'interaction de *S. mansoni* avec ses hôtes intermédiaires africains (par exemple *B. alexandrina*, *B. pfeiffeiri*) est donc ancienne de plusieurs millions d'années. Les parasites sont donc parfaitement adaptés à leurs hôtes, ce qui se traduit par une capacité infectante importante et une compatibilité très forte avec des prévalences de 100% lors d'infestations réalisées avec seulement 2 ou 3 *miracidia* (Figure 14). Au contraire, en Amérique du Sud et aux Caraïbes, l'interaction de *S. mansoni* avec des hôtes intermédiaires américains est très récente et ne date que de quelques centaines d'années (environ 500 ans). L'arrivée de *S. mansoni* dans le Nouveau Monde a imposé une pression de sélection forte sur le parasite pour une adaptation rapide de ce dernier à une nouvelle espèce de mollusque *B. glabrata*. La réussite rapide de *S. mansoni* en Amérique du Sud est probablement liée au fait qu'il ait retrouvé le descendant de l'espèce ancestrale des mollusques africains avec lesquels il avait coévolué depuis au moins 1 million d'années en Afrique (Théron 2005). Sachant que les Schistosomes en Afrique ont réalisé un transfert d'hôte en passant d'un genre (*Lymnaea*, *Bulinus*) à un autre (*Biomphalaria*), il n'est pas difficile d'envisager qu'il n'est eu aucune difficulté dans le Nouveau Monde à effectuer un transfert d'espèce de *B. alexandrina*, *B. pfeiffeiri* (Afrique) à *B. glabrata* (Amérique du Sud). Cette interaction récente dans le Nouveau Monde se caractérise par des compatibilités faibles et par l'existence dans les populations naturelles d'un polymorphisme de compatibilité (Figure 14). Au sein du même mollusque certains parasites sont reconnus et encapsulés (incompatibles) d'autres s'implantent et se développent normalement (compatibles). Dans ce cas les fortes prévalences ne sont atteintes que lors d'infestations avec un plus grand nombre de *miracidia* (par exemple, la souche Brésilienne du laboratoire présente une prévalence de 100% avec 10 *miracidia*, mais seulement 50% avec 1 *miracidium*) De plus, les proportions de parasites qui s'implantent réellement chez l'hôte restent faibles, elles dépassent rarement 30 à 40%.

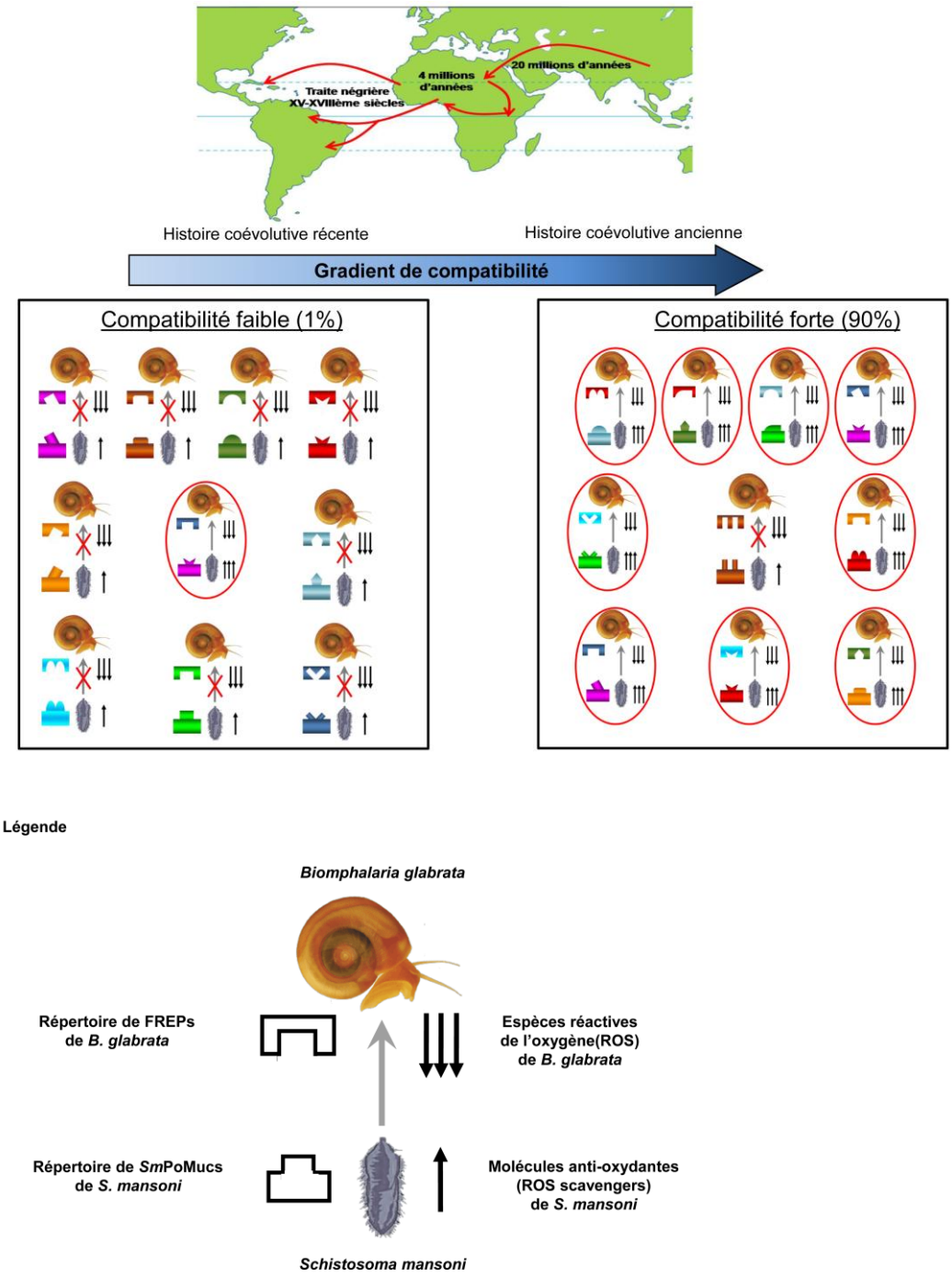


Figure 14. Histoire coévolutive de l'interaction *Biomphalaria sp./S. mansoni* et bases moléculaires du polymorphisme de compatibilité.

Légende de la figure 14

L'interaction de *S. mansoni* avec ses hôtes intermédiaires africains (*B. alexandrina*, *B. pfeiffeiri*) est ancienne avec des parasites très bien adaptés à ces hôtes ce qui se traduit par une compatibilité très forte. Dans ce cas la dynamique coévolutive a sélectionné des répertoires de variants antigéniques du parasite (*Sm*PoMucs) non reconnus par les répertoires de molécules de reconnaissance (FREPs) de l'hôte. De plus, au cours de cette coévolution, le parasite a acquis la capacité à répondre aux effecteurs immunitaires de l'hôte par l'ajustement de la production de ROS scavengers en fonction de la production de ROS de l'hôte (correspondance entre le nombre de flèches sur la figure entre hôte et parasite). Au contraire, l'implantation de *S. mansoni* dans les Caraïbes et en Amérique du Sud résulte de l'adaptation rapide et récente de ce dernier à une nouvelle espèce du genre *Biomphalaria*, *B. glabrata*. Dans ce cas la compatibilité est faible, un grand nombre de parasites est reconnu et éliminé par le système immunitaire de l'hôte.

Les interactions compatibles sont entourées d'un cercle rouge, les interactions incompatibles sont indiquées par une croix rouge. Les répertoires de FREPs et de *Sm*PoMucs ont des formes et des couleurs différentes pour illustrer la diversité des répertoires.

Dès lors que nous disposons des marqueurs fonctionnels polymorphes que sont les FREPs et les *Sm*PoMucs, nous pouvons envisager d'étudier leur concordance phénotypique dans des populations naturelles afin de tester expérimentalement l'hypothèse théorique du « matching phenotype » ou « matching molecular variant » (Théron & Coustau 2005). Nous disposons au laboratoire d'une grande variété de souches d'hôtes et de parasites issues du terrain et d'origines géographiques différentes qui constituent autant de systèmes hôte-parasite avec des histoires évolutives différentes et se trouvant sur ce gradient de compatibilité de l'Afrique aux Caraïbes et Amérique du Sud (Figure 14). Le séquençage exhaustif des ADNc codant les *Sm*PoMucs et les FREPs dans des systèmes où la compatibilité est forte, tels que les systèmes africains anciens (souche égyptienne de *S. mansoni* et *B. alexandrina*), ou ceux présents dans les zones de réémergence de la maladie (souche omanaise de *S. mansoni* et *B. pfeiffeiri*), et dans des systèmes où la compatibilité est plus faible (souches guadeloupéennes, vénézuélienne et brésilienne) devrait permettre la mise en évidence de profils moléculaires caractéristiques, comme l'expression différentielle de groupes de *Sm*PoMucs, de variants, ou bien de combinaisons de variants particuliers. Les travaux de Roger *et al.* (2008b) ont montré que la souche incompatible de *S. mansoni* présente des variants de *Sm*PoMucs qui contiennent une combinatoire d'unités répétées (unités répétées de type r1 et r2), ces variants étant absents chez la souche compatible. Une étude exhaustive des transcrits codant les *Sm*PoMucs et les FREPs devrait nous renseigner non seulement sur les combinaisons de variants de FREPs et de *Sm*PoMucs qui déterminent le succès ou l'échec de l'interaction, mais également sur l'influence des pressions de sélection qui jouent sur le

polymorphisme de ces répertoires moléculaires. En effet un certain nombre de questions se posent : Le polymorphisme est-il maintenu dans des systèmes anciens, stabilisés où la compatibilité est forte ? Le polymorphisme est-il présent uniquement dans les interactions récentes ?

Le maintien du polymorphisme des *Sm*PoMucs par des mécanismes complexes (Roger *et al.* 2008b) pose également le problème de la fonction de ces molécules chez le parasite. En effet, si ces molécules ne constituaient que le support de la reconnaissance du parasite par l'hôte, nous pourrions nous attendre à ce qu'elles soient contre-sélectionnées. Toutefois les *Sm*PoMucs sont présentes même dans les systèmes pour lesquels la dynamique co-évolutive est ancienne, nous pouvons donc supposer qu'elles doivent remplir d'autres fonctions importantes pour le parasite. En effet, les mucines sont connues pour jouer des rôles importants dans les interactions hôte-parasite, elles sont impliquées principalement dans la pénétration dans l'hôte et l'évasion immunitaire (Hicks *et al.* 2000; Theodoropoulos *et al.* 2001). L'identification d'un effecteur immunitaire tel que la TEP dans le complexe immun exclue un rôle des *Sm*PoMucs dans l'évasion immunitaire. Elles joueraient donc un autre rôle peut-être lors de l'installation du parasite dans les tissus du mollusque, au cours du remaniement tégumentaire qui accompagne la transformation du miracidium en sporocyste et dans la migration de ce dernier dans les tissus de l'hôte.

En ce qui concerne les FREPs, l'interaction FREPs-*Sm*PoMucs renforce le rôle supposé des FREPs dans la reconnaissance immunitaire chez *B. glabrata* et donc l'idée selon laquelle la réponse immunitaire des Invertébrés pourrait être basée sur un large répertoire individuel de molécules de reconnaissance permettant de reconnaitre un large répertoire d'antigènes parasitaires. Le fait que des molécules polymorphes interagissent ensemble n'est pas en soit une preuve de leur implication dans des mécanismes de reconnaissance immunitaire qui induisent l'élimination du parasite. Toutefois le complexe protéique mis en évidence dans notre étude contient trois partenaires : *Sm*PoMucs, FREPs et TEP. Ce dernier de par sa fonction connue dans d'autres modèles (Levashina *et al.* 2001; Stroschein-Stevenson *et al.* 2006) et en particulier son rôle d'opsonine (Levashina *et al.* 2001) nous donne pour la première fois des arguments forts pour dire que les partenaires mis en évidence constituent un véritable complexe immun d'Invertébré.

Cependant les modalités d'interaction de ces différents partenaires restent à élucider. En effet, les FREPs sont des molécules qui possèdent deux domaines d'interaction potentiels avec des antigènes de parasite, d'une part le domaine de type immunoglobuline (porteur de la diversité) et d'autre part le domaine de type fibrinogène (porteur du CRD). Pour caractériser le domaine

impliqué dans l'interaction, il est possible de produire des protéines recombinantes tronquées, correspondant soit au domaine immunoglobuline soit au domaine fibrinogène. Le recombinant correspondant au domaine d'interaction devrait pouvoir être coimmunoprécipité avec les *Sm*PoMucs.

Au sein de ce complexe immun, seule la TEP ne présente pas de polymorphisme, contrairement à son homologue chez *A. gambiae*. Chez ce dernier, il existe 15 gènes codant les TEPs issus d'évènements de duplication et qui pourraient permettre la reconnaissance d'une diversité de pathogènes (Christophides *et al.* 2002). Cependant un seul gène (TEP1) a fait l'objet d'études approfondies qui montrent que deux allèles de ce gène, TEP1r et TEP1s confèrent respectivement une résistance et une sensibilité vis-à-vis de *Plasmodium Berghei* aux souches d'*A. gambiae* (Levashina *et al.* 2001; Blandin *et al.* 2004; Blandin *et al.* 2009). Chez *B. glabrata*, l'absence de polymorphisme de la TEP suggère qu'elle n'intervient pas directement dans la reconnaissance du parasite mais qu'elle participerait plutôt à l'initiation de la phase effectrice, en faisant le lien entre les FREPs (molécules de reconnaissance) et les hémocytes (cellules effectrices de l'immunité). La présence d'un domaine de liaison au récepteur de l'A2M dans la TEP suggère que celle-ci pourrait jouer le rôle d'opsonine en se liant aux hémocytes. La TEP pourrait donc être impliquée dans la structuration de la capsule hémocytaire autour du parasite, processus qui, à ce jour, est très mal connu dans notre modèle et dont les bases moléculaires restent à préciser. Dans un premier temps, il faudrait préciser comment la TEP est liée aux autres partenaires du complexe. En effet, celle-ci se lie-t-elle à une FREP ou bien au complexe FREP-*Sm*PoMuc ? Des anticorps anti-TEP sont disponibles depuis peu au laboratoire et des expériences de coimmunoprécipitation devraient permettre de clarifier les modes d'interaction de la TEP et de ses partenaires. Pour étudier le rôle de la TEP dans les phénomènes de phagocytose et d'encapsulation, nous disposons au laboratoire d'un modèle cellulaire *in vitro*, les cellules Bge (*B. glabrata* embryonic cell line). Cette lignée cellulaire partage des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles avec les hémocytes de *B. glabrata*, notamment la capacité d'encapsuler *in vitro* des sporocystes de *S. mansoni* (Yoshino *et al.* 1999). Des expériences de RT-PCR menées récemment au laboratoire ont montré que ces cellules expriment également la TEP. La mise en présence des cellules Bge avec des anticorps anti-TEP devrait diminuer voire abolir leur capacité de phagocytose et/ou d'encapsulation si les TEPs sont bien impliquées dans ces *processi*. Ces mêmes anticorps pourront être utilisés pour localiser la TEP sur des coupes histologiques par immunohistochimie. Compte tenu de nos hypothèses, il est attendu que la TEP soit localisée au niveau de la capsule. Par ailleurs, nous maîtrisons depuis peu la technique d'ARN

interférent (knock-down) dans notre modèle (Baeza Garcia *et al.* 2010). Ceci ouvre la voie à des études fonctionnelles *in vivo*. En effet, l'inhibition de l'expression de la TEP chez le mollusque devrait se traduire par l'incapacité de celui-ci à encapsuler le parasite dans le cas d'une interaction incompatible, ce qui devrait se traduire par une augmentation de la prévalence chez les mollusques traités.

Les travaux menés au cours de cette thèse montrent que le polymorphisme de compatibilité est un phénomène multifactoriel et qui repose essentiellement sur le dialogue moléculaire entre l'hôte et le parasite au cours de la réponse immunitaire de l'hôte. Notre étude montre également que la réponse immunitaire de *B. glabrata* est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires en particulier au niveau des mécanismes de reconnaissance qui semblent être très spécifiques. Cette spécificité serait basée sur l'expression individuelle d'un répertoire de récepteurs immuns diversifiés capables d'interagir avec un répertoire d'antigènes parasitaires polymorphes. Cette interaction pourrait constituer une étape évolutive dans l'acquisition de l'immunité adaptative. *B. glabrata* est un mollusque soumis à une forte pression de pathogènes, en particulier de parasites métazoaires puisqu'il est l'hôte d'au moins 20 espèces de Trématodes en Amérique du Sud et environ 30 espèces en Afrique. La nécessité pour l'hôte de reconnaître des organismes parasites eucaryotes métazoaires qui ne possèdent pas de structures moléculaires particulières (comme les PAMPS des pathogènes bactériens, champignons, levures, …) mais des structures moléculaires différentes de l'hôte aurait imposé une pression sélective forte sur l'hôte peut-être à l'origine de l'apparition de ces récepteurs immuns diversifiés et qui aboutit à une reconnaissance interindividuelle entre hôte et parasite.

BIBLIOGRAPHIE

Adema C.M., Hanington P.C., Lun C.-M., Rosenberg G.H., Aragon A.D., Stout B.A., Lennard Richard M.L., Gross P.S. & Loker E.S. (2010). Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes). *Molecular Immunology*, 47, 849-860.

Adema C.M., Hertel L.A. & Loker E.S. (1997a). Infection with *Echinostoma paraensei* (Digenea) induces parasite-reactive polypeptides in the hemolymph of the gastropod host *Biomphalaria glabrata*. In: *Parasite Effects on Host Physiology and Behavior* (ed. Beckage N). Chapman Press New York, pp. 76-98.

Adema C.M., Hertel L.A., Miller R.D. & Loker E.S. (1997b). A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8691-6.

Alder M.N., Rogozin I.B., Iyer L.M., Glazko G.V., Cooper M.D. & Pancer Z. (2005). Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science*, 310, 1970-3.

Anderson R.S. (2001). Reactive oxygen species and antimicrobial defenses of invertebrates: a bivalve model. *Adv Exp Med Biol*, 484, 131-9.

Baeza Garcia A., Pierce R.J., Gourbal B., Werkmeister E., Colinet D., Reichhart J.M., Dissous C. & Coustau C. (2010). Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite Schistosoma mansoni. *PLoS Pathog*, 6.

Baxter R.H., Chang C.I., Chelliah Y., Blandin S., Levashina E.A. & Deisenhofer J. (2007). Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 11615-20.

Bayne C.J. (2009). Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. *Molecular and biochemical parasitology*, 165, 8-18.

Bayne C.J., Boswell C.A., Loker E.S. & Yui M.A. (1985). Plasma components which mediate cellular defences in the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol*, 9, 523-30.

Bender R.C. & Bayne C.J. (1996). Purification and characterization of a tetrameric alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc Biomphalaria glabrata. *Biochem J*, 316 (Pt 3), 893-900.

Bender R.C., Broderick E.J., Goodall C.P. & Bayne C.J. (2005). Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H2O2 than susceptible snails. *J Parasitol*, 91, 275-9.

Berenos C., Wegner K.M. & Schmid-Hempel P. (2010). Antagonistic coevolution with parasites maintains host genetic diversity: an experimental test. *Proceedings*.

Bernatchez L. & Landry C. (2003). MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J Evol Biol*, 16, 363-77.

Beutler B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, 40, 845-59.

Blandin S. & Levashina E.A. (2004). Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol Immunol*, 40, 903-8.

Blandin S., Shiao S.H., Moita L.F., Janse C.J., Waters A.P., Kafatos F.C. & Levashina E.A. (2004). Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, 116, 661-70.

Blandin S.A., Wang-Sattler R., Lamacchia M., Gagneur J., Lycett G., Ning Y., Levashina E.A. & Steinmetz L.M. (2009). Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in Anopheles gambiae. *Science*, 326, 147-50.

Bongfen S.E., Laroque A., Berghout J. & Gros P. (2009). Genetic and genomic analyses of host-pathogen interactions in malaria. *Trends Parasitol*, 25, 417-22.

Boswell C.A. & Bayne C.J. (1985). *Schistosoma mansoni*: lectin-dependent cytotoxicity of hemocytes from susceptible host snails, *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol*, 60, 133-8.

Bouchut A., Roger E., Coustau C., Gourbal B. & Mitta G. (2005). Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* model: Potential involvement of adhesion genes. *International Journal for Parasitology*.

Bowden L., Dheilly N.M., Raftos D.A. & Nair S.V. (2007). New immune systems: pathogen-specific host defence, life history strategies and hypervariable immune-response genes of invertebrates *Invertebrate Survival Journal*, 4, 127-136.

Bretting H., Stanislawski E., Jacobs G. & Becker W. (1983). Isolation and characterization of a lectin from the snail *Biomphalaria glabrata* and a study of its combining site. *Biochim Biophys Acta*, 749, 143-52.

Brites D., McTaggart S., Morris K., Anderson J., Thomas K., Colson I., Fabbro T., Little T.J., Ebert D. & Du Pasquier L. (2008). The Dscam homologue of the crustacean Daphnia is diversified by alternative splicing like in insects. *Mol Biol Evol*, 25, 1429-39.

Brockton V., Henson J.H., Raftos D.A., Majeske A.J., Kim Y.O. & Smith L.C. (2008). Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin--unexpected protein-size range and protein expression in a new coelomocyte type. *J Cell Sci*, 121, 339-48.

Buckley K.M., Munshaw S., Kepler T.B. & Smith L.C. (2008a). The 185/333 gene family is a rapidly diversifying host-defense gene cluster in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Mol Biol*, 379, 912-28.

Buckley K.M. & Smith L.C. (2007). Extraordinary diversity among members of the large gene family, 185/333, from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *BMC Mol Biol*, 8, 68.

Buckley K.M., Terwilliger D.P. & Smith L.C. (2008b). Sequence variations in 185/333 messages from the purple sea urchin suggest posttranscriptional modifications to increase immune diversity. *J Immunol*, 181, 8585-94.

Campbell G., Jones C.S., Lockyer A.E., Hughes S., Brown D., Noble L.R. & Rollinson D. (2000). Molecular evidence supports an african affinity of the neotropical freshwater gastropod, Biomphalaria glabrata, say 1818, an intermediate host for Schistosoma mansoni. *Proc Biol Sci*, 267, 2351-8.

Cannon J.P., Haire R.N. & Litman G.W. (2002). Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. *Nat Immunol*, 3, 1200-7.

Cannon J.P., Haire R.N., Schnitker N., Mueller M.G. & Litman G.W. (2004). Individual protochordates have unique immune-type receptor repertoires. *Current Biology*, 14, R465-R466.

Cassier P., Brugerolle G., Combes C., Grain J. & Raibaut A. (1998). *Le parasitisme. Un équilibre dynamique*. Masson, Paris.

Chandrashekar R., Tsuji N., Morales T.H., Carmody A.B., Ozols V.O., Welton J. & Tang L. (2000). Removal of hydrogen peroxide by a 1-cysteine peroxiredoxin enzyme of the filarial parasite Dirofilaria immitis. *Parasitol Res*, 86, 200-6.

Chaudhuri J., Basu U., Zarrin A., Yan C., Franco S., Perlot T., Vuong B., Wang J., Phan R.T., Datta A., Manis J. & Alt F.W. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol*, 94, 157-214.

Chitsulo L., Loverde P. & Engels D. (2004). Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol*, 2, 12-3.

Chiumiento L. & Bruschi F. (2009). Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. *Parasitol Res*, 105, 593-603.

Chou K.-C. & Heinrikson R.L. (1997). Prediction of the Tertiary Structure of the Complement Control Protein Module. *Journal of Protein Chemistry*, 16, 765-773-773.

Chou P.H., Chang H.S., Chen I.T., Lin H.Y., Chen Y.M., Yang H.L. & Wang K.C. (2009). The putative invertebrate adaptive immune protein Litopenaeus vannamei Dscam (LvDscam) is the first reported Dscam to lack a transmembrane domain and cytoplasmic tail. *Dev Comp Immunol*, 33, 1258-67.

Christophides G.K., Zdobnov E., Barillas-Mury C., Birney E., Blandin S., Blass C., Brey P.T., Collins F.H., Danielli A., Dimopoulos G., Hetru C., Hoa N.T., Hoffmann J.A., Kanzok S.M., Letunic I., Levashina E.A., Loukeris T.G., Lycett G., Meister S., Michel K., Moita L.F., Muller H.M., Osta M.A., Paskewitz S.M., Reichhart J.M., Rzhetsky A., Troxler L., Vernick K.D., Vlachou D., Volz J., von Mering C., Xu J., Zheng L., Bork P. & Kafatos F.C. (2002). Immunity-related genes and gene families in Anopheles gambiae. *Science*, 298, 159-65.

Combes C. (1995). *Interactions durables. Ecologie et évolution du parasitisme*. Masson, Paris.

Combes C. (2000). Selective pressure in host-parasite systems. *J Soc Biol*, 194, 19-23.

Connors V.A., Lodes M.J. & Yoshino T.P. (1991). Identification of a *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory-secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58, 387-95.

Cooper M.D. & Alder M.N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124, 815-22.

Coustau C. (2009). [Immunity in parasite-vector snails]. *Med Sci (Paris)*, 25, 399-403.

Dam T.K. & Brewer C.F. (2010). Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology*, 20, 270-9.

DeJong R.J., Morgan J.A.T., Lobato Paraense W., Pointier J.-P., Amarista M., Ayeh-Kumi P.F.K., Babiker A., Barbosa C.S., Brémond P., Canese A.P., Pereira de Souza C., Dominguez C., File S., Gutierrez A., Incani R.N., Kawano T., Kazibwe F., Kpikpi J., Lwambo N.J.S., Mimpfoundi R., Njiokou F.P., J.N., Sene M., Velásquez L.E., Yong M., Adema C.M., Hofkin B.V., Mkoji G.M. & Loker E.S. (2001). Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda : Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 2225–2239.

Depczynski M. & Bellwood D.R. (2005). Shortest recorded vertebrate lifespan found in a coral reef fish. *Curr Biol*, 15, R288-9.

Dheilly N.M., Nair S.V., Smith L.C. & Raftos D.A. (2009). Highly variable immune-response proteins (185/333) from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: proteomic analysis identifies diversity within and between individuals. *J Immunol*, 182, 2203-12.

Di Noia J.M. & Neuberger M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem*, 76, 1-22.

Dishaw L.J., Mueller M.G., Gwatney N., Cannon J.P., Haire R.N., Litman R.T., Amemiya C.T., Ota T., Rowen L., Glusman G. & Litman G.W. (2008). Genomic complexity of the variable region-containing chitin-binding proteins in amphioxus. *BMC Genet*, 9, 78.

Dishaw L.J., Ota T., Mueller M.G., Cannon J.P., Haire R.N., Gwatney N.R., Litman R.T. & Litman G.W. (2010). The basis for haplotype complexity in VCBPs, an immune-type receptor in amphioxus. *Immunogenetics*, 62, 623-31.

Dodds A.W. & Law S.K. (1998). The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and alpha 2-macroglobulin. *Immunol Rev*, 166, 15-26.

Dong Y., Taylor H.E. & Dimopoulos G. (2006). AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the Anopheles gambiae innate immune system. *PLoS Biol*, 4, e229.

Doxiadis G.G., van der Wiel M.K., Brok H.P., de Groot N.G., Otting N., t Hart B.A., van Rood J.J. & Bontrop R.E. (2006). Reactivation by exon shuffling of a conserved HLA-DR3-like pseudogene segment in a New World primate species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 5864-8.

Du Pasquier L. (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 129, 1-15.

Du Pasquier L. (2005). Meeting the demand for innate and adaptive immunities during evolution. *Scand J Immunol*, 62 Suppl 1, 39-48.

Du Pasquier L. (2006). Germline and somatic diversification of immune recognition elements in Metazoa. *Immunol Lett*, 104, 2-17.

Du Pasquier L. (2009). Diversification des immuno-récepteurs au cours de l'évolution des métazoaires. *Med Sci (Paris)*, 25, 273-80.

Dzik J.M. (2006). Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim Pol*, 53, 33-64.

Eckelt V.H., Liebau E., Walter R.D. & Henkle-Duhrsen K. (1998). Primary sequence and activity analyses of a catalase from Ascaris suum. *Mol Biochem Parasitol*, 95, 203-14.

Enghild J.J., Thogersen I.B., Salvesen G., Fey G.H., Figler N.L., Gonias S.L. & Pizzo S.V. (1990). Alpha-macroglobulin from Limulus polyphemus exhibits proteinase inhibitory activity and participates in a hemolytic system. *Biochemistry*, 29, 10070-80.

Fang F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol*, 2, 820-32.

Finstad J. & Good R.A. (1964). The Evolution of the Immune Response. 3. Immunologic Responses in the Lamprey. *J Exp Med*, 120, 1151-68.

Flajnik M.F. & Kasahara M. (2001). Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity*, 15, 351-62.

Flohe L., Budde H. & Hofmann B. (2003). Peroxiredoxins in antioxidant defense and redox regulation. *Biofactors*, 19, 3-10.

Fraiture M., Baxter R.H., Steinert S., Chelliah Y., Frolet C., Quispe-Tintaya W., Hoffmann J.A., Blandin S.A. & Levashina E.A. (2009). Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of Plasmodium. *Cell Host Microbe*, 5, 273-84.

Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 64, 97-112.

Fugmann S.D., Lee A.I., Shockett P.E., Villey I.J. & Schatz D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol*, 18, 495-527.

Gagneux S., DeRiemer K., Van T., Kato-Maeda M., de Jong B.C., Narayanan S., Nicol M., Niemann S., Kremer K., Gutierrez M.C., Hilty M., Hopewell P.C. & Small P.M. (2006). Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2869-73.

Gandon S. (2002). Local adaptation and the geometry of host–parasite coevolution. *Ecol. Lett.*, 5, 246-256.

Gasnier N., Rondelaud D., Abrous M., Carreras F., Boulard C., Diez-Banos P. & Cabaret J. (2000). Allopatric combination of Fasciola hepatica and Lymnaea truncatula is more efficient than sympatric ones. *Int J Parasitol*, 30, 573-8.

Gaudieri S., Dawkins R.L., Habara K., Kulski J.K. & Gojobori T. (2000). SNP profile within the human major histocompatibility complex reveals an extreme and interrupted level of nucleotide diversity. *Genome Res*, 10, 1579-86.

Gellert M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem*, 71, 101-32.

Goodall C.P., Bender R.C., Broderick E.J. & Bayne C.J. (2004). Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Molecular and biochemical parasitology*, 137, 321–328.

Goodall C.P., Bender R.C., Brooks J.K. & Bayne C.J. (2006). Biomphalaria glabrata cytosolic copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene: association of SOD1 alleles with resistance/susceptibility to Schistosoma mansoni. *Molecular and biochemical parasitology*, 147, 207-10.

Goodman M.F. (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, 71, 17-50.

Gourbal B.E.F., Guillou F., Mitta G., Sibille P., Thèron A., Pointier J.-P. & Coustau C. (2008). Excretory-secretory products of larval Fasciola hepatica investigated using a two-dimensional proteomic approach. *Molecular and biochemical parasitology*, 161, 63-66.

Green D.M., Kraaijeveld A.R. & Godfray H.C. (2000a). Evolutionary interactions between Drosophila melanogaster and its parasitoid Asobara tabida. *Heredity*, 85 Pt 5, 450-8.

Green D.M., Kraaijeveld A.R. & Godfray H.C. (2000b). Evolutionary interactions between *Drosophila melanogaster* and its parasitoid *Asobara tabida*. *Heredity*, 85 450-458.

Guillou F., Roger E., Mone Y., Rognon A., Grunau C., Theron A., Mitta G., Coustau C. & Gourbal B.E. (2007). Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol Biochem Parasitol*.

Guo P., Hirano M., Herrin B.R., Li J., Yu C., Sadlonova A. & Cooper M.D. (2009). Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature*, 459, 796-801.

Hagen M., Filosa M.F. & Youson J.H. (1985). The immune response in adult sea lamprey (Petromyzon marinus L.): the effect of temperature. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 82, 207-10.

Hahn U.K., Bender R.C. & Bayne C.J. (2000). Production of reactive oxygen species by hemocytes of Biomphalaria glabrata: carbohydrate-specific stimulation. *Dev Comp Immunol*, 24, 531-41.

Hahn U.K., Bender R.C. & Bayne C.J. (2001a). Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 87, 778-85.

Hahn U.K., Bender R.C. & Bayne C.J. (2001b). Killing of Schistosoma mansoni sporocysts by hemocytes from resistant Biomphalaria glabrata: role of reactive oxygen species. *The Journal of parasitology*, 87, 292-9.

Haldane J.B.S. (1949). Disease and evolution. *La Ricerca Scientifica Supplementa* 19, 68-76.

Hanington P.C., Forys M.A., Dragoo J.W., Zhang S.M., Adema C.M. & Loker E.S. (2010a). Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 21087-92.

Hanington P.C., Lun C.M., Adema C.M. & Loker E.S. (2010b). Time series analysis of the transcriptional responses of Biomphalaria glabrata throughout the course of

intramolluscan development of Schistosoma mansoni and Echinostoma paraensei. *International Journal for Parasitology*, 2010, 18.
Hanington P.C. & Zhang S.M. (2011). The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. *J Innate Immun*, 3, 17-27.
Hattori D., Demir E., Kim H.W., Viragh E., Zipursky S.L. & Dickson B.J. (2007). Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition. *Nature*, 449, 223-7.
Hauton C. & Smith V.J. (2007). Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. *Bioessays*, 29, 1138-46.
Hernandez Prada J.A., Haire R.N., Allaire M., Jakoncic J., Stojanoff V., Cannon J.P., Litman G.W. & Ostrov D.A. (2006). Ancient evolutionary origin of diversified variable regions demonstrated by crystal structures of an immune-type receptor in amphioxus. *Nat Immunol*, 7, 875-82.
Herrin B.R. & Cooper M.D. (2010). Alternative adaptive immunity in jawless vertebrates. *J Immunol*, 185, 1367-74.
Hertel L.A., Adema C.M. & Loker E.S. (2005). Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 29, 295–303.
Hertel L.A., Stricker S.A., Monroy F.P., Wilson W.D. & Loker E.S. (1994). *Biomphalaria glabrata* hemolymph lectins: binding to bacteria, mammalian erythrocytes, and to sporocysts and rediae of *Echinostoma paraensei*. *J Invertebr Pathol*, 64, 52-61.
Hicks S.J., Theodoropoulos G., Carrington S.D. & Corfield A.P. (2000). The role of mucins in host-parasite interactions. Part I-protozoan parasites. *Parasitology today*, 16, 476-81.
Hofmann B., Hecht H.J. & Flohe L. (2002). Peroxiredoxins. *Biol Chem*, 383, 347-64.
Honjo T., Kinoshita K. & Muramatsu M. (2002). Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol*, 20, 165-96.
Horak P. & van der Knaap W.P.W. (1997). Lectins in snail-trematode immune interactions: a review. *Folia Parasitologica*, 44, 161-172.
Howard J.C. (1991). Immunology. Disease and evolution. *Nature*, 352, 565-7.
Jackson K.J., Gaeta B., Sewell W. & Collins A.M. (2004). Exonuclease activity and P nucleotide addition in the generation of the expressed immunoglobulin repertoire. *BMC Immunol*, 5, 19.
James L.C., Roversi P. & Tawfik D.S. (2003). Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science*, 299, 1362-7.
Janeway C., Travers P., Walport M. & Shlomchick M. (2001). *Immunobiology, 5th edition*. Garland science, New-York.
Kelley J., Walter L. & Trowsdale J. (2005). Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics*, 56, 683-95.
Kim S.M. & Kang J.H. (1997). Peroxidative activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase. *Mol Cells*, 7, 120-4.
Knight K.L. & Barrington R.A. (1998). Somatic diversification of IgH genes in rabbit. *Immunological Reviews*, 162, 37-47.
Kopacek P., Weise C., Saravanan T., Vitova K. & Grubhoffer L. (2000). Characterization of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick Ornithodoros moubata. *Eur J Biochem*, 267, 465-75.
Koskella B. & Lively C.M. (2007). Advice of the rose: experimental coevolution of a trematode parasite and its snail host. *Evolution; international journal of organic evolution*, 61, 152-159.

Kotze A.C. & McClure S.J. (2001). Haemonchus contortus utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide in vitro. *Int J Parasitol*, 31, 1563-71.

Kurtz J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol*, 26, 186-92.

Kurtz J. & Armitage S.A. (2006). Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol*, 27, 493-6.

Kurtz J. & Franz K. (2003). Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425, 37-8.

Lambrechts L., Fellous S. & Koella J.C. (2006). Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol*, 22, 12-6.

Lefranc M.P. (2001). *Nomenclature of the Human T Cell Receptor Genes*. John Wiley & Sons, Inc.

Léonard P.M., Adema C.M., Zhang S.-M. & Loker E.S. (2001). Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Gene*, 269, 155-165.

Levashina E.A., Blandin S., Moita L.F., Vriend G., Lagueux M. & Kafatos F.C. (2003). Thioester-containing proteins of protostomes. In: *Infectious disease: Innate Immunity* (eds. Ezekowitz RAB & Hoffmann JA). Humana Press Inc. Totowa, pp. 155-173.

Levashina E.A., Moita L.F., Blandin S., Vriend G., Lagueux M. & Kafatos F.C. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, 104, 709-18.

Liebau E., Wildenburg G., Brophy P.M., Walter R.D. & Henkle-Dührsen K. (1996). Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from Onchocerca volvulus. *Molecular and biochemical parasitology*, 80, 27-39.

Liebau E., Wildenburg G., Walter R.D. & Henkle-Duhrsen K. (1994). A novel type of glutathione S-transferase in Onchocerca volvulus. *Infect Immun*, 62, 4762-7.

Liochev S.I. & Fridovich I. (2010). Mechanism of the peroxidase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med*, 48, 1565-9.

Litman G.W., Cannon J.P. & Dishaw L.J. (2005). Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol*, 5, 866-79.

Litman G.W., Finstad F.J., Howell J., Pollara B.W. & God R.A. (1970). The evolution of the immune response. 3. Structural studies of the lamprey immuoglobulin. *J Immunol*, 105, 1278-85.

Little T.J., Hultmark D. & Read A.F. (2005). Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat Immunol*, 6, 651-4.

Little T.J., Watt K. & Ebert D. (2006a). Parasite-host specificity: experimental studies on the basis of parasite adaptation. *Evolution*, 60, 31-8.

Little T.J., Watt K. & Ebert D. (2006b). Parasite-host specificity: experimental studies on the basis of parasite adaptation. *Evolution; international journal of organic evolution*, 60, 31-38.

Lively C.M. (2001). Trematode infection and the distribution and dynamics of parthenogenetic snail populations. *Parasitology*, 123 Suppl, S19-26.

Lockyer A.E., Jones C.S., Noble L.R. & Rollinson D. (2004). Trematodes and snails: an intimate association. *Canadian Journal of Zoology*, 82, 251–269.

Lockyer A.E., Olson P.D., Ostergaard P., Rollinson D., Johnston D.A., Attwood S.W., Southgate V.R., Horak P., Snyder S.D., Le T.H., Agatsuma T., McManus D.P., Carmichael A.C., Naem S. & Littlewood D.T. (2003). The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of Schistosoma Weinland, 1858. *Parasitology*, 126, 203-24.

Loker E.S., Adema C.M., Zhang S.M. & Kepler T.B. (2004). Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, 198, 10-24.

Lopez-Rubio J.J., Riviere L. & Scherf A. (2007). Shared epigenetic mechanisms control virulence factors in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol*, 10, 560-8.

Lu W., Egerton G.L., Bianco A.E. & Williams S.A. (1998). Thioredoxin peroxidase from Onchocerca volvulus: a major hydrogen peroxide detoxifying enzyme in filarial parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 91, 221-35.

Mackinnon M.J. & Read A.F. (2004). Immunity promotes virulence evolution in a malaria model. *PLoS Biol*, 2, E230.

Maizels R.M. (2009). Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system. *J Biol*, 8, 62.

Marchalonis J.J. & Edelman G.M. (1968). Phylogenetic origins of antibody structure. 3. Antibodies in the primary immune response of the sea lamprey, Petromyzon marinus. *J Exp Med*, 127, 891-914.

Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Fernandez-Vina M., Geraghty D.E., Holdsworth R., Hurley C.K., Lau M., Lee K.W., Mach B., Maiers M., Mayr W.R., Muller C.R., Parham P., Petersdorf E.W., Sasazuki T., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.I., Tiercy J.M. & Trowsdale J. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, 75, 291-455.

Maul R.W., Gearhart P.J. & Frederick W.A. (2010). AID and Somatic Hypermutation. In: *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 159-191.

May R.M. & Anderson R.M. (1983). Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*, 219, 281-313.

Mayer W.E., O'Huigin C., Tichy H., Terzic J. & Saraga-Babic M. (2002a). Identification of two Ikaros-like transcription factors in lamprey. *Scand J Immunol*, 55, 162-70.

Mayer W.E., Uinuk-Ool T., Tichy H., Gartland L.A., Klein J. & Cooper M.D. (2002b). Isolation and characterization of lymphocyte-like cells from a lamprey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14350-5.

McGonigle S., Curley G.P. & Dalton J.P. (1997). Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite Fasciola hepatica. *Parasitology*, 115 (Pt 1), 101-4.

Medzhitov R. & Janeway C.A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91, 295-8.

Monroy F.P. & Loker E.S. (1993). Production of heterogeneous carbohydrate-binding proteins by the host snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*, 79, 416-23.

Morgan J.A., Dejong R.J., Adeoye G.O., Ansa E.D., Barbosa C.S., Bremond P., Cesari I.M., Charbonnel N., Correa L.R., Coulibaly G., D'Andrea P.S., De Souza C.P., Doenhoff M.J., File S., Idris M.A., Incani R.N., Jarne P., Karanja D.M., Kazibwe F., Kpikpi J., Lwambo N.J., Mabaye A., Magalhaes L.A., Makundi A., Mone H., Mouahid G., Muchemi G.M., Mungai B.N., Sene M., Southgate V., Tchuente L.A., Theron A., Yousif F., Zanotti-Magalhaes E.M., Mkoji G.M. & Loker E.S. (2005). Origin and diversification of the human parasite Schistosoma mansoni. *Mol Ecol*, 14, 3889-902.

Morgan J.A., DeJong R.J., Jung Y., Khallaayoune K., Kock S., Mkoji G.M. & Loker E.S. (2002). A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of Schistosoma parasites. *Mol Phylogenet Evol*, 25, 477-88.

Morgan J.A., Dejong R.J., Snyder S.D., Mkoji G.M. & Loker E.S. (2001). *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology*, 123 Suppl, S211-28.

Mourao M.d.M., Dinguirard N., Franco G.R. & Yoshino T.P. (2009). Role of the Endogenous Antioxidant System in the Protection of *Schistosoma mansoni* Primary Sporocysts against Exogenous Oxidative Stress. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, e550.

Muller S. (2004). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*, 53, 1291-305.

Munoz-Antoli C., Marin A., Trelis M., Toledo R. & Esteban J.G. (2010). Sympatric and allopatric experimental infections of the planorbid snail Gyraulus chinensis with miracidia of Euparyphium albuferensis (Trematoda: Echinostomatidae). *J Helminthol*, 1-5.

Nagawa F., Kishishita N., Shimizu K., Hirose S., Miyoshi M., Nezu J., Nishimura T., Nishizumi H., Takahashi Y., Hashimoto S., Takeuchi M., Miyajima A., Takemori T., Otsuka A.J. & Sakano H. (2007). Antigen-receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice. *Nat Immunol*, 8, 206-13.

Nair S.V., Del Valle H., Gross P.S., Terwilliger D.P. & Smith L.C. (2005). Macroarray analysis of coelomocyte gene expression in response to LPS in the sea urchin. Identification of unexpected immune diversity in an invertebrate. *Physiol Genomics*, 22, 33-47.

Nappi A., Poirie M. & Carton Y. (2009). The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of Drosophila against parasitic wasps. *Adv Parasitol*, 70, 99-121.

Nappi A.J. & Ottaviani E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*, 22, 469-480.

Nei M. & Rooney A.P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet*, 39, 121-52.

Ou X., Thomas G.R., Chacon M.R., Tang L. & Selkirk M.E. (1995). Brugia malayi: differential susceptibility to and metabolism of hydrogen peroxide in adults and microfilariae. *Exp Parasitol*, 80, 530-40.

Pan S.C. (1996). *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 49, 129-49.

Pancer Z. (2000). Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13156-61.

Pancer Z., Amemiya C.T., Ehrhardt G.R., Ceitlin J., Gartland G.L. & Cooper M.D. (2004). Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*, 430, 174-80.

Pancer Z., Rast J.P. & Davidson E.H. (1999). Origins of immunity: transcription factors and homologues of effector genes of the vertebrate immune system expressed in sea urchin coelomocytes. *Immunogenetics*, 49, 773-86.

Parham P., Lomen C.E., Lawlor D.A., Ways J.P., Holmes N., Coppin H.L., Salter R.D., Wan A.M. & Ennis P.D. (1988). Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 4005-4009.

Pham L.N., Dionne M.S., Shirasu-Hiza M. & Schneider D.S. (2007). A specific primed immune response in Drosophila is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog*, 3, e26.

Povelones M., Waterhouse R.M., Kafatos F.C. & Christophides G.K. (2009). Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against Plasmodium parasites. *Science*, 324, 258-61.

Powell E.N. & Cummins H. (1985). Are molluscan maximum life spans determined by long-term cycles in benthic communities? . *Oecologia*, 67, 177-182.

Price P.W. (1980). Evolutionary biology of parasites. *Monogr Popul Biol*, 15, 1-237.

Reynaud C.A., Bertocci B., Dahan A. & Weill J.C. (1994). Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. *Adv Immunol*, 57, 353-78.

Robinson J., Waller M.J., Parham P., de Groot N., Bontrop R., Kennedy L.J., Stoehr P. & Marsh S.G. (2003). IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res*, 31, 311-4.

Roger E., Gourbal B., Grunau C., Pierce R.J., Galinier R. & Mitta G. (2008a). Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology*, 157, 217-27.

Roger E., Grunau C., Pierce R.J., Hirai H., Gourbal B., Galinier R., Emans R., Cesari I.M., Cosseau C. & Mitta G. (2008b). Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Neglected Tropical Disease*, 2, e330.

Roger E., Mitta G., Moné Y., Bouchut A., Rognon A., Grunau C., Boissier J., Theron A. & Gourbal B.E. (2008c). Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Molecular and biochemical parasitology*, 157, 205-16.

Rogozin I.B., Iyer L.M., Liang L., Glazko G.V., Liston V.G., Pavlov Y.I., Aravind L. & Pancer Z. (2007). Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat Immunol*, 8, 647-56.

Rolff J. & Siva-Jothy M.T. (2003). Invertebrate ecological immunology. *Science*, 301, 472-5.

Rouhier N., Gelhaye E., Sautiere P.E., Brun A., Laurent P., Tagu D., Gerard J., de Fay E., Meyer Y. & Jacquot J.P. (2001). Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol*, 127, 1299-309.

Ruoslahti E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 697-715.

Sadd B.M. & Schmid-Hempel P. (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol*, 16, 1206-10.

Saha N.R., Smith J. & Amemiya C.T. (2010). Evolution of adaptive immune recognition in jawless vertebrates. *Semin Immunol*, 22, 25-33.

Sakamoto K., Chao W.S., Katsube K.-i. & Yamaguchi A. (2005). Distinct roles of EGF repeats for the Notch signaling system. *Experimental Cell Research*, 302, 281-291.

Salathe M., Kouyos R.D. & Bonhoeffer S. (2008). The state of affairs in the kingdom of the Red Queen. *Trends Ecol Evol*, 23, 439-45.

Salathe M., Kouyos R.D. & Bonhoeffer S. (2009). On the causes of selection for recombination underlying the red queen hypothesis. *American Naturalist*, 174 Suppl 1, S31-42.

Salazar-Calderón M., Martín-Alonso J.M., Ruiz de Eguino A.D., Casais R., Marín M.S. & Parra F. (2000). Fasciola hepatica: Heterologous Expression and Functional Characterization of a Thioredoxin Peroxidase. *Experimental Parasitology*, 95, 63-70.

Sanchez J.F., Lescar J., Chazalet V., Audfray A., Gagnon J., Alvarez R., Breton C., Imberty A. & Mitchell E.P. (2006). Biochemical and structural analysis of Helix pomatia agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J Biol Chem*, 281, 20171-80.

Sapp K.K. & Loker E.S. (2000). A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. *Journal of Parasitology*, 86, 1020-9.

Sayed A.A., Cook S.K. & Williams D.L. (2006). Redox balance mechanisms in Schistosoma mansoni rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. *J Biol Chem*, 281, 17001-10.

Sayed A.A. & Williams D.L. (2004). Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from Schistosoma mansoni. *J Biol Chem*, 279, 26159-66.

Schmid-Hempel P. & Ebert D. (2003). On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 27-32.

Schmucker D., Clemens J.C., Shu H., Worby C.A., Xiao J., Muda M., Dixon J.E. & Zipursky S.L. (2000). Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, 101, 671-84.

Schulenburg H., Boehnisch C. & Michiels N.K. (2007). How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol Immunol*, 44, 3338-44.

Schulte R.D., Makus C., Hasert B., Michiels N.K. & Schulenburg H. (2010). Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 7359-7364.

Selkirk M.E., Smith V.P., Thomas G.R. & Gounaris K. (1998). Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *Int J Parasitol*, 28, 1315-32.

Sharon N. (2008). Lectins: past, present and future. *Biochem Soc Trans*, 36, 1457-60.

Shintani S., Terzic J., Sato A., Saraga-Babic M., O'HUigin C., Tichy H. & Klein J. (2000). Do lampreys have lymphocytes? The Spi evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7417-22.

Sire C., Rognon A. & Théron A. (1998). Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails : acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism ? *Parasitology*, 117, 117-122.

Sorci G. & Faivre B. (2009). Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 71-83.

Spycher S.E., Arya S., Isenman D.E. & Painter R.H. (1987). A functional, thioester-containing alpha 2-macroglobulin homologue isolated from the hemolymph of the American lobster (Homarus americanus). *J Biol Chem*, 262, 14606-11.

Stroschein-Stevenson S.L., Foley E., O'Farrell P.H. & Johnson A.D. (2006). Identification of Drosophila gene products required for phagocytosis of Candida albicans. *PLoS Biol*, 4, e4.

Terwilliger D.P., Buckley K.M., Brockton V., Ritter N.J. & Smith L.C. (2007). Distinctive expression patterns of 185/333 genes in the purple sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus: an unexpectedly diverse family of transcripts in response to LPS, beta-1,3-glucan, and dsRNA. *BMC Mol Biol*, 8, 16.

Terwilliger D.P., Buckley K.M., Mehta D., Moorjani P.G. & Smith L.C. (2006). Unexpected diversity displayed in cDNAs expressed by the immune cells of the purple sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus. *Physiol Genomics*, 26, 134-44.

Theodoropoulos G., Hicks S.J., Corfield A.P., Miller B.G. & Carrington S.D. (2001). The role of mucins in host-parasite interactions: Part II - helminth parasites. *Trends in parasitology*, 17, 130-5.

Théron A. (2005). Les schistosomes et leurs hôtes : apport des marqueurs moléculaires à la connaissance de leur phylogéographie, épidémiologie et écologie. *Bull Soc Zool Fr*, 130, 205-218.

Théron A. & Coustau C. (2005). Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *Journal of Helminthology*, 79, 187-91.

Thogersen I.B., Salvesen G., Brucato F.H., Pizzo S.V. & Enghild J.J. (1992). Purification and characterization of an alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the mollusc Octopus vulgaris. *Biochem J*, 285 (Pt 2), 521-7.

Torres-Rivera A. & Landa A. (2008). Glutathione transferases from parasites: A biochemical view. *Acta Tropica*, 105, 99-112.

Trowsdale J. (2001). Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*, 15, 363-74.

Trowsdale J. & Parham P. (2004). Mini-review: defense strategies and immunity-related genes. *Eur J Immunol*, 34, 7-17.

Tsuji N., Kasuga-Aoki H., Isobe T. & Yoshihara S. (2000). Cloning and characterisation of a peroxiredoxin from the swine roundworm Ascaris suum. *International Journal for Parasitology*, 30, 125-128.

Van Der Knaap W.P.W. & Loker E.S. (1990). Immune mechanisms in trematod-snail interactions. *Parasitology Today*, 6, 175-182.

Van Valen L. (1974). Molecular evolution as predicted by natural selection. *J. Mol. Evol.*, 3, 89-101.

Vermeire J.J. & Yoshino T.P. (2007). Antioxidant gene expression and function in in vitro-developing Schistosoma mansoni mother sporocysts: possible role in self-protection. *Parasitology*, 134, 1369-78.

Watson F.L., Puttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D.L., Hughes M., Kondo M., Rebel V.I. & Schmucker D. (2005). Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, 309, 1874-8.

Weill J.-C., Weller S. & Reynaud C.-A. (2004). A bird's eye view on human B cells. *Seminars in Immunology*, 16, 277-281.

Whittaker C.A. & Hynes R.O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*, 13, 3369-87.

Wu X.J., Sabat G., Brown J.F., Zhang M., Taft A., Peterson N., Harms A. & Yoshino T.P. (2009). Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Mol Biochem Parasitol*, 164, 32-44.

Yamakawa K., Huot Y.K., Haendelt M.A., Hubert R., Chen X.N., Lyons G.E. & Korenberg J.R. (1998). DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum Mol Genet*, 7, 227-37.

Yoshino T.P., Coustau C., Modat S. & Castillo M.G. (1999). The *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) molluscan cell line : establishment of an *in vitro* cellular model for the study of snail host-parasite interactions. *Malacologia*, 41, 331-343.

Yoshino T.P., Dinguirard N., Kunert J. & Hokke C.H. (2008). Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail Biomphalaria glabrata, intermediate host of the human blood fluke Schistosoma mansoni. *Gene*, 411, 46-58.

Zelck U.E. & Von Janowsky B. (2004). Antioxidant enzymes in intramolluscan *Schistosoma mansoni* and ROS-induced changes in expression. *Parasitology*, 128, 493-501.

Zhang S.-M. & Loker E.S. (2004). Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Gene*, 341, 255–266.

Zhang S.M., Adema C.M., Kepler T.B. & Loker E.S. (2004). Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science*, 305, 251-4.

Zhang S.M., Leonard P.M., Adema C.M. & Loker E.S. (2001). Parasite-responsive IgSF members in the snail Biomphalaria glabrata: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics*, 53, 684-94.

Zhang S.M. & Loker E.S. (2003). The FREP gene family in the snail Biomphalaria glabrata: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. Fibrinogen-related proteins. *Developmental and Comparative Immunology*, 27, 175-87.

Zhang S.M., Yong Z. & Loker E.S. (2008). Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host Biomphalaria glabrata. *Innate Immun*, 14, 175-89.

ANNEXE 1

Publication

Guillou F, Roger E, Moné Y, Rognon A, Grunau C, Théron A, Mitta G, Coustau C, Gourbal BE. (2007). Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. Molecular and Biochemical Parasitology, 155(1), 45-56.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Molecular & Biochemical Parasitology 155 (2007) 45–56
MOLECULAR & BIOCHEMICAL PARASITOLOGY

Excretory–secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*

François Guillou [a,1], Emmanuel Roger [a,1], Yves Moné [a], Anne Rognon [a], Christoph Grunau [a], André Théron [a], Guillaume Mitta [a], Christine Coustau [b], Benjamin E.F. Gourbal [a,*]

[a] *Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5244, CNRS Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France*
[b] *U547 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille Cedex, France*

Received 7 March 2007; received in revised form 22 May 2007; accepted 22 May 2007
Available online 29 May 2007

Abstract

Schistosoma mansoni and *Echinostoma caproni* are two trematode species that use different strategies (mimicry and immunosuppression, respectively) to interfere with the snail innate immune system. Parasites excretory–secretory (ES) products have been shown to play a key role in these host–parasite immune interactions. However, they remain largely uncharacterized in larval trematodes. We developed a global proteomic approach to characterize the ES proteome of *S. mansoni* and *E. caproni* primary sporocysts. In ES products of both parasites, we found proteins involved in reactive oxygen species scavenging, glycolysis, signalling or calcium binding (superoxide dismutase Cu/Zn; glutathione *S*-transferase; aldo-keto-reductase; triose-phosphate isomerase; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; aldolase, enolase, MICAL-like, calreticulin). According to their predicted functions, we propose a model in which these proteins (i) are involved in antioxidant activity, (ii) prevent hemocyte encapsulation process or (iii) favor invasion and migration of sporocysts in host tissues. These results suggest that *S. mansoni* and *E. caproni* sporocysts develope a strong immune protection during the first hours of infection giving them enough time to build up a long lasting immune evasion strategy relying on molecular mimicry or immunosuppression, respectively.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; *Echinostoma caproni*; Sporocyst; *Biomphalaria glabrata*; Excretory–secretory proteome; Immune protection

1. Introduction

Digenetic trematodes have complex life cycles. At their adult stage, worms parasitize vertebrate definitive hosts, whereas larval stages (sporocysts and/or rediae) always develop in mollusk intermediate hosts. For each developmental stage, parasites need to penetrate into the host, develop, multiply sexually or asexually and finally propagate in the environment to complete their life cycle [1,2]. Parasites therefore face many challenges such as obtaining enough energy to maintain, grow and multiply, and being able to evade the internal defense system of the host [3–5].

The mollusk immune response is mediated by humoral and/or cell components [6,7]. The major effectors of immunity in mollusks are the circulating hemocytes. These phagocytic cells are able to distinguish non-self material and to encapsulate and eliminate invaders such as parasite sporocysts [3,8].

Schistosoma mansoni and *Echinostoma caproni* are two trematode parasites that infect the same intermediate host, the snail *Biomphalaria glabrata*. In order to evade the mollusks immune response, these trematode species use different strategies.

The evasion strategy of *S. mansoni* is not well understood. Some authors described the mimicry ability of *S. mansoni* based on antigenic similarities between parasite components and host tissues [9–12]. In contrast to *S. mansoni*, echinostomes interfere with the snail immune system in an immunosuppressive way [13–15]. Various studies showed that hemocytes exposed to echinostome ES products loose several defense functions such as adhesion, phagocytosis and encapsulation, as well as cytotoxic activity [16–20]. Moreover, in co-infection experiments,

* Corresponding author at: Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5244, CNRS, Biologie & Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France. Tel.: +33 4 68 66 20 50; fax: +33 4 68 66 22 81.
E-mail address: benjamin.gourbal@univ-perp.fr (B.E.F. Gourbal).
[1] The first two authors have participated in this work in the same substantive way and thus should be considered equally.

0166-6851/$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molbiopara.2007.05.009

the immune suppression activity of echinostome permits the survival of schistosomes in *Schistosoma*-resistant host strains [13].

The evasion strategies of trematodes are related to their ability to produce excretory/secretory products. These contain immuno-regulatory molecules that can interfere with host innate immunity [10,11]. While in the ES of adult worms a few molecules have been characterized that interact with the vertebrate host [3,18,20–23], until now less is known about the ES for invertebrate infection.

We undertook a two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry approach to (i) characterize the ES proteome of both parasites, (ii) gain insight into the molecular basis of the sporocysts immune evasive strategies during the first hour of interaction, and (iii) understand the molecular cross-talk between *S. mansoni* or *E. caproni* sporocysts and the snail host *B. glabrata*. Our data revealed for the first time that the ES products recovered during the first 24 h in culture contain families of molecules that have the same function in both parasites. These molecules are very likely to be involved in the immune protective strategy.

2. Materials and methods

2.1. Parasites excretory–secretory products

The parasite *E. caproni* originate from Egypt [24], and a Brazilian (Bra) strain of *S. mansoni* were maintained in Bg.Bra snails, mice (SWISS OF1 stock) and hamsters (*Mesocricetus auratus*) as described previously [20,25–27].

Miracidia from *S. mansoni* Bra were hatched from eggs axenically recovered from 50-day infected hamster livers [25]. Miracidia from *E. caproni* were recovered from eggs laid *in vitro* according to a previously described procedure [20]. For both parasites, after three washes in sterile pond water containing an antibiotic/antimycotic mixture (penicillin 100 units/ml, streptomycin 0.1 mg/ml, amphotericin 0.025 μg/ml; Sigma), miracidia were placed into 50 ml tissue-culture plates containing sterile Chernin's balanced salt solution (CBSS) [28] and the antibiotic/antimycotic mixture at 26 °C under atmospheric conditions. Full transformation of miracidia to primary (mother) sporocysts (Sp1) occurred within the first 24 h in culture [22]. After 24 h, the transformed sporocysts were spun down (600 × *g* for 5 min) in a 15 ml centrifuge tube to pellet the Sp1. The supernatant fraction containing the ES products was recovered and filtered through a 0.22 μm membrane. Both the ES products and the sporocyst pellets were kept at −80 °C until use.

2.2. Protein separation, detection and identification

ES products were precipitated using half volume of acetone containing 50% trichloroacetic acid and suspended in same volume of 2D lysis buffer (8 M urea, 40 mM Tris, 4% CHAPS, 60 mM DTT). ES products were recovered from 120,700 and 425,000 larvae for *S. mansoni* and *E. caproni*, respectively. ES products recovered from 120,700 sporocysts for each species were used for the proteomics analysis. For the first dimension, ES products were loaded on 17 cm Ready IPG Strips, pH 3–10 nonlinear gradient (Bio-Rad).

Total proteome extraction was realized using 10,000 Sp1 incubated during 2 h at room temperature in 2D lyses buffer. Cell lysate was centrifuged at 15,000 × *g* to pellet remaining cells and nuclear material. Protein concentration in the supernatant was assayed using the 2D Quant Kit (Amersham), 80 μg of protein were loaded on the first dimension, on 17 cm Ready Strips IPG Strips, pH 3–10 nonlinear gradient (Bio-Rad). Isoelectrofocusing (IEF) was performed as previously described [29] with IEF raising gradually until 8000 V and running until 90,000 Vh at 20 °C.

Proteins were separated in second dimension SDS-PAGE and proteins were visualized by Silver staining according to a method compatible with mass spectrometry analysis [30]. 2D gels were scanned using a densitometer (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad) and the pictures were analyzed using the PDQuest 7.4.0 software (Bio-Rad). Gel plugs containing the proteins of interest were excised from the gel, processed and characterized by nanoscale capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nanoLC–MS/MS) as described previously [29,31]. NanoLC-MS/MS analysis of the digested proteins was performed using a capillary LC system coupled to a LCQ Deca XP$^+$ Thermo-electron tandem mass spectrometer.

The mass data recorded during nanoLC–MS/MS analysis were processed and converted into "Merge". DTA peak lists format prior to searching with the search engine MASCOT (http://www.matrixscience.com/) against protein or nucleotide sequence databases, available through the National Centre for Biotechnology Information website (www.ncbi.nlm.nih.gov). One or two missed cleavages per peptide were allowed and some variable modifications were taken into account in the search such as carbamidomethylation of cystein, oxidation of methionine, histidine or tryptophan, and phosphorylation of serine, threonine or tyrosine. Searches were performed without constraining protein molecular weight or isoelectric point. In this study, we validated an identification when the protein was identified by at least two peptides with at least an overall MASCOT score greater than 50 ($p < 0.05$) [32].

2.3. Protein analysis

When possible, the sequence of the gene encoding the proteins of interest was identified by querying peptide amino acid sequences against database (GenBank dbEST of *S. mansoni* 162 506 sequences, of *E. caproni* 298 sequences) using the TBLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Sequences were imported in fasta format and were then assembled in contigs using the Sequencher^{TM} 4.5 software (Gene Codes Corporation). Consensus sequences were used to detect the open reading frame (ORF) and the possible isoforms of the corresponding protein.

Primary structure analysis and specific domain searches were performed using the ProtFun 2.2 and SecretomeP 2.0 programs (http://www.cbs.dtu.dk/services/). Expected molecular weights (M_W) and isoelectric points (p*I*) were calculated using

Table 1
Proteins identified in the ES proteome of *Schistosoma mansoni* primary sporocyst

Function	Spot #	Protein name	Species	Accession #[a]	M_W (kDa) (exp./obs.)[b]	p*I* (exp./obs.)[b]	Coverage (%)	Peptides #	Peptides sequence data	Mascot score
Glycolytic enzymes	12	Triose phosphate isomerase	*S. mansoni*	P48501	28/28	7.63/7.6	5	1	IIYGGSVTAANCK	78
	13	Triose phosphate isomerase	*S. mansoni*	P48501	28/28	7.63/8	27	4	GAFTGEISPAMIK IIYGGSVTAANCK NIFGESDELIAEK VVVAYEPVWAIGTGK	306
	14	Triose phosphate isomerase	*S. mansoni*	P48501	28/28	7.63/8.5	13	2	GAFTGEISPAMIK IIYGGSVTAANCK	152
	35	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	*S. mansoni*	P20287	36/38	8.16/8.6	7	2	AGISLNNNFVK, GAMQNIIPASTGAAK	43
	36	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	*S. mansoni*	P20287	36/38	8.16/9	7	3	AGISLNNNFVK, GAMQNIIPASTGAAK, GAMQNIIPASTGAAK[c]	74
Antioxidant enzymes	22	Superoxide dismutase Cu/Zn	*S. mansoni*	AAC14467	16/16	6.09/6.2	44	7	AVCVMTGTAGVK[d] AVCVMTGTAGVK[d,c] TMVIHENEDDLGR TMVIHENEDDLGR TMVIHENEDDLGR[c] FTQETDNGPVHVHAEFSGLK HVGDLGNVVAGADGNAVYNATDK	251
	23	Superoxide dismutase Cu/Zn	*S. mansoni*	AAC14467	16/16	6.09/6.3	44	7	AVCVMTGTAGVK[d] AVCVMTGTAGVK[d,c] TMVIHENEDDLGR TMVIHENEDDLGR TMVIHENEDDLGR[c] FTQETDNGPVHVHAEFSGLK HVGDLGNVVAGADGNAVYNATDK	252
	24	Superoxide dismutase Cu/Zn	*S. mansoni*	AAC14467	16/16.5	6.09/6.4	38	6	LACGVVGLAAE[d] AVCVMTGTAGVK[d] AVCVMTGTAGVK[d,c] TMVIHENEDDLGR TMVIHENEDDLGR[c] HVGDLGNVVAGADGNAVYNATDK	211
	33	Glutathione *S*-transferase	*S. japonicum*	AAA29888	25/25	7.68/8.2	4	2	LTQSMAIIR MFEDRLCHK	55
Calcium binding	11	Calreticulin	*S. mansoni*	Q06814	45/51	4.69/4.5	6	1	SPVDPIEDLGLK	55
Other functions	16	Similar to trematode hemoglobin	*S. japonicum*	AAP06216	−/22	−/7.8	4	2	IFQDSLPIFIK IFNNLIKDQQNK	50
	21	Histone H4	*S. mansoni*	AAG25601	−/17	−/6.1	24	2	DNIQGITKPAIR TVTAMDVVYALK[c]	105

[a] Accession number in Genbank database.
[b] Expected and observed molecular weight (M_W) and isoelectric point (p*I*) for each identification.
[c] Oxidation of methionine.
[d] Carbamidomethylation of cystein.

Table 2
Proteins identified in the ES proteome of *Echinostoma caproni* primary sporocyst

Function	Spot #	Protein name	Species	Accession #[a]	M_W (kDa) (exp./obs.)[b]	p*I* (exp./obs.)[b]	Coverage (%)	Peptides #	Peptides sequence data	Mascot score
Glycolytic enzymes	32	Triose phosphate isomerase	*E. michelini*	AAT06239	–/30	–/6.5	NA	1	IIYGGSVTAANCK[d]	53
	33	Triose phosphate isomerase	*E. michelini*	AAT06239	–/30	–/6.9	NA	1	IIYGGSVTAANCK[d]	82
	34	Triose phosphate isomerase	*O. turkestanicum*	AAZ57433	–/30	–/7.6	12	3	MSGSRK KFFVGGNWK IIYGGSVTAANCK[d]	141
	19	Aldolase	*S. japonicum*	AAX27354	–/41	–/8	NA	2	GILAADESTATMGK GILAADESTATMGK[c]	88
	20	Fbp aldolase	*S. mansoni*	AF026805	–/41	–/8.5	10	4	NIIPGIK VTEQVLAFVYK GILAADESTATMGK GILAADESTATMGK[c]	199
	21	Fbp-aldolase	*S. mansoni*	AF026805	–/41	–/9	10	3	NIIPGIK VTEQVLAFVYK GILAADESTATMGK[c]	117
	21	NADH dehydrogenase chain 5	*D. blaptoides*	BAA28956	–/41	–/9	NA	3	IIALSTLSQLGLMK[e] ALLFMCAGAIIHNLK[c] KIIALSTLSQLGLMK[e]	62
	71	Phosphoenol pyruvate hydratase	*F. hepatica*	A53665	–/46	–/6.3	16	5	YDLDFK GNPTVEVDVTTAK IQIVGDDLTVTNPLR SGETEDNFIADLVVGLR AAVPSGASTGVHEALELR	328
Antioxidant enzymes	60	Superoxide dismutase Cu/Zn	*F. hepatica*	AAD30361	–/17	–/5.9	10	2	AMVVHENEDDLGR AMVVHENEDDLGR[c]	52
	61	Superoxide dismutase Cu/Zn	*F. hepatica*	AAD30361	–/17	–/6.1	15	3	AMVVHENEDDLGR AMVVHENEDDLGR[c] AMVVHENEDDLGRGGHEQSK	123
	62	Superoxide dismutase Cu/Zn	*F. hepatica*	AAD30361	–/17	–/6.15	15	4	AMVVHENEDDLGR AMVVHENEDDLGR[c] AMVVHENEDDLGR[c] AMVVHENEDDLGRGGHEQSK	110
	63	Superoxide dismutase Cu/Zn	*F. hepatica*	AAD30361	–/17	–/6.2	15	4	AMVVHENEDDLGR AMVVHENEDDLGR[c] MVVHENEDDLGRGGHEQSK MVVHENEDDLGRGGHEQSK[c]	99 99
	23	Aldo-keto-reductase	*G. morsitans*	BX568329	–/35	–/6.15	NA	3	EDLFVTSK REDLFVTSK SIGLSNFNKR	148
Signalling molecule	39	MICAL-like	*A. gambiae*	EAL40681	–/28	–/9.3	NA	2	EKEEALITR TDSDKEKEEALITR	53
Other functions	15	Actin	*T. spiralis*	AAL84892	–/41	–/5.0	NA	2	GYSFTTTAER CPESLFQPSFLGMESCGIHE	54
	35	Actin 1	*L. oblica*	AAV91408	–/32	–/8.2	NA	5	DLTDYLMK GYSFTTTAER SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK KDLYANTVMSGGTTMYPGIADR	196
	51	Acetyl coA transferase	*A. fransciscana*	AAP68833	–/19	–/4.8	NA	3	EGLEK NVTVCHIHIEGK KVLPGKIVGSFCIGSK	51

Table 2 (*Continued*)

Function	Spot #	Protein name	Species	Accession #[a]	M_W (kDa) (exp./obs.)[b]	p*I* (exp./obs.)[b]	Coverage (%)	Peptides #	Peptides sequence data	Mascot score
	57	RNA recognition motif	*A. gambiae*	EAL41325	–/24	–/7.7	NA	2	MREHIQQIR KSVFRDILWSMK[e]	76
	58	Histone H1	*C. dorsalis*	AAA63154	–/18	–/5.8	11	2	AEKPKSDKPK[e] FVAAQYKVDVQK	54
	59	Ubiquinone cyt C chaperone	*S. japonicum*	AAW24871	–/17.5	–/6.1	7	2	MNLQMLR[c] NVIPLSTR[e]	55
	8	Hypothetical protein	*C. brigssae*	CBG23420	–/68	–/5.3	NA	2	KEGLKLK GKEATSDLK[e]	57
	13	Hypothetical protein	*C. brigssae*	CBG23411	–/55	–/4.6	NA	3	SSGSK[e] LKITELEIK[e] TYGGPGTSSSGR[e]	58
	1 + 1′	Hypothetical protein	*C. brigssae*	CBG23411	–/90	–/5.3	NA	2	LKITELEIK[e] RASHLEEYAMQRVR[e]	59

NA: not available.
[a] Accession number in Genbank database.
[b] Expected and observed molecular weight (M_W) and isoelectric point (p*I*) for each identification.
[c] Oxidation of methionine.
[d] Carbamidomethylation of cysteine.
[e] Phosphorylation of serine and/or threonine.

the Scansite program (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) (see Tables 1 and 2).

3. Results

3.1. Excretory–secretory proteome of S. mansoni and E. caproni primary sporocysts

In the proteomic approach developed in this study we compared the excretory–secretory (ES) proteome to the whole proteome profile of sporocysts (Sp1) for both parasites. To our knowledge, such a comparison of the ES proteome with the whole proteome electrophoresis profiles was never done. It is of particular importance to show the absence of contamination of the ES by non-secreted proteins like membrane or soluble proteins. In our study, most proteins of the Sp1 proteome were not present in the ES proteome, and proteins were strongly enriched in ES extracts (Fig. 1).

The most abundant spots of the ES proteome (25 and 71 for *S. mansoni* and *E. caproni*, respectively) were analyzed by nanoLC–MS/MS (Fig. 1C and F). After comparing the experimental peptide sequence tags to databases, we found identifications for 13 spots in *S. mansoni* and 23 for *E. caproni* (Tables 1 and 2). For both parasites, names of proteins identified in databases, species and Genbank accession numbers are shown in Tables 1 and 2. The number and sequence of identified peptides, the Mascot score and the coverage of the protein are also reported. When possible, the molecular weight (M_W) and the isoelectric point (p*I*) expected values were calculated using the Scansite program and these values were compared to the observed values on the gel.

As shown in Fig. 1 and Tables 1 and 2, SOD and TPI (for both parasites) and GAPDH (for *S. mansoni*) were present in more than one position in the gel. Shifts in p*I* or molecular weight values could be due to the presence of isoforms of the protein or to post-translational modifications. For *E. caproni*, the restricted number of GenBank dbEST sequences (298) did not allow to answer this question. For *S. mansoni* more than 160,000 EST sequences were available in GenBank and allowed further analysis. All *S. mansoni* express sequence tags (EST) corresponding to these proteins were imported and assembled separately using the Sequencher™ 4.5 software. For *S. mansoni* SOD, TPI and GAPDH, respectively, all imported EST formed a single contig and the deduced consensus sequence indicate that shifts in p*I* values observed are not related to the presence of isoforms. Thus, p*I* shifts are due to post-translational modifications (such as glycosylation) resulting in a basification of the three proteins (Fig. 1 and Table 1).

Among proteins identified for both parasites and listed in Tables 1 and 2, the first functional group corresponds to proteins involved in metabolism functions, mainly glycolysis. The second group corresponds to functions involved in defense pathways with proteins related to oxidative stress scavengers. For *S. mansoni* we found a third group of proteins involved in calcium binding. Finally, other groups, less abundant, were related to amino acid and mitochondrial metabolism, cell structure or are of unknown function.

3.1.1. S. mansoni excretory/secretory proteome

Among the identified proteins, several are particularly important in the context of host–parasite interactions. Glycolytic enzymes, antioxidant enzymes and calcium binding proteins (Table 1) are therefore described in more detail in the following paragraphs.

3.1.2. In the first group, two glycolytic enzymes were characterized in the ES proteome of S. mansoni

Triose phosphate isomerase (TPI) (spots 12–14) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (spots 35, 36) (Fig. 1C). TPI is encoded by a single copy gene [33]. This was confirmed by database analysis (ESTs and genome). The alignment of the protein ORF with TPIs from various other organisms permitted the identification of amino acids involved in the active site of the protein (data not shown). All TPI specific domains are present in the *S. mansoni* TPI [34]. The SecretomeP 2.0 analysis predicted the secretion of the TPI through non-classical pathways (NN-score > 0.5).

Regarding GAPDH (spots 35, 36) (Fig. 1C), alignment of the protein ORF with GAPDHs from various other organisms allowed us to identify amino acids involved in the catalytic domain, the cysteine 153 of the active site, and the domains associated with the binding of NAD^+ [35] (data not shown). SecretomeP 2.0 analysis did not find evidence of a signal peptide of secretion or the non-classical secretion of the GAPDH (NN-score < 0.5).

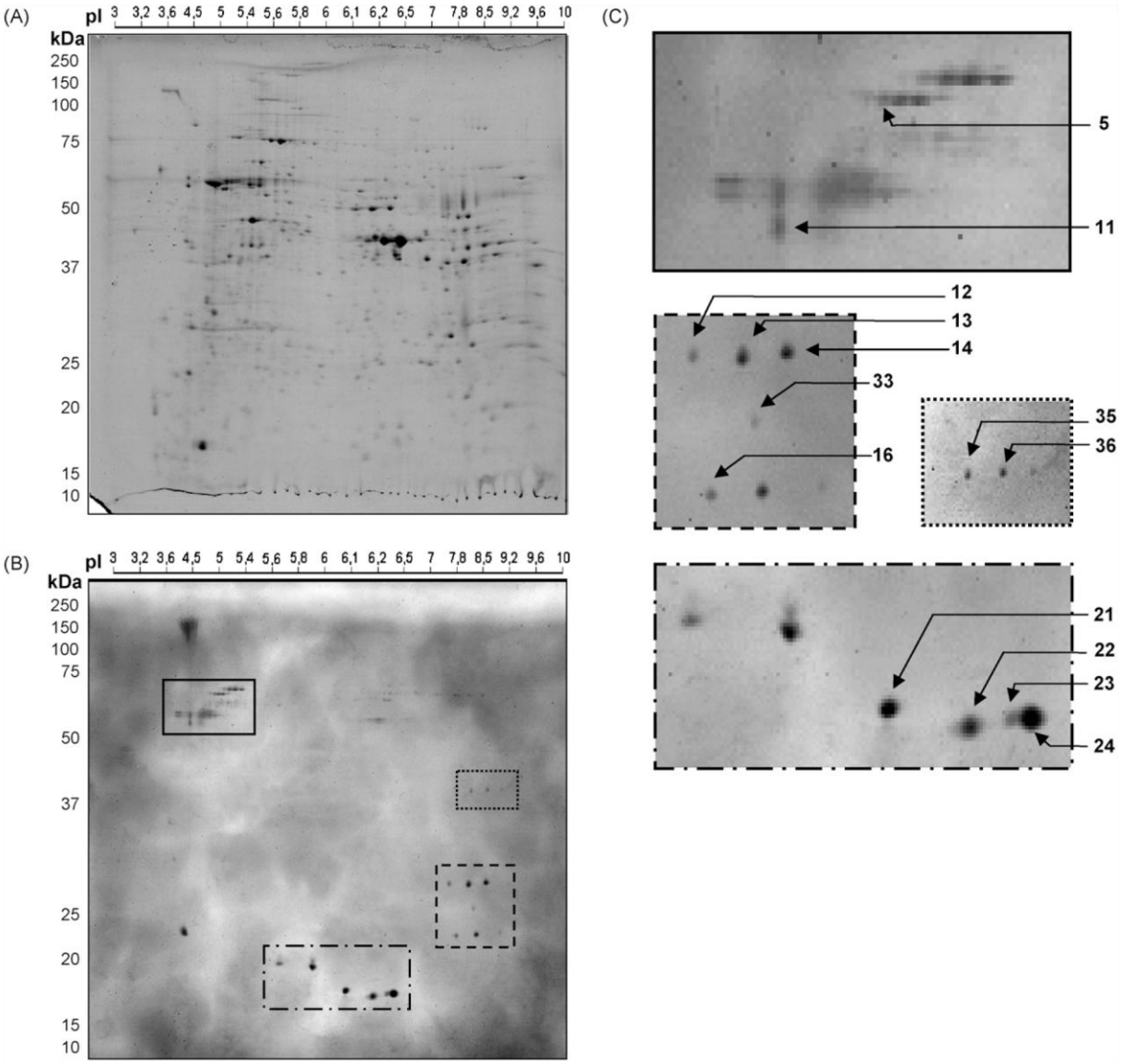


Fig. 1. Proteomic profiles of the total proteome (A) and excretory–secretory proteome (B) of *Schistosoma mansoni* primary sporocyst (C) high magnification of gel area showing the excretory–secretory proteome spots characterized by mass spectrometry (see Table 1). Proteomic profiles of the total proteome (D) and excretory–secretory proteome (E) of *Echinostoma caproni* primary sporocyst (F) high magnification of gel area showing the excretory–secretory proteome spots characterized by mass spectrometry (see Table 2). *x*-Axis is the isoelectric point scale (p*I*). *y*-Axis is the molecular weight scale in kDa. Proteins were focused using a 3–10 nonlinear pH range as the first dimension and a 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as the second dimension.

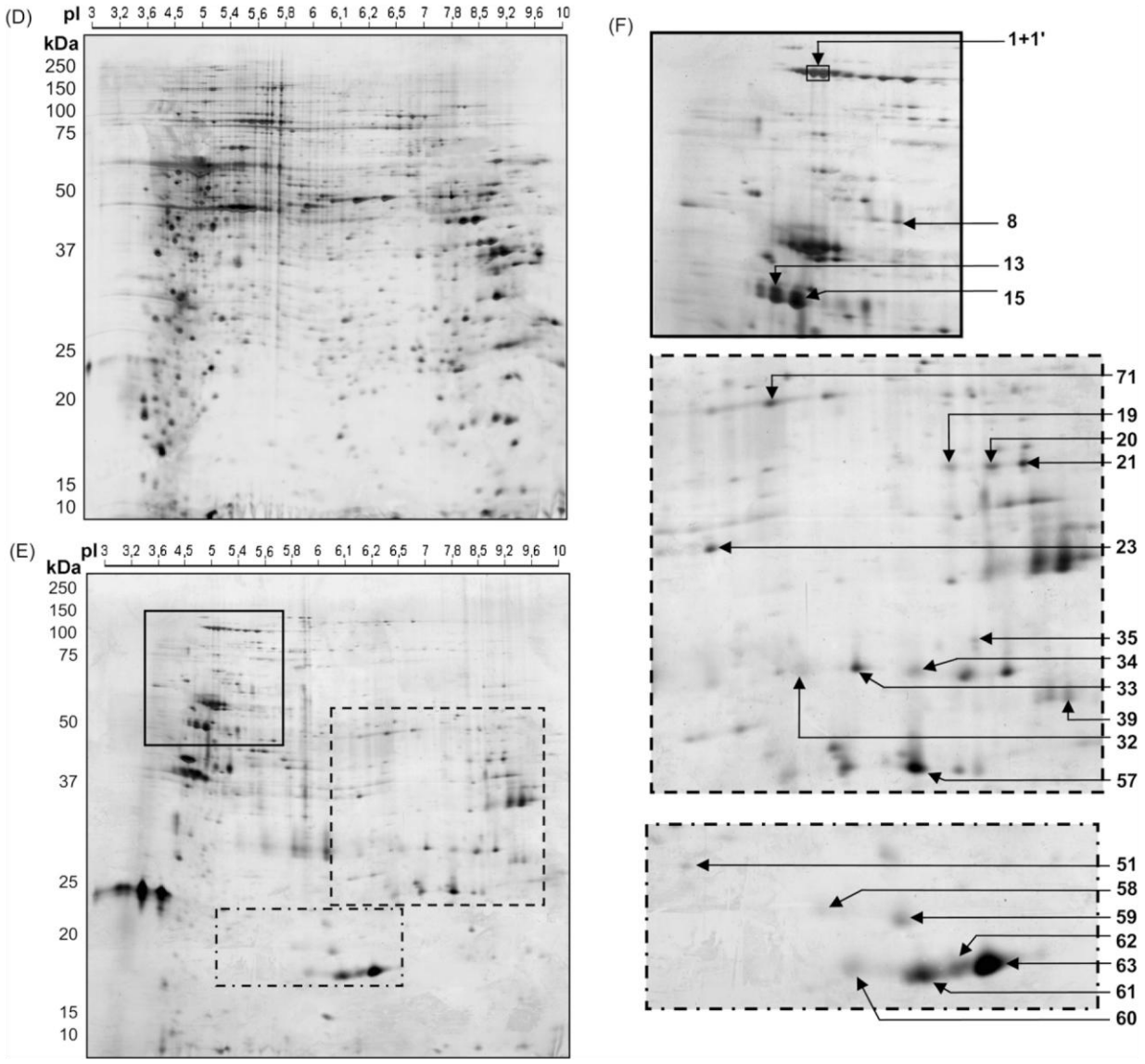


Fig. 1. (*Continued*).

TPI and GAPDH are two enzymes involved in two related steps of the Embden–Meyerhof–Parnas pathway. Dihydroxyacetone phosphate is converted to glyceraldehyde 3-phosphate by an isomerization catalyzed by TPI. In the subsequent reaction the glyceraldehyde 3-phosphate generates a high-potential phosphorylated compound, 1,3-bisphosphoglycerate. This compound is formed by the action of the GAPDH. The reaction produces NADH.

Superoxide dismutase Cu/Zn (SOD) (spots 22–24) and glutathione *S*-transferase (GST) (spot 33) (Fig. 1C) are involved in the detoxification of oxidative stress. Alignment of the SOD ORF with SODs from various other organisms allowed for the identification of amino acids involved in the active site of the protein (data not shown). Amino acids involved in the tertiary structure of the protein (C57, C146), in copper/zinc binding (H45, H47, H62, H70, H79, D82, H119) and in maintaining active site three-dimensional structure (G43, G60, P65, G81, G137, G140) [36] are present. The SecretomeP 2.0 analysis predicted the non-classical secretion of the SOD (NN-score > 0.5). Regarding GST (spot 33) (Fig. 1C), the calculated monoisotopic mass of 25 kDa and the expected p*I* of 7.68 were in good agreement with the position of the protein in the gel (Fig. 1B, Table 1). Alignment of the protein ORF with GSTs from various other organisms permitted identification of the amino acids involved in the glutathione binding (Y7, W8, W46, N59, L60) and the amino acids involved in the active site structure (Y7, G12) [37] (data not shown). The presence of a signal peptide of secretion or the non-classical secretion of the GST could not be predicted by SecretomeP 2.0 analysis (NN-score < 0.5). SOD and GST were both involved in oxidative stress scavenging and their specific actions will be described in the discussion of the paper.

Finally, one calreticulin (spot 11) (Fig. 1C) was characterized. The protein is involved in chaperoning and regulation of

Ca(2+) homoeostasis. Calreticulin affects more than 40 cellular functions [38]. Calreticulins are highly versatile lectin-like chaperones that participate in the synthesis of a variety of molecules including ion channels, surface receptors, integrins and transporters. The calreticulin identified here had a calculated monoisotopic mass of 45 kDa and an expected p*I* of 4.69. This is in good agreement with the position of the protein in the gel (Table 1). In order to obtain the complete coding sequence of the calreticulin encoding gene, all the *S. mansoni* ESTs corresponding to this protein were imported and assembled using the Sequencher^{TM} 4.5 software. All calreticulin specific domains [38] were present in this *S. mansoni* calreticulin [39,40]. The SecretomeP 2.0 analysis predicted the presence of a signal peptide of secretion. This is in agreement with our find that the parasite actively secretes a functional calreticulin.

3.1.3. E. caproni excretory/secretory proteome

Among the proteins identified in the ES proteome of *E. caproni* sporocysts, three groups of proteins have particularly attracted our attention. One is implicated in the glycolysis pathway, the second is implicated in the detoxification of oxidative stress and the third in a signaling pathway (Table 2).

The first group consists of three glycolytic enzymes that intervene in the Embden–Meyerhof–Parnas pathway.

(i) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) (spots 19–21) (Fig. 1F) catalyses the cleavage and generation of 3-carbon units from the 6-carbon sugar. This enzyme catalyzes the formation of glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate from fructose-1,6-bisphosphate. The glyceraldehyde 3-phosphate generated in this reaction can be metabolized in the following steps of the glycolytic pathway, but dihydroxyacetone phosphate cannot. To be available for reaction, dihydroxyacetone phosphate needs to be isomerized into glyceraldehyde 3-phosphate.
(ii) Triose-phosphate isomerase (TPI) (spots 32–34) (Fig. 1F) catalyzed this isomerization and follows the FBPA during glycolysis.
(iii) Enolase or phosphopyruvate hydratase (spot 71) (Fig. 1F) intervenes at the end of glycolysis to produce phosphoenol pyruvate from a dehydration of 2-phosphoglycerate. Solely a partial sequence of the enolase was known for *E. caproni*. To complete the partial sequences (Genbank accession numbers U85825 and AF274056), we characterized the complete nucleotide sequence of this protein by Race PCR on cDNA (Genbank accession number DQ869009). All domains and residues essential to the enzymatic activity were present in *E. caproni* enolase [41,42].

In the second group, we describe proteins implicated in the detoxification of oxidative stress:

(i) Superoxide dismutase Cu/Zn (SOD) (spots 60–63) (Fig. 1F) are considered as reactive oxygen species (ROS) detoxifing enzymes. They catalyze a reduction in hydrogen peroxide and molecular oxygen. Characterized for many helminthes, this enzyme is well known to be secreted by parasites [43].
(ii) Aldo-keto reductase (AKR) (spot 23) (Fig. 1F). The classification of the AKR superfamilly is based on a nonexclusive preference for a specific substrate [44]. The AKR identified here is more similar to AKR in the first family: aldose reductase NADPH dependant, catalyzing the reduction of carbonyls compounds (e.g., aldehyde, carbohydrates, polycyclic aromatic hydrocarbons). They are associated particularly with the detoxification of aldehydes compounds [45–47].

The third group includes MICAL-like protein (spot 39) (Fig. 1F), a signaling molecule involved in regulation of axon steering [48]. MICAL can have other activities not well described yet [49].

4. Discussion

Parasitic helminths are known to suppress or modulate the immune response of their vertebrate hosts [5,23,50]. But only recently excretory–secretory (ES) products of important helminths such as schistosomes or echinostomes have been investigated at the molecular level. These characterizations were done almost exclusively for the adult stages and were so far not fully investigated for the larval part of the life cycle of these parasites. ES products of *S. mansoni* cercariae were shown to play key roles in facilitating skin invasion and evading the early innate immune response [51]. ES products of adult schistosome worms were described to counteract host adaptive response [23,52]. Immune relevant molecules were also identified in ES products from adult *Echinostoma friedi* [53,54].

For the larval stage of the parasite, *in vitro* studies have shown immune activity in ES of trematoda sporocysts [15,16,20,22]. However, the minute size of sporocysts and the difficulty to collect larval ES products prevented earlier investigations of sporocysts proteome. Here we performed for the first time a proteomic analysis of sporocysts ES proteome. We used two species that are natural parasites of *B. glabrata*, which use different immune-evasion strategies. Intriguingly, two groups of proteins were widely represented in both ES proteomes: proteins involved in the detoxification of oxidative stress and enzymes implicated in the Embden–Meyerhof–Parnas pathway.

Several studies have shown that reactive oxygen species (ROS), like hydrogen peroxide, produced by hemocytes play a crucial role in the killing of parasites [6,8,55–57]. Parasite elimination capacity is directly correlated with capacity of ROS production [57]. Among these molecules, the most toxic form for sporocysts is hydrogen peroxide (H_2O_2), probably due to its capacity to cross cell membranes [8,58].

Trematodes are exposed to ROS throughout their life cycle. Oxidative stress scavengers were described in schistosomula and adult worms [59], and were found in the ES products of cercariae and adults of schistosomes and echinostomes [51–53]. In addition, a antioxidant activity of *S. mansoni* ES products has been reported [60]. These earlier observations and our experimental data fit well into a model in which the proteins characterized in this work function as antioxidants and protect sporocysts from oxidative damage.

The Cu-Zn SOD identified in ES proteome of *S. mansoni* and *E. caproni* catalyzes the dismutation of superoxide anion (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2) and O_2. H_2O_2 is the most toxic oxygen species for *S. mansoni* sporocysts [8]. Thus, the fact that the parasite enhances the production of H_2O_2 by the secretion of SOD was intriguing. But, in addition to the usual superoxide dismutation activity, Cu-Zn SOD has a peroxidative function that utilizes its own dismutation product, H_2O_2, as a substrate [61,62]. Experimental results have shown that, during these reactions, free radicals, such as the hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) are generated [61,63]. SOD can therefore represent the first line of cellular antioxidant defense of the parasite. Using its peroxidative function, SOD can inactivate H_2O_2 and produce $^{\bullet}OH$ that is less toxic for the sporocysts [8]. The second line of cellular defense involves the glutathione-*S*-transferase (GST), which detoxifies the membrane lipid peroxidation induced by the ROS like $^{\bullet}OH$. GST (identified in *S. mansoni* ES products) neutralizes cytotoxic by-products of lipid peroxidation arising from reactive oxygen species acting on cell membrane [64]. GST catalyses the reduction of lipid peroxidation by-products by the use of reduced glutathione (GSH) producing oxidized glutathione (GSSG) [65].

Moreover, this lipid peroxidation results in the formation of adehydes (4-*hydroxy*-2-*nonenal*; *malondialdehyde*) that cause protein modifications like carbonylation. Aldo-keto reductase (AKR) in ES products of *E. caproni* can be an efficient catalyst for reducing phospholipid aldehydes. AKR is an antioxidant enzyme that removes and detoxifies products of lipid peroxidation. The enzyme reduced phospholipids with acyl, alkyl, and alkenyl linkages at the *sn*-1 position and with different head groups at the *sn*-3 position, suggesting that it recognizes a broad range of phospholipids aldehydes [66].

The second group of ES proteins widely contains enzymes involved in the glycolysis pathway (triose phosphate isomerase (TPI), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), aldolase, enolase). These enzymes have already been identified in ES products from *S. mansoni* cercariae [51] and in ES from *S. bovis* adult worms [51,52]. GAPDH was identified in ES products from adult *E. friedi* [53] and enolase was identified in ES products from adult *Fasciola hepatica* [54]. This enzyme is also identified at the surface of fungal pathogen [67,68], filarial parasites [69] and mammals [70].

The presence of glycolytic enzymes in the extracellular environment of the parasite is surprising. One might argue that this could be a contamination of the ES products by cytosolic compounds. However, we carefully confirmed that this is not the case (see result section). In addition, glycolytic enzymes have interesting properties that are often overlooked. TPI and GAPDH are involved in two successive reactions of the glycolysis involving the reduction of a molecule of NAD+ to NADH. These results strongly support the view that these enzymes of glycolysis account for the synthesis of NADH that could be involved in the glutathione redox cycle [71]. The NADH generated can be used as a reducing agent to reduce oxidized glutathione (GSSG). GSSG accumulates due to the GST activity that catalyses the reduction of lipid peroxidation by the use of reduced glutathione (GSH) producing oxidized glutathione (GSSG) [65].

Glycolytic enzymes identified in ES proteome of *E. caproni* let us hypothesize that the production of pyruvate can be implicated in anti-oxidative processes. Indeed, for many parasites, glycolysis is involved in the struggle against oxidative stress [72,73]. Pyruvate can detoxify hydrogen peroxide (H_2O_2), when enzymes normally involved in this detoxification pathway are overwhelmed or absent [74–77]. This is done by pyruvate decarboxylation (a non-enzymatic reaction) in presence of ROS [78]. Thus, pyruvate seems to offer a good protection against oxidation [75,76,79,80].

Interestingly, enolase and GAPDH, two other glycolytic enzymes identified in the ES proteome of *E. caproni* and *S. mansoni*, were also described as being able to bind plasminogen and thus facilitate invasion and migration in host tissue [69,81,82].

Finally, two proteins identified in parasite ES proteome can be involved in parasite immune evasive strategies and particularly in inhibition of haemocytes adhesion and phagocytosis: MICAL-like and calreticulin.

First, MICAL-like identified in *E. caproni* ES proteome is a flavoprotein monooxygenase [48,49] that plays a key role in repulsive neuronal guidance [83]. ES products of *E. caproni* sporocysts were shown to cause the repulsion and the loss of haemocytes adhesion [55,20,84]. This activity can be related to the properties described for MICAL of drosophila. MICAL regulates axon steering through a local increase in the concentration of reactive oxygen species (ROS) and in particular hydrogen peroxide [85]. As we described herein it can thus be useful for the parasite to have ROS scavenging enzymes to protect himself against the potential indirect cytotoxic effect of MICAL through H_2O_2.

The second protein is the calreticulin (CRT) identified in the ES proteome of *S. mansoni* primary sporocysts. This protein is highly conserved and plays a role in many cellular functions [38]. CRT controls Ca^{2+} homeostasis [86,87]. The proline-rich and highly charged P-domain of CRT contains a high-affinity, low capacity Ca^{2+}-binding site and the negatively charged C-terminal domain contains a low affinity, high capacity Ca^{2+}-binding site. As cellular adhesion and spreading is calcium-dependant, we hypothesize that secretion of a protein that can modify the extracellular concentration of Ca^{2+} prevents the hemocytes encapsulation process [29,40]. It was recently reported that a parasitoid calreticulin inhibits hemocyte spreading behavior, thus preventing encapsulation of the developing parasitoid [88]. This highly conserved and multifunctional CRT has been identified and isolated from many parasites and contributes to various aspect of host–parasite interactions and the modulation of the host response by the parasite [39,40,88–90].

Our proteomic approach provides new insights into the understanding of *S. mansoni* and *E. caproni* sporocyst immune evasive strategy. Interestingly, most proteins evidenced here belong to the same families both in *S. mansoni* and *E. caproni*. In addition, these types of proteins have been demonstrated to be involved in immune evasion in other host–parasite systems interacting with invertebrate or vertebrate hosts [51–54,59,81,88]. This is the second main result of our study: the comparison of proteins involved in immune evasion in different systems suggests that

parasites use a limited and conserved set of molecules to protect themselves from, or to alter host immune responses.

Here, we identified, for the first time, proteins produced by the larval stage of *S. mansoni* or *E. caproni* that are likely to play a role in the molecular cross-talk with the host during the first hours following infection. The exact role and function of these proteins will be investigated in future studies, but their predicted function is informative about host–parasite interaction processes and allows for the establishment of a plausible hypothesis: after the miracidium penetrates its snail host during the first hours after infection, the ciliated epidermal plates detach and epidermal ridges start to expand forming a new tegument [91]. This young post-miracidium parasite is the most vulnerable stage of the intramolluscan parasite since it is devoid of a protective surface covering [91]. The new tegument is formed with the help of the increasing number of membrane-bound vesicles that attach to the outer membrane. They become part of the membrane of the newly formed tegument, releasing at the same time their contents (ES products) into the snail tissue [91,92]. During the first 24 h of culture, sporocysts release the greatest amount of ES proteins [92]. These ES products must therefore be involved in an early immunoprotective strategy that protects the parasite during his most vulnerable stage. Indeed, ES proteome of these two trematodes originated from the same number of sporocysts. However, more proteins were observed in *E. caproni* ES profile (Fig. 1). If both need immuno-protection during the first hour of infection, *E. caproni* did not develop secondarily a mimetic strategy. Thus he needs to use much more proteins than *S. mansoni* to counteract host innate immunity. Differences in immunobiological interactions with the host could perhaps explain spot number differences between the excretory–secretory proteomes of these two trematodes.

Trematode parasites may use different strategies, in a sequential manner, to realize their life cycle in their intermediate snail host. During the first 24 h of infection, sporocysts may develop an active strategy to protect themselves against haemocyte-mediated cytotoxicity. This permits the formation of the new tegument by the vulnerable post-miracidium stage. The formation of this protective membrane is a vital step for the parasite to secondarily develop a mimetic or immunosuppressive strategy according to the species, thus avoiding the recognition and elimination of the parasite for the rest of its intramolluscan cycle [9–11,15,16,19].

We propose a new model for the complex strategy of trematodes to survive in their intermediate host: (i) an early immunoprotection followed by (ii) a delayed active strategy. To our knowledge, the succession of these two different strategies has not been hypothesized so far in snail-trematode systems. Such a scenario is consistent with the results reported here but needs to be sustained by functional studies in the future.

Acknowledgments

The authors thank Michael S. Blouin for his valuable insights and constructive comments during the preparation of this paper. This work was supported by the CNRS. The mass spectrometry facility used in this study was funded by the European Community (FEDER), the Region Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, the Genopole of Lille and the University of Sciences and Technologies of Lille.

References

[1] Davies SJ, McKerrow JH. Developmental plasticity in schistosomes and other helminths. Int J Parasitol 2003;33:1277–84.
[2] Parker GA, Chubb JC, Ball MA, Roberts GN. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. Nature 2003;425:480–4.
[3] de Jong-Brink M, Bergamin-Sassen M, Solis Soto M. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. Parasitology 2001;123(Suppl):S129–41.
[4] Meuleman EA, Bayne CJ, van der Knaap WP. Immunological aspects of snail–trematode interactions. Prog Clin Biol Res 1987;233:113–27.
[5] van der Knaap WP, Loker ES. Immune mechanisms in trematode–snail interactions. Parasitol Today 1990;6:175–82.
[6] Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. Parasitology 2001; 123(Suppl):S159–67.
[7] Ataev GL, Coustau C. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. Dev Comp Immunol 1999;23:187–98.
[8] Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 2001;87:778–85.
[9] Abu-Shakra M, Buskila D, Shoenfeld Y. Molecular mimicry between host and pathogen: examples from parasites and implication. Immunol Lett 1999;67:147–52.
[10] Damian RT. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. Parasitology 1997;115(Suppl):S169–75.
[11] Salzet M, Capron A, Stefano GB. Molecular crosstalk in host–parasite relationships: schistosome– and leech–host interactions. Parasitol Today 2000;16:536–40.
[12] Daniel BE, Preston TM, Southgate VR. The in vitro transformation of the miracidium to the mother sporocyst of *Schistosoma margrebowiei*; changes in the parasite surface and implications for interactions with snail plasma factors. Parasitology 1992;104(Pt 1):41–9.
[13] Lie KJ, Heyneman D. Studies on resistance in snails: interference by nonirradiated echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. J Invertebr Pathol 1977;29:118–25.
[14] Lie KJ, Heyneman D. Acquired resistance to echinostomes in four *Biomphalaria glabrata* strains. Int J Parasitol 1979;9:533–7.
[15] Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D. Further characterization of acquired resistance in *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 1982;68:529–31.
[16] Loker ES, Bayne CJ, Yui MA. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol 1986;62:149–54.
[17] Noda S, Loker ES. Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. Parasitology 1989;98(Pt 1):35–41.
[18] Loker ES, Cimino DF, Hertel LA. Excretory–secretory products of *Echinostoma paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. J Parasitol 1992;78:104–15.
[19] Sapp KK, Loker ES. Mechanisms underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. J Parasitol 2000;86:1012–9.
[20] Humbert E, Coustau C. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata–Echinostoma caproni* system. Parasitology 2001;122:651–60.
[21] Loker ES, Adema CM. Schistosomes, Echinostomes and snails: comparative immunobiology. Parasitology today 1995;11:120–4.
[22] Coustau C, Mitta G, Dissous C, et al. *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni* excretory–secretory products differentially affect gene expression in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. Parasitology 2003;127:533–42.

[23] Loverde PT. Do antioxidants play a role in schistosome host–parasite interactions? Parasitol Today 1998;14:284–9.
[24] Jeyarasasingam U, Heyneman D, Lim HK, Mansour N. Life cycle of a new echinostome from Egypt, *E. liei* sp. nov. (Trematoda; Echinotomatidae). Parasitology 1972;65:203–22.
[25] Dissous C, Dissous C, Capron A. Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. Mol Biochem Parasitol 1981;3:215–25.
[26] Langand J, Jourdane J, Coustau C, Delay B, Morand S. Cost of resistance, expressed as a delayed maturity, detected in the host–parasite system *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni*. Heredity 1998;80:320–5.
[27] Trouvé S, Renaud F, Durand P, Jourdane J. Selfing and outcrossing in a parasitic hermaphrodite helminth (Trematoda, Echinostomatidae). Heredity 1996;77:1–8.
[28] Chernin E. Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus*. J Parasitol 1963;49:353–64.
[29] Vergote D, Bouchut A, Sautiere PE, et al. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. Int J Parasitol 2005;35:215–24.
[30] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem 1996;68:850–8.
[31] Bouchut A, Sautiere PE, Coustau C, Mitta G. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. Acta Trop 2006;98:234–46.
[32] Kayser JP, Vallet JL, Cerny RL. Defining parameters for homology-tolerant database searching. J Biomol Tech 2004;15:285–95.
[33] dos Reis MG, Davis RE, Singh H, Skelly PJ, Shoemaker CB. Characterization of the *Schistosoma mansoni* gene encoding the glycolytic enzyme, triosephosphate isomerase. Mol Biochem Parasitol 1993;59:235–42.
[34] Shoemaker C, Gross A, Gebremichael A, Harn D. cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triosephosphate isomerase. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:1842–6.
[35] Jenkins JL, Tanner JJ. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006;62:290–301.
[36] Cardoso RM, Silva CH, Ulian de Araujo AP, Tanaka T, Tanaka M, Garratt RC. Structure of the cytosolic Cu, Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2004;60:1569–78.
[37] Dirr H, Reinemer P, Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione *S*-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. Eur J Biochem 1994;220:645–61.
[38] Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. Biochem J 1999;344(Pt 2):281–92.
[39] Khalife J, Pierce RJ, Godin C, Capron A. Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin. Mol Biochem Parasitol 1993;62:313–5.
[40] Khalife J, Liu JL, Pierce R, Porchet E, Godin C, Capron A. Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. Parasitology 1994;108(Pt 5):527–32.
[41] Lebioda L, Stec B, Brewer JM. The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold beta + alpha-barrel with a novel beta beta alpha alpha (beta alpha) 6 topology. J Biol Chem 1989;264:3685–93.
[42] Reed GH, Poyner RR, Larsen TM, Wedekind JE, Rayment I. Structural and mechanistic studies of enolase. Curr Opin Struct Biol 1996;6:736–43.
[43] Kim TS, Jung Y, Na BK, Kim KS, Chung PR. Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*. Infect Immun 2000;68:3941–8.
[44] Wermuth B. Aldo-keto reductases. Prog Clin Biol Res 1985;174:209–30.
[45] Inoue S, Sharma RC, Schimke RT, Simoni RD. Cellular detoxification of tripeptidyl aldehydes by an aldo-keto reductase. J Biol Chem 1993;268:5894–8.
[46] Picklo Sr MJ, Olson SJ, Hayes JD, Markesbery WR, Montine TJ. Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. Brain Res 2001;916:229–38.
[47] Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ES. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. Mol Cell Proteomics 2005;4:1686–96.
[48] Nadella M, Bianchet MA, Gabelli SB, Barrila J, Amzel LM. Structure and activity of the axon guidance protein MICAL. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:16830–5.
[49] Pasterkamp RJ, Dai HN, Terman JR, et al. MICAL flavoprotein monooxygenases: expression during neural development and following spinal cord injuries in the rat. Mol Cell Neurosci 2006;31:52–69.
[50] Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites—masters of regulation. Immunol Rev 2004;201:89–116.
[51] Knudsen GM, Medzihradszky KF, Lim KC, Hansell E, McKerrow JH. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. Mol Cell Proteomics 2005;4:1862–75.
[52] Perez-Sanchez R, Ramajo-Hernandez A, Ramajo-Martin V, Oleaga A. Proteomic analysis of the tegument and excretory–secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. Proteomics 2006;6(Suppl 1):S226–36.
[53] Bernal D, Carpena I, Espert AM, et al. Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infections. Proteomics 2006;6:2835–43.
[54] Bernal D, de la Rubia JE, Carrasco-Abad AM, Toledo R, Mas-Coma S, Marcilla A. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory–secretory products of *Fasciola hepatica*. FEBS Lett 2004;563:203–6.
[55] Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WP, Sminia T. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. Parasitology 1994;109(Pt 4):479–85.
[56] Dikkeboom R, Bayne CJ, van der Knaap WP, Tijnagel JM. Possible role of reactive forms of oxygen in *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of Lymnaea stagnalis. Parasitol Res 1988;75:148–54.
[57] Bender RC, Broderick EJ, Goodall CP, Bayne CJ. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H_2O_2 than susceptible snails. J Parasitol 2005;91:275–9.
[58] Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta 2006;1758:994–1003.
[59] Mei H, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. Exp Parasitol 1997;86:69–78.
[60] Connors VA, Lodes MJ, Yoshino TP. Identification of a *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory–secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes. J Invertebr Pathol 1991;58:387–95.
[61] Yim MB, Kang JH, Yim HS, Kwak HS, Chock PB, Stadtman ER. A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu, Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in K_m for hydrogen peroxide. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:5709–14.
[62] Kim SM, Kang JH. Peroxidative activity of human Cu, Zn-superoxide dismutase. Mol Cell 1997;7:120–4.
[63] Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. J Biol Chem 1993;268:4099–105.
[64] Zelck UE, Von Janowsky B. Antioxidant enzymes in intramolluscan *Schistosoma mansoni* and ROS-induced changes in expression. Parasitology 2004;128:493–501.
[65] Tew KD, Ronai Z. GST function in drug and stress response. Drug Resist Updat 1999;2:143–7.
[66] Srivastava S, Spite M, Trent JO, West MB, Ahmed Y, Bhatnagar A. Aldose reductase-catalyzed reduction of aldehyde phospholipids. J Biol Chem 2004;279:53395–406.
[67] Fox D, Smulian AG. Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. Med Mycol 2001;39:495–507.
[68] Jong AY, Chen SH, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. J Med Microbiol 2003;52:615–22.

[69] Jolodar A, Fischer P, Bergmann S, Buttner DW, Hammerschmidt S, Brattig NW. Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. Biochim Biophys Acta 2003;1627:111–20.
[70] Lopez-Alemany R, Suelves M, Munoz-Canoves P. Plasmin generation dependent on alpha-enolase-type plasminogen receptor is required for myogenesis. Thromb Haemost 2003;90:724–33.
[71] Kum-Tatt L, Tan IK, Seet AM. A new colorimetric method for the determination of NADH/NADPH dependent glutathione reductase in erythrocytes and in plasma. Clin Chim Acta 1975;58:101–8.
[72] Roth Jr E. *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. Blood Cells 1990;16:453–60, discussion 61–6.
[73] Cordeiro AT, Michels PA, Delboni LF, Thiemann OH. The crystal structure of glucose-6-phosphate isomerase from *Leishmania mexicana* reveals novel active site features. Eur J Biochem 2004;271:2765–72.
[74] Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate *in vitro* and *in vivo*. J Clin Invest 1991;88:1886–93.
[75] Marcengill MB, Puri S, Puri SK, et al. Antioxidant effects of pyruvate in isolated rat hearts. J Mol Cell Cardiol 1995;27:2059–67.
[76] Bassenge E, Sommer O, Schwemmer M, Bunger R. Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279:H2431–8.
[77] Olivencia-Yurvati AH, Blair JL, Baig M, Mallet RT. Pyruvate-enhanced cardioprotection during surgery with cardiopulmonary bypass. J Cardiothorac Vasc Anesth 2003;17:715–20.
[78] Constantopoulos G, Barranger JA. Nonenzymatic decarboxylation of pyruvate. Anal Biochem 1984;139:353–8.
[79] Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Olivencia-Yurvati AH. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. Exp Biol Med (Maywood) 2005;230:435–43.
[80] Biagini GA, Park JH, Lloyd D, Edwards MR. The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. Microbiology 2001;147:3359–65.
[81] Kolberg J, Aase A, Bergmann S, et al. *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. Microbiology 2006;152:1307–17.
[82] Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. Infect Immun 2004;72:2416–9.
[83] Terman JR, Mao T, Pasterkamp RJ, Yu HH, Kolodkin AL. MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. Cell 2002;109:887–900.
[84] DeGaffe G, Loker ES. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the effect of parasite secretory-excretory products on host hemocyte spreading. J Invertebr Pathol 1998;71:64–72.
[85] Ventura A, Pelicci PG. Semaphorins: green light for redox signaling? Sci STKE 2002, 2002: PE44.
[86] Clapham DE. Calcium signaling. Cell 1995;80:259–68.
[87] Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. Neuron 1998;21:13–26.
[88] Zhang G, Schmidt O, Asgari S. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. Dev Comp Immunol 2006;30:756–64.
[89] Ferreira V, Molina MC, Valck C, et al. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. Mol Immunol 2004;40:1279–91.
[90] Nakhasi HL, Pogue GP, Duncan RC, et al. Implications of calreticulin function in parasite biology. Parasitol today 1998;14:157–60.
[91] Pan SC. *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host–parasite interactions. Jpn J Med Sci Biol 1996;49:129–49.
[92] Lodes MJ, Yoshino TP. Characterization of excretory–secretory proteins synthesized *in vitro* by *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. J Parasitol 1989;75:853–62.

Bases moléculaires du polymorphisme de compatibilité dans l'interaction *Schistosoma mansoni* / *Biomphalaria glabrata*

Résumé

La dynamique co-évolutive qui joue dans les systèmes hôte-parasite conduit à une véritable course aux armements entre les deux protagonistes qui se traduit, dans certaines interactions comme celle qui est traitée dans cette thèse, par un polymorphisme de compatibilité dont les bases moléculaires sont méconnues. L'objectif de cette thèse était de progresser dans la connaissance des mécanismes moléculaires sous-jacents à ce polymorphisme de compatibilité dans l'interaction *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni.* Une approche protéomique comparative entre des souches de parasites compatibles et incompatibles nous a permis d'identifier des déterminants moléculaires clés de l'interaction exprimés par le parasite. Il s'agit d'une part de mucines hautement polymorphes potentiellement antigéniques, les « *Schistosoma mansoni* Polymorphic Mucin » (*Sm*PoMucs), et d'autre part de molécules anti-oxydantes (« ROS scavengers »). Afin d'aborder la question de la course aux armements de manière complète, nous avons également recherché la « contre-partie moléculaire » exprimée par le mollusque et susceptible d'expliquer ce polymorphisme de compatibilité. Dans ce but, des approches de co-précipitation ont été menées. Elles ont permis de montrer que les *Sm*PoMucs interagissaient avec des récepteurs immunitaires diversifiés du mollusque, les Fibrinogen-related Proteins (FREPs). Nous montrons ainsi pour la première fois dans une interaction parasite/hôte invertébré l'intervention d'un « système de type antigène-anticorps » impliquant un répertoire individuel polymorphe d'antigènes potentiels du parasite (les *Sm*PoMucs) et un répertoire individuel diversifié de récepteurs immunitaires de son hôte (les FREPs). Nous avons également montré que le complexe immun formé par les deux dernières molécules citées incluait un troisième partenaire, une thioester-containing protein (TEP) qui appartient à une classe de molécules connue pour son rôle dans la phagocytose ou l'encapsulation. La présence de ce troisième partenaire au sein d'un même complexe renforce le rôle potentiellement immunitaire de ce complexe dans la reconnaissance et l'élimination du parasite. Au travers de cette thèse, nous nous sommes également intéressés à la course aux armements jouant sur les mécanismes effecteurs de l'immunité du mollusque. Dans notre modèle, les effecteurs responsables de la destruction du parasite sont principalement des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans ce cas aussi, nous avons montré qu'il existe une concordance phénotypique entre la production de ROS par l'hôte et le niveau de « ROS scavengers » produits par le parasite pour contrecarrer la réaction de l'hôte. Ainsi, les mécanismes moléculaires responsables du polymorphisme de compatibilité dans l'interaction *B. glabrata/S. mansoni* s'appuieraient au moins sur deux facteurs d'une part sur la confrontation de répertoires de molécules polymorphes et/ou diversifiées en ce qui concerne les mécanismes de reconnaissance immunitaire, et d'autre part sur une adaptation réciproque quantitative en ce qui concerne certains mécanismes effecteurs de l'immunité.

Mots-clés : *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, interaction hôte-parasite, co-évolution, polymorphisme de compatibilité, *S. mansoni* Polymorphic Mucin (*Sm*PoMuc), Fibrinogen-related Proteins (FREPs), Thioester-containing protein (TEP), espèces réactives de l'oxygène (ROS), molécules anti-oxydantes (ROS scavengers).

Molecular bases of compatibility polymorphism in the *Schistosoma mansoni* / *Biomphalaria glabrata* model

Abstract

The coevolutionary dynamic playing in the host-parasite interaction leads to an arms race between host and parasite. In certain models, this arms race results in a compatibility polymorphism for which the molecular bases remain largely unknown. The aim of this PhD thesis was to identify the molecular determinants of the compatibility polymorphism that exists in the *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni* interaction. First, we developed a comparative proteomics approach between compatible and incompatible strains of the parasite. This approach allows us to identify molecules that could play a key role in this interaction. They consist in highly polymorphic mucin-like proteins, the « *Schistosoma mansoni* Polymorphic Mucin » (*Sm*PoMucs), and scavengers of reactive oxygen species (ROS scavengers). In order to study more completely the arms race that takes place in the *B. glabrata/S. mansoni* interaction, we investigate the molluscan counterparts of these molecules. Co-precipitation approaches allow us to show that *Sm*PoMucs interact with diversified immune receptors from the mollusk, the Fibrinogen-related Proteins (FREPs). This is the first evidence of the interaction between an individual repertoire of polymorphic potential parasite antigens (*Sm*PoMucs) and an individual repertoire of diversified potential immune receptors (FREPs) from an invertebrate host. We found a third partner associated with FREPs and *Sm*PoMucs, a thioester-containing Protein (TEP). TEP belongs to a class of molecules involved in the phagocytosis or in encapsulation. The presence of TEP in this immune complex argues in favor of the involvement of the formed complex in parasite immune recognition and elimination. We are also interested in the effector mechanisms responsible for the destruction of the parasite, in *B. glabrata* they rely essentially on the production of Reactive Oxygen Species (ROS). We show that a phenotypic concordance exists between the levels of host ROS production and parasite ROS scavengers' production. The compatibility polymorphism in the *B. glabrata/S. mansoni* interaction seems to be based on the confrontation of polymorphic and/or diversified molecules concerning immune recognition mechanisms and on quantitative reciprocal adaptations concerning immune effector mechanisms.

Keywords : *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, host-parasite interaction, co-evolution, compatibility polymorphism, *S. mansoni* Polymorphic Mucin (*Sm*PoMuc), Fibrinogen-related Proteins (FREPs), Thioester-containing protein (TEP), Reactive Oxygen Species (ROS), ROS scavengers.