



La compatibilité dans l'interaction *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* : Recherche de gènes candidats

A. Bouchut

► To cite this version:

A. Bouchut. La compatibilité dans l'interaction *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* : Recherche de gènes candidats. Sciences de l'environnement. Université de Montpellier II, 2007. Français. NNT: . tel-00939152

HAL Id: tel-00939152

<https://theses.hal.science/tel-00939152>

Submitted on 30 Jan 2014

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.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

Année 2007

N°ordre :

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

Discipline : Parasitologie

Ecole Doctorale : Sciences chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Anne BOUCHUT

Le 24 avril 2007

La compatibilité dans l'interaction
***Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* :**
Recherche de gènes candidats

JURY

M. André THERON, Directeur de Recherche CNRS, Perpignan,
M. Raymond PIERCE, Directeur de Recherche CNRS, Institut Pasteur de Lille,
M. Jean-Michel DREZEN, Chargé de Recherche CNRS, Tours,
Mme Evelyne BACHERE, Chargée de Recherche CNRS, IFREMER-UMII,
M. Pierre-Eric SAUTIERE, Maître de Conférence, Lille I,
M. Guillaume MITTA, Professeur, Perpignan,

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
co-Directeur de Thèse

Je tiens à remercier très sincèrement toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail de thèse.

Tout d'abord, je souhaite remercier Monsieur André Théron, directeur du laboratoire de Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne qui m'a accueillie et qui m'a permis d'effectuer cette thèse. Je le remercie également pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie très sincèrement mes deux directeurs de thèse, Madame Christine Coustau pour m'avoir permis de débiter cette thèse et plus particulièrement Monsieur Guillaume Mitta pour m'avoir fait part de son expérience, pour m'avoir encadrée, conseillée, pour ses encouragements et sa disponibilité.

Je remercie particulièrement les membres du jury qui ont accepté de consacrer de leur temps afin d'évaluer ce travail : Monsieur Raymond Pierce et Monsieur Jean-Michel Drezen pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs ainsi que Madame Evelyne Bachère et Monsieur Pierre-Eric Sautière.

Je voudrais également remercier Monsieur Michel Salzet pour m'avoir accueillie au laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, sur le campus de Lille I. Un grand merci à David Vergote qui m'a formée aux joies de la protéomique. Merci aussi à tous les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Christian Rolando, directeur du Centre Commun de Mesures de Spectrométrie de Masse de Lille I et à Mademoiselle Adeline Page pour notre collaboration.

Je remercie tous les membres du laboratoire de Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne pour leur sympathie. Merci plus particulièrement à Richard Galinier, Jean-François Allienne, Anne Rognon et Gaël Simon pour leur aide précieuse. Une pensée pour Sylvie, « notre secrétaire préférée ».

Merci à tous les locataires de la « salle étudiants », aux petits nouveaux et aux plus anciens, pour les bons moments passés ensemble : Sophie, Rodrigue, Frédéric, Mathieu, Manu, Mouda, Géraldine, François et Stéphanie.

Enfin, je remercie chaleureusement mes parents qui m'ont permis d'accomplir ce travail, et qui, avec ma sœur, ma famille et mes amis m'ont vivement soutenue et encouragée.

Table des matières

Introduction	9
I. Le polymorphisme de compatibilité et hôtes vertébrés	11
A. La malaria comme pression de sélection	11
1. La malaria et les érythrocytes	12
a. Les molécules de surface des érythrocytes	12
b. Les constituants de l'hémoglobine	13
c. Le stress oxydatif	15
d. Le processus de cytoadhérence, un facteur majeur ?	16
2. La malaria et le système immunitaire	17
B. Un exemple de résistance totale face à <i>Toxoplasma gondii</i>	19
C. Les ruminants face aux nématodes gastro-intestinaux	20
II. Le polymorphisme de compatibilité et hôtes invertébrés	22
A. L'interaction anophèle- <i>Plasmodium</i>	22
B. L'interaction glossine- <i>Trypanosoma</i>	24
C. L'interaction moustique-nématodes filaires	27
D. L'interaction Mouche des sables- <i>Leishmania</i>	29
E. L'interaction <i>Drosophila</i> -guêpe parasitoïde	31
III. Les interactions mollusque-trématode	33
A. Généralités	33
B. Caractéristiques de l'interaction avec le premier hôte intermédiaire	35
C. Les différentes stratégies d'évitement du parasite	39
1. Le camouflage moléculaire et le mimétisme moléculaire	39
2. Interférence par immuno-modulation, immuno-suppression	40
D. Travaux antérieurs menés sur la compatibilité : outils et voies de recherche utilisés	43
1. La génétique fondamentale	43
2. Les approches en génétique des populations	46
3. Des études comparatives et fonctionnelles	48
4. D'autres outils à disposition	51
a. La lignée de cellules embryonnaires, Bge	51
b. Les programmes de séquençage	53

IV. Le modèle d'étude : *Biomphalaria glabrata*-*Echinostoma caproni* 54

Chapitre 1 : Recherche de candidats impliqués dans la compatibilité parmi les protéines plasmatiques des mollusques par une approche protéomique 60

Publication n°1 63

Chapitre 2 : Recherche de candidats impliqués dans la compatibilité parmi les gènes des hémocytes qui participent potentiellement au processus d'adhérence par une approche transcriptomique 73

Publication n°2 76

Chapitre 3 : Recherche de candidats impliqués dans la compatibilité parmi les protéines produites par les hémocytes par une approche comparative globale 90

Publication n°3 92

Chapitre 4 : Recherche de candidats impliqués dans la compatibilité par une approche moléculaire, comparative et globale réalisée sur des mollusques susceptibles et résistants 105

Publication n°4 107

Discussion et Perspectives 122

I. Les candidats sur-exprimés chez les mollusques susceptibles 123

A. Les Calcium binding proteins : CaBPs 123

B. Les glycosidases 127

C. Protéases et inhibiteurs de protéases 130

D. Les molécules d'adhérence et de la matrice extracellulaire 133

II. Les candidats sur-exprimés chez les mollusques résistants 138

A. Les dermatopontines 138

B. La C-type lectin 140

C. L'aplysianin 141

D. Les serpins 142

E. La protéine de filament intermédiaire 145

F. L'histone H4 146

III. Expression tissulaire : importance de la glande de l'albumine dans la compatibilité ?	147
Conclusion	149
Références Bibliographiques	152
Annexe	186

Table des figures

Figure 1 : Cycle de vie des trématodes	34
Figure 2 : Modèle de concordance des génotypes (matching genotype model)	38
Figure 3 : Les différentes stratégies d'évitement	42
Figure 4 : Développement de sporocystes d' <i>E. caproni</i> chez <i>B. glabrata</i> observé en coupes histologiques	56
Figure 5 : Propriétés d'adhérence des hémocytes	58
Figure 6 : Séquestration du Ca^{2+}	126
Figure 7 : Détournement des glycosidases de l'hôte	129
Figure 8 : Détournement des protéases et inhibiteurs de protéases	132
Figure 9 : Processus d'immobilisation des hémocytes, défaut de recrutement	136
Figure 10 : Mise en situation	144
Figure 11 : Schéma récapitulatif	150

Introduction

Ce travail de thèse s'intègre dans un projet sur l'étude de la compatibilité dans les interactions hôte-parasite. Dans ce type d'interactions, le parasite vit aux dépens de son hôte, organisme vivant qui devient un véritable milieu biologique que le parasite doit préserver afin d'assurer sa transmission. L'association est obligatoire pour le parasite qui seul en tire avantage pendant tout ou une partie de son cycle de vie. Durant cette association, hôte et parasite s'influencent réciproquement mais sans que leur existence soit en règle générale menacée.

Lors de cette interaction hôte-parasite qui est qualifiée d'interaction durable (Combes, 1995), les deux espèces, à chaque génération, exercent l'une sur l'autre des pressions sélectives. Les deux adversaires acquièrent alors et sans cesse de nouvelles adaptations pour ne pas être distancés par l'« autre ». C'est le processus de co-évolution. Ces adaptations sont rendues possibles par le potentiel qu'ont l'hôte et le parasite à renouveler continuellement leur diversité génétique afin de contrecarrer les stratégies de leur opposant, c'est la « course aux armements » des deux adversaires. Cet équilibre dynamique d'action-réaction de l'hôte comme du parasite joue un rôle essentiel quant à la sélection naturelle et à l'évolution des deux partenaires ; la sélection jouant chez les deux protagonistes permet donc des adaptations réciproques, développant des procédés qui assurent la rencontre, l'évitement, la destruction et la survie.

La co-évolution d'un système hôte-parasite est conduite par l'évolution réciproque de la résistance de l'hôte et de la virulence et/ou l'infectivité du parasite (Sorci et al., 1997). Virulence, infectivité et résistance sont les caractéristiques complexes des interactions hôte-parasite. Bien que ces éléments semblent être les attributs du parasite ou de l'hôte, ils sont en réalité le résultat des interactions physiologiques, morphologiques et comportementales entre le parasite et son hôte (Toft & Karter, 1990). Ces éléments participent aux pressions de sélection qui appartiennent au système action-réaction maintenu en équilibre dynamique.

Le polymorphisme de compatibilité peut être observé dans les populations naturelles d'hôtes et de parasites en interaction. Ce phénomène illustre et résulte de cette dynamique co-évolutive. Quelques éléments permettent d'expliquer le maintien de ce polymorphisme de compatibilité dans les populations naturelles, parmi eux des théories comme celle de la Reine rouge (Van Valen, 1973) et des modèles génétiques de la compatibilité qui mettent en avant un coût de la résistance lequel maintient ce polymorphisme chez les hôtes animaux ou

végétaux. Cependant ces théories et ces modèles ont été rarement confirmés expérimentalement (Frank, 1991 ; Frank, 1992 ; Frank, 1993). Dans ces modèles, pour qu'un polymorphisme génétique de la compatibilité soit maintenu en absence du parasite, le bénéfice qu'apporte le génotype résistant doit être inférieur à celui apporté par le génotype susceptible (Antonovics & Thrall, 1994). Webster & Whoolhouse se sont intéressés à la question du coût de la résistance dans le système *Biomphalaria glabrata*-*Schistosoma mansoni*, en étudiant une souche susceptible et une souche résistante de mollusques (Webster & Woolhouse, 1999). Ils ont pu montrer que la souche susceptible présentait un taux de fertilité significativement supérieur à celui de la souche résistante et ce, que les mollusques soient infestés ou non. De même, Langan et ses collaborateurs sur le système *B. glabrata*-*Echinostoma caproni*, a mis en évidence un coût apparent de la résistance se manifestant par un retard de la maturité sexuelle des mollusques résistants comparée à celle des susceptibles, (Langan et al., 1998).

Les résultats concernant les coûts de la résistance représentent des pistes intéressantes quant à la compréhension des processus qui régissent le maintien du polymorphisme de compatibilité. Cependant, d'autres hypothèses avancent que le polymorphisme de compatibilité n'est que le reflet de la dynamique co-évolutive de certains systèmes hôte-parasite à l'équilibre où au sein d'une population où seuls certains individus hôtes ou parasites sont compatibles. Cette dernière hypothèse est avancée dans l'interaction mollusque-trématode (*B. glabrata* et *S. mansoni*, respectivement), c'est l'hypothèse des « matching alleles » (Theron & Coustau, 2005). A l'heure actuelle, bien que quelques gènes et mécanismes de la compatibilité aient été élucidés dans certaines interactions hôte-parasite (thèmes développés par la suite) aucun élément ne nous permet d'appréhender les mécanismes responsables de ce maintien.

I. Le polymorphisme de compatibilité et hôtes vertébrés

Compte tenu du fait que les résultats les plus convaincants et les gènes candidats les plus prometteurs ont été décrits dans des interactions impliquant hôtes vertébrés et parasites, nous avons choisi de faire état de ce qui était connu au sujet du polymorphisme de compatibilité dans plusieurs de ces systèmes. Les propos développés dans ce paragraphe se focalisent sur certains systèmes hôte-parasite impliquant hôtes vertébrés et parasites eucaryotes tels que des « vers » ou encore des protozoaires. Nous traiterons des exemples les plus représentatifs et les mieux documentés quant à la recherche et à la découverte de gènes réellement impliqués et responsables du polymorphisme de compatibilité. Les interactions impliquant des microparasites tels que les bactéries, les virus ou encore certains champignons, pour lesquels le phénomène de polymorphisme de compatibilité est également décrit, ne seront pas abordées.

A. La malaria comme pression de sélection

La malaria est reconnue comme étant la plus forte pression de sélection sur le génome humain (Kwiatkowski, 2005). Cette pression sélective a conduit à un polymorphisme de compatibilité dans les différentes populations qui sont en contact avec le parasite. Plusieurs gènes de l'hôte seraient impliqués dans les mécanismes de susceptibilité-résistance et ceux-ci interagiraient avec les facteurs génétiques du parasite mais aussi avec des facteurs environnementaux. L'interaction avec le parasite induit, par exemple, le maintien au niveau des populations humaines d'anomalies génétiques affectant les érythrocytes, cible privilégiée du parasite (partie 1 : malaria et érythrocytes). Ces désordres génétiques sont responsables de pathologies graves, telles la drépanocytose, les thalassémies, l'ovalocytose mélanésienne. Ils sont le résultat de la pression de sélection qui joue sur certaines molécules érythrocytaires polymorphes interagissant avec le parasite. Par ailleurs, le système immunitaire humain subit également cette pression de sélection de laquelle résulte une compatibilité variable (partie 2 : malaria et système immunitaire). L'interaction entre l'homme et les parasites du genre *Plasmodium* est réellement un exemple remarquable et bien connu, pour lequel les gènes responsables du polymorphisme de compatibilité ont été caractérisés et certains des mécanismes responsables de la susceptibilité ou de la résistance ont été décrits.

1. La malaria et les érythrocytes

a. Les molécules de surface des érythrocytes

Tout d'abord le parasite interagit avec les différentes molécules de surface du globule rouge afin de pénétrer à l'intérieur de cette cellule, sans en détruire son intégrité, par des mécanismes qui n'ont pas encore été complètement élucidés (Sibley, 2004). Certaines molécules de surface du globule rouge nécessaires à l'invasion parasitaire participent aux mécanismes de résistance. Dans ce cadre, des études de génétique humaine ont permis de découvrir un gène clé du processus moléculaire relatif à l'invasion des érythrocytes par *Plasmodium vivax*. Il s'agit du gène *FY* lequel code l'antigène Duffy qui est un récepteur de la famille des chemokines exprimé sur différents types de cellules. Cet antigène est exprimé à la surface des érythrocytes chez la plupart des populations sauf dans les populations d'Afrique sub-saharienne lesquelles présentent une résistance complète à *P. vivax*. Cette résistance est due à un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) dans la séquence du promoteur qui interrompt le site de liaison pour le facteur de transcription GATA-1 (Tournamille et al., 1995). Ce phénomène empêche l'expression de Duffy, donc l'invasion de l'érythrocyte par le parasite et explique l'absence de *P. vivax* dans des régions d'Afrique où d'autres espèces sont répandues (Miller et al., 1976). Cette découverte a permis d'identifier la protéine du parasite Duffy-binding protein qui est indispensable lors de l'invasion (Chitnis & Miller, 1994). Cette protéine est actuellement testée dans le cadre d'essais cliniques afin de développer un vaccin contre cette espèce (Yazdani et al., 2004). La participation du même gène *FY* dans le polymorphisme de compatibilité d'une population de Papouasie Nouvelle Guinée a aussi été mise en évidence. Dans ce cas, une diminution de l'expression de l'antigène Duffy réduit l'efficacité d'invasion par le parasite (Zimmerman et al., 1999 ; Michon et al., 2001). Cette sélection qui paraît si forte à ce locus étonne quelque peu les chercheurs car l'infestation par *P. vivax* n'est généralement pas létale et la présence de ce parasite aurait un effet protecteur vis à vis de l'infestation par *P. falciparum* (Williams et al., 1996).

En ce qui concerne l'invasion par *P. falciparum*, les données disponibles suggèrent l'existence de multiples voies d'entrée dans les érythrocytes (Hadley et al., 1987). Des études se sont concentrées sur le polymorphisme de *GYPA*, *GYPB* et *GYPC*, gènes qui codent les glycophorines A, B et C, respectivement. Les groupes sanguins humains sont déterminés par les glycophorines A et B, sialo-glycoprotéines présentes sur la membrane des érythrocytes. Dans le cas où une de ces deux protéines n'est pas exprimée, les érythrocytes deviennent

relativement résistants à l'invasion (Facer, 1983). Des résidus acides sialiques spécifiques de la glycophorine A sont reconnus par l'antigène 175 de *P. falciparum* qui présente des similarités pour la Duffy binding protein de *P. vivax* (Orlandi et al., 1992 ; Mayor et al., 2005). L'analyse des séquences confirme une forte sélection positive, non seulement des gènes *GYPA* et *GYPB* de l'hôte humain mais aussi de l'antigène 175 du parasite. Cette sélection illustre la « lutte » en cours entre le récepteur de l'hôte et le ligand du parasite (Wang et al., 2003). En ce qui concerne maintenant la glycophorine C, constituant mineur de la membrane érythrocytaire, elle sert de récepteur pour l'antigène 140 de *P. falciparum*. Une délétion de l'exon 3 de ce gène conduit à la diminution de l'invasion des globules rouges par le parasite (Maier et al., 2003) ce qui pourrait également participer à l'établissement d'un polymorphisme de compatibilité. Par ailleurs, la protéine « band 3 » est un échangeur d'anions membranaire des érythrocytes codée par le gène *SLC4A1* et impliquée dans la résistance à la malaria. Une délétion de 27 pb dans ce gène conduit à l'ovalocytose, forme qui protégerait à la fois de la malaria (Cattani et al., 1987 ; Foo et al., 1992) et de la malaria cérébrale (Genton et al., 1995 ; Allen et al., 1999). Le mécanisme de protection n'est pas connu, mais il pourrait être relié (i) à l'implication de la protéine band 3 dans le processus de cytoadhérence endothéliale, (ii) à des effets inhibiteurs de l'invasion par le parasite ou de sa croissance.

b. Les constituants de l'hémoglobine

Parmi eux, les gènes qui codent la globine présentent un fort polymorphisme engendré par l'interaction avec le parasite (Flint et al., 1998). Les érythrocytes sont essentiellement constitués d'hémoglobine dont le parasite est hautement dépendant, celle-ci permettant d'assurer sa survie (Liu et al., 2006). Des altérations de cette molécule peuvent donc affecter la machinerie biochimique et cellulaire permettant le développement du parasite. Elles peuvent également améliorer la capacité de reconnaissance du parasite par le système immunitaire, en modifiant la morphologie, les propriétés mécaniques ou encore la structure de la surface des érythrocytes parasités (Paulitschke & Nash, 1993). L'importance biologique de tous ces éléments est soulignée par la très forte pression de sélection exercée par la malaria sur la structure et la régulation de la globine α (codée par les gènes *HBA1* et *HBA2*) et la globine β (codée par le gène *HBB*) qui constituent ensemble la protéine tétramérique d'hémoglobine adulte (Kwiatkowski, 2005).

Trois formes différentes du gène *HBB* présentent un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) conduisant à la modification d'un acide aminé dans la séquence de la protéine. Toutes ces formes, dont les fréquences sont élevées dans différentes populations, confèrent la résistance contre la malaria.

L'allèle HbS code l'hémoglobine S, également nommée hémoglobine falciforme, c'est un des premiers variants génétiques humains qui a été associé à une déficience moléculaire spécifique (Pauling et al., 1949). Cet allèle à l'état homozygote confère une maladie grave causée par la malformation des érythrocytes. En revanche, l'état hétérozygote (HbAS) n'est associé à aucune anomalie clinique et permet d'augmenter d'un facteur 10 la protection contre les formes mortelles de la malaria (Allison, 1954 ; Stirnadel et al., 1999 ; Ackerman et al., 2005). A l'heure actuelle, le mécanisme précis permettant cette protection n'est pas connu. Deux hypothèses sont envisagées : la croissance du parasite à l'intérieur des globules rouges serait inhibée (Pasvol et al., 1978) et/ou l'élimination des globules rouges parasités par la rate serait accélérée (Shear et al., 1993). Malgré les conséquences dramatiques pour les individus homozygotes, ce polymorphisme est maintenu à une fréquence allélique d'environ 10% dans beaucoup de régions africaines (Kwiatkowski, 2005).

L'allèle HbC qui code pour l'hémoglobine C est beaucoup moins répandu que l'allèle HbS et présente des conséquences cliniques beaucoup moins importantes (Diallo et al., 2004). Les individus homozygotes et hétérozygotes sont tous deux résistants à la malaria (Agarwal et al., 2000 ; Mockenhaupt et al., 2004a ; Rihet et al., 2004), cependant les homozygotes semblent davantage protégés (Modiano et al., 2001). L'expression de l'hémoglobine C conduit à (i) une diminution de la cytoadhérence du parasite (Arie et al., 2005), (ii) une expression anormale de la protéine membranaire érythrocytaire 1 de *P. falciparum* (PfEMP1) (Fairhurst et al., 2005), (iii) à l'agrégation de la protéine band 3 à la surface des érythrocytes, et (iv) à l'altération de la topographie de la surface de la membrane des érythrocytes, (Tokumasu et al., 2005). Compte tenu de l'ensemble de ces éléments, un mécanisme d'action a été proposé : les érythrocytes parasités seraient éliminés beaucoup plus rapidement.

L'hémoglobine E qui correspond à l'allèle HbE serait une mutation tout à fait récente dont la fréquence allélique a rapidement augmentée (Ohashi et al., 2004). Jusqu'à présent, l'effet protecteur de cet allèle n'a pas encore été démontré par des études épidémiologiques, cependant les érythrocytes des individus hétérozygotes seraient relativement résistants à l'invasion par *P. falciparum* (Chotivanich et al., 2002).

Les thalassémies sont les pathologies humaines à transmission mendélienne les plus communes qui constituent un problème de santé majeur (Weatherall & Clegg, 2001). Elles résultent de délétions ou de mutations ponctuelles qui se produisent dans les clusters des gènes de la globine et qui inhibent la synthèse des chaînes α ou β de la globine (Loukopoulos, 1991). Dans certaines régions, la thalassémie a atteint de très fortes fréquences, approchant même la fixation (Haldane, 1949). En effet, la thalassémie possède un effet protecteur contre la malaria (Allen et al., 1997 ; Mockenhaupt et al., 2004b ; Williams et al., 2005) dont le mécanisme demeure inconnu. Ici aussi, des allèles dont l'expression conduit à des pathologies graves ont été sélectionnés sous la pression du parasite (Flint et al., 1986 ; Miller, 1996 ; Kwiatkowski, 2005).

c. Le stress oxydatif

Des molécules participant aux mécanismes reliés au stress oxydatif peuvent également être impliquées dans le polymorphisme de compatibilité. Les parasites du genre *Plasmodium* métabolisent l'hémoglobine d'une part pour leurs besoins nutritifs mais également pour libérer de l'espace nécessaire à leur croissance (Liu et al., 2006). Ce processus libère des sous-produits qui sont potentiellement toxiques, tels que le fer qui est une source de stress oxydatif. Le fer ferreux (II) de l'oxyhémoglobine produite suite à la dégradation de l'hémoglobine, est oxydé en fer ferrique (III). De cette réaction, résulte également la production de radicaux oxygénés tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) qui est transformé spontanément en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Loria et al., 1999). A l'intérieur des érythrocytes, l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), codée par le gène *G6PD* (sur le chromosome X), participe à la détoxification en produisant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Parmi les différents variants du gène *G6PD*, ceux qui compromettent nettement l'activité de l'enzyme conduisent à une anémie par hémolyse (Wajcman & Galacteros, 2004). La distribution géographique des individus déficients en G6PD est cohérente avec la pression de sélection effectuée par la malaria (Ganczakowski et al., 1995), et l'analyse de la structure des haplotypes au locus *G6PD* soutient l'hypothèse d'une sélection positive récente (Tishkoff et al., 2001 ; Sabeti et al., 2002). Une déficience de l'activité enzymatique de la G6PD est corrélée à un effet protecteur contre la malaria chez des enfants du Niger (Gilles et al., 1967). En Gambie et au Kenya, un variant particulier de la G6PD (G6PD A⁻) est associé à une réduction de 50% des risques de développer la malaria (Ruwende et al., 1995). Dans ces érythrocytes déficients en G6PD, la multiplication du

parasite serait inhibée (Luzzatto et al., 1969), mais le parasite pourrait apparemment contourner ce problème en la synthétisant (Usanga & Luzzatto, 1985).

d. Le processus de cytoadhérence, un facteur majeur ?

Une fois à l'intérieur de l'érythrocyte, le parasite produit toute une série de protéines qui sont envoyées à la surface de la cellule (Kyes et al., 2001). Certaines de ces protéines participent au processus de séquestration des globules rouges parasités dans les petits vaisseaux sanguins. Ce mécanisme représenterait une stratégie d'évasion du système immunitaire qui permettrait au parasite de rester dans le compartiment vasculaire et d'éviter de circuler au travers de la rate. Ce stade est donc critique pour l'installation et le maintien de *P. falciparum* (Taylor et al., 2004). Dans ce cadre, toute une série d'interactions ligand-récepteur permet aux érythrocytes parasités de se lier à l'endothélium, aux plaquettes ou à d'autres érythrocytes. Du côté du parasite, le ligand majeur est la protéine membranaire érythrocytaire 1 de *P. falciparum* (PfEMP-1) qui est codée par une famille de gènes appelée *var* dont chaque parasite possède plusieurs copies différentes (Kyes et al., 2001). Du côté de l'hôte, de nombreuses molécules d'adhérence exprimées à la surface de l'endothélium, des plaquettes, des macrophages et des autres érythrocytes servent de récepteurs aux différentes formes du ligand PfEMP-1 (Ockenhouse et al., 1989 ; Ockenhouse et al., 1992 ; Wahlgren et al., 1994). Cependant, ces molécules parasitaires sont également les cibles d'une attaque immunologique que les parasites esquivent grâce au degré impressionnant de variabilité antigénique qui peut être générée en permutant l'expression des différentes copies des gènes *var* (Kyes et al., 2001).

Les molécules récepteurs de l'hôte impliquées dans le processus de cytoadhérence des érythrocytes parasités par *P. falciparum* peuvent également être polymorphes et les différents allèles peuvent engendrer des niveaux de susceptibilité différentiels au parasite. Par contre, une même combinaison d'allèles testée dans des régions géographiques différentes a pu être associée soit à la susceptibilité soit à la résistance au parasite (Kwiatkowski, 2005). En effet, il est envisageable que le phénotype associé à une combinaison allélique puisse varier entre différents emplacements et puisse également varier au cours du temps pour un même emplacement. L'antigène CD36 qui permet au parasite de se lier à l'endothélium (Barnwell et al., 1989) est codé par le gène *CD36* pour lequel plusieurs allèles ont été décrits (Aitman et al., 2000). Certains sont associés à la résistance (Pain et al., 2001 ; Omi et al., 2003) et d'autres à la susceptibilité (Aitman et al., 2000). Certains isolats de *P. falciparum* se lient

fortement à la protéine endothéliale ICAM-1 (molécule d'adhérence intercellulaire-1) (Berendt et al., 1989). Un polymorphisme décrit dans le domaine N-terminal de la protéine et présent à des fréquences élevées dans les populations, permet de réduire l'affinité de cette liaison (Fernandez-Reyes et al., 1997) et a pu être associé à une diminution de la susceptibilité au Kenya (Kun et al., 1999). Par contre, les mêmes allèles peuvent être responsables d'une augmentation de la susceptibilité comme cela a été montré au Gabon (Fernandez-Reyes et al., 1997). Ces résultats sont assez déroutants. D'autres variants du gène *ICAM1* qui code cette protéine ont été identifiés en Inde et nécessitent une analyse génétique afin de déterminer s'ils sont associés à la susceptibilité-résistance (Sengupta et al., 2004). La séquestration n'est pas seulement due aux récepteurs endothéliaux, la formation de rosettes qui consistent en l'agrégation des globules rouges parasités y participe également. Les rosettes se forment par la liaison de PfEMP1 au récepteur CR1 (récepteur du complément 1) de l'érythrocyte (Rowe et al., 1997). Une déficience en protéine CR1 à la surface du globule rouge est observée chez plus de 80% des individus de la population de Papouasie-Nouvelle Guinée en contact avec le parasite, cette déficience étant associée à la présence de polymorphismes dans le gène *CR1* ou à la thalassémie (Cockburn et al., 2004). Dans cette étude, il a été démontré que les différentes formes du gène *CR1* et la thalassémie étaient associées à la résistance au parasite de manière tout à fait indépendante. Dans d'autres populations, ces polymorphismes n'ont pas pu être associés à la susceptibilité-résistance (Bellamy et al., 1998 ; Zimmerman et al., 2003).

En ce qui concerne les polymorphismes observés dans les gènes de l'hôte impliqués dans le processus de séquestration discuté ci-dessus, les mêmes allèles ont pu être associés soit à la résistance soit à la susceptibilité suivant les populations étudiées. Ces résultats sont donc contradictoires et pourraient être des artéfacts statistiques qui seraient résolus en augmentant la taille de la population analysée et en affinant la cartographie de ces loci.

2. La malaria et le système immunitaire

Malgré l'éventail de gènes impliqués dans le polymorphisme de compatibilité de l'homme face à la malaria qui ont été identifiés et caractérisés, et l'ampleur des informations disponibles dans la littérature relatives aux réponses immunitaires de l'hôte, peu d'éléments concernant les effets de la malaria sur l'évolution du système immunitaire humain sont connus (Kwiatkowski, 2005). Les mécanismes provenant des réponses immunitaires qui pourraient procurer une immunité protectrice en populations naturelles ne sont pas

déterminés. Ceci est sûrement dû au fait que les conséquences phénotypiques de ces modifications sont beaucoup plus subtiles que celles fournies par les différents variants érythrocytaires. Malgré tout, plusieurs gènes immunitaires qui présentent des polymorphismes potentiellement associés à la susceptibilité-résistance, ont été signalés dans la littérature. Néanmoins, peu de candidats ont été testés pour leur association à la susceptibilité-résistance, et lorsque ces études ont été réalisées, les résultats sont assez contradictoires (Kwiatkowski, 2005). Certains de ces gènes et protéines candidats sont présentés dans les paragraphes qui suivent.

Des variants des gènes *HLA* dont le produit fonctionnel participe à la présentation de l'antigène ont pu être associés au polymorphisme de compatibilité vis à vis de *Plasmodium*. L'allèle *HLA-B53* (présentation de l'antigène qui conduit à une réponse cytotoxique des cellules T) qui s'exprime dans les cellules du foie, est associé à une diminution significative des risques de malaria sévère chez les enfants d'Afrique de l'Est (Hill et al., 1991). De même, l'allèle *HLA-DRB1* (présentation de l'antigène qui conduit à la production d'anticorps) qui s'exprime dans les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages, est associé à la résistance à la malaria (Hill et al., 1991).

D'autres molécules impliquées dans la réponse humorale et leurs variants alléliques ont également été associés à ce polymorphisme de compatibilité. C'est le cas (i) de l'interleukine 4 produite par les cellules T activées et déclenchant la prolifération et la différenciation des cellules B dont l'allèle *IL4-524T* serait relié à une résistance accrue à la malaria (Luoni et al., 2001), (ii) du ligand CD40, codé par le gène *TNFSF5*, exprimé à la surface des cellules T lequel se lie au récepteur CD40 des cellules B afin de réguler différentes fonctions de ces dernières et dont le variant allélique *TNFSF5-726C* aurait un effet protecteur contre la malaria (Sabeti et al., 2002), (iii) et du récepteur CD32 exposé à la surface des leucocytes possédant une faible affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines G et participant à l'élimination des complexes antigène-anticorps pour lequel le variant allélique présentant une substitution au codon 131 d'une histidine pour une arginine a été associé à un effet protecteur contre la malaria au Kenya (Shi et al., 2001).

D'autres molécules, potentiellement responsables du polymorphisme de compatibilité, participent à la réponse pro-inflammatoire : le facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor - TNF), cytokine pro-inflammatoire dont de multiples variants ont été associés à la susceptibilité à la malaria mais dont les rôles fonctionnels demeurent inconnus (McGuire et al., 1994 ; Abraham & Kroeger, 1999 ; Knight et al., 1999a ; McGuire et al., 1999 ; Meyer et al., 2002 ; Flori et al., 2003 ; Flori et al., 2005) ; la NO synthase qui produit le monoxyde

d'azote (NO), un radical libre possédant des propriétés anti-parasitaires et immunosuppressives, présente aussi plusieurs variants alléliques associés à un effet protecteur contre la malaria, l'expression desquels correspond à une production élevée de NO (Kun et al., 1998 ; Hobbs et al., 2002 ; Burgner et al., 2003) ; l'interféron- γ , médiateur clé de l'immunité qui jouerait à la fois un rôle protecteur et pathologique dans la malaria, possède des variants dont les rôles fonctionnels n'ont pas été décrits (Koch et al., 2002 ; Stevenson & Riley, 2004) ; une des chaînes de la protéine membranaire récepteur 1 de l'interféron- α présente deux formes polymorphes associées à un effet protecteur contre la malaria dont les rôles fonctionnels n'ont pas été élucidés (Aucan et al., 2003) ; une sous-unité de l'interleukine-12, cytokine produite par les macrophages activés, essentielle au développement des cellules Th1, présente un polymorphisme situé au niveau du promoteur du gène correspondant qui conduit à une diminution de la production de NO et qui serait relié à une très forte susceptibilité chez les individus homozygotes (Morahan et al., 2002) ; la famille des cytokines de type interleukin-1 majoritairement synthétisées par les macrophages, importants médiateurs de la réponse inflammatoire à l'infection, montre deux SNPs associés à la susceptibilité, (Walley et al., 2004) ; et l'interleukine-10, cytokine anti-inflammatoire déterminante dont la synthèse est génétiquement déterminée et dont les SNPs sont fortement associés à un effet protecteur (Wilson et al., 2005). Pour ces deux derniers exemples, les mécanismes mis en jeu n'ont pas encore été identifiés.

Enfin, un dernier facteur sérique, MBL2 (Mannose Binding Lectin-2), reconnaît le mannose et la N-acétylglucosamine de surface des bactéries et active la voie classique du complément. Le gène *MBL2* présente un polymorphisme et certaines formes alléliques seraient responsables d'une susceptibilité différentielle à plusieurs pathologies infectieuses dont la malaria (Luty et al., 1998). Des mutations situées dans les codons 54 et 57 du gène *MBL2* conduiraient à une plus faible production de la protéine, ce niveau de protéines étant associé à la malaria au Gabon (Luty et al., 1998).

B. Un exemple de résistance totale face à *Toxoplasma gondii*

L'interaction qui se produit entre le rat et *Toxoplasma* représente un autre exemple frappant faisant intervenir un parasite protozoaire. *Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire qui infeste l'homme mais aussi un large spectre d'hôtes vertébrés. Des études épidémiologiques ont indiqué que la constitution génétique de l'hôte et celle du parasite étaient impliquées dans l'expression de la toxoplasmose (Couvreur et al., 1976 ;

Sibley et al., 2002). Les études génétiques étant difficilement réalisables sur l'homme, celles-ci ont été menées sur des animaux modèles. Les résultats ainsi obtenus ont pu être transposés à l'homme en utilisant la génomique comparée (Jacob & Kwitek, 2002 ; Korstanje & Paigen, 2002). En effet, chez les rats comme chez l'homme, la toxoplasmose est asymptomatique (Dubey & Frenkel, 1998) ce qui fait du rat un modèle adéquat contrairement à la majorité des souches de souris qui développe une toxoplasmose sévère. De façon surprenante, la souche de rats Lewis présente une résistance totale vis à vis de *Toxoplasma* (Kempf et al., 1999) contrairement aux souches de rats BN et F344 qui sont susceptibles. L'existence de ce polymorphisme de compatibilité a été mise à profit pour rechercher les gènes responsables de la résistance. Des croisements ont montré l'effet dominant du ou des gènes impliqués (Sergent et al., 2005) et de récentes études ont identifié le locus *Toxo1* comme locus associé à la résistance au parasite (Cavaillès et al., 2006). Ce locus contient 86 gènes, et des expériences supplémentaires sont en cours afin d'identifier le ou les gènes impliqués.

C. Les ruminants face aux nématodes gastro-intestinaux

Le polymorphisme de compatibilité n'est pas propre aux parasites protozoaires, ce phénomène est aussi observé pour des systèmes impliquant des macro-parasites. Les ruminants ovins et bovins et les nématodes gastro-intestinaux qui les parasitent, illustrent tout à fait ce polymorphisme de compatibilité. L'infestation des troupeaux par ces nématodes est responsable de pathologies graves et d'énormes pertes de production (Thomas et al., 1984 ; Hawkins, 1993 ; Ballweber, 2006).

Chez les ovins, plusieurs espèces de nématodes gastro-intestinaux appartenant à la famille des Trichostrongyloidea sont responsables de ces problèmes : *Teladorsagia* (*Ostertagia*), *Trichostrongylus*, *Nematodirus* et *Haemonchus* (Keane et al., 2006). Les moutons de race Perendale présentent un polymorphisme de compatibilité, certains sont susceptibles et d'autres sont résistants vis à vis de ces nématodes. Dans le but d'établir une méthode naturelle du contrôle des parasites, des lignées susceptibles et résistantes ont été sélectionnées en fonction du nombre d'œufs de nématodes relargués dans les fèces. Ce nombre est inférieur chez les animaux résistants (Morris et al., 2005). Le nombre de nématodes adultes est également inférieur chez les animaux résistants (Diez-Tascon et al., 2005). Cependant, cette méthode reste laborieuse et coûteuse. Des études comparatives des transcrits des deux lignées non infestées ont révélé des différences constitutives de l'expression des gènes. Malgré ce, à l'heure actuelle, les gènes impliqués dans cette

compatibilité différentielle n'ont pas été identifiés. L'obtention de ces gènes pourraient permettre de développer des marqueurs génétiques qui pourraient être utilisés dans les programmes de sélection des élevages (Keane et al., 2006).

Chez les bovins, le cas diffère quelque peu. De manière générale, la plupart des parasites communs trouvés chez le bétail stimule la mise en place d'une immunité protectrice effective chez les animaux après que le troupeau ait passé plusieurs mois dans les pâturages, permettant ainsi de réduire de manière significative le nombre de parasites (Gasbarre & Canals, 1989). En revanche, le bétail reste susceptible à l'infestation par *Ostertagia* dont l'impact économique est le plus important dans les régions tempérées du Monde (Gasbarre et al., 2001). De même que pour les moutons, des études ont montré que le nombre d'œufs de parasites retrouvés dans les fèces (EPG) étaient fortement influencé par le génotype de l'hôte (Leighton et al., 1989) et que ce caractère était transmissible (Gasbarre et al., 1990). De ce fait, un programme de sélection a été initié afin d'identifier les gènes de l'hôte qui pourraient contrôler les mécanismes de susceptibilité-résistance face aux parasites. Les veaux issus des croisements ont pu être séparés en trois groupes : le groupe I qui n'a jamais montré de valeurs élevées d'EPG ; le groupe II qui montrait une forte augmentation des valeurs d'EPG durant les 2 premiers mois passés dans les pâturages puis ces valeurs chutaient jusqu'à atteindre des niveaux équivalents à ceux du groupe I ; et le groupe III qui maintenait des valeurs élevées d'EPG. Pour chacun de ces phénotypes, une correspondance a pu être établie : le groupe I correspondrait à une résistance innée, le groupe II présenterait une résistance acquise et le groupe III contiendrait les animaux susceptibles (Gasbarre et al., 2001). Ces résultats montrent bien que les populations naturelles de veaux à l'état naïf présentent un polymorphisme de compatibilité pour les parasites gastro-intestinaux. Des études en génétique des populations sont en cours, mais aucun gène de la résistance n'a encore été identifié.

II. Le polymorphisme de compatibilité et hôtes invertébrés

Qu'en est-il dans les systèmes impliquant un hôte invertébré ? Le polymorphisme de compatibilité a été également mis en évidence dans plusieurs de ces systèmes décrits dans cette partie. Les travaux effectués, impliquant majoritairement un hôte invertébré de la classe des Insectes, ont permis d'identifier des gènes candidats potentiellement responsables de ce polymorphisme. Ces systèmes faisant intervenir des hôtes vecteurs, la compatibilité est synonyme de compétence vectorielle (exceptée pour *Drosophila melanogaster*, §E.). Le fait que la grande majorité des résultats soit obtenue pour ces insectes vecteurs s'explique par la disponibilité des données les concernant comme l'accès récent à leur génome (*Anopheles gambiae*, *D. melanogaster* et plus récemment, *Glossina morsitans* et *Aedes aegypti*). Bien que les hôtes invertébrés soient des éléments clés de la transmission de parasites très souvent responsables de maladies humaines, les recherches s'étaient jusqu'alors focalisées sur l'interaction entre l'hôte vertébré et le parasite, ce qui explique le décalage important entre les connaissances acquises concernant ces deux interactions (Beerntsen et al., 2000).

A. L'interaction anophèle-*Plasmodium*

Les moustiques d'une même espèce présentent un polymorphisme de compatibilité vis à vis de parasites tels que *Plasmodium*. Des souches susceptibles et résistantes à différentes espèces de *Plasmodium* ont été sélectionnées et étudiées morphologiquement (Vargas, 1949). Des études récentes ont montré que deux types de mécanismes étaient impliqués dans la compétence vectorielle d'*A. gambiae* : la lyse des oocinètes dans le tube digestif et la mélanisation humorale qui correspond à l'encapsulation de l'oocinète environ 16 à 24 heures après l'ingestion d'un repas de sang (Collins et al., 1986 ; Vernick et al., 1995). Ces deux mécanismes permettent d'éliminer complètement les parasites présents dans le moustique. Le contrôle génétique de ces processus est assez complexe. La mélanisation humorale serait contrôlée par un locus majeur *Pen1* (*Plasmodium* encapsulation locus 1) et par deux autres loci *Pen2* et *Pen3* dont l'effet sur la mélanisation du parasite serait plutôt mineur (Zheng et al., 1997). De plus, la contribution relative de chaque locus pourrait varier en fonction de l'espèce de parasite encapsulée (Zheng et al., 2003).

L'analyse fonctionnelle *in vivo* de gènes candidats réalisée suite à l'injection d'ARN double brin chez *A. gambiae* a mis en évidence que le système immunitaire du moustique était

un facteur déterminant dans la compatibilité (Blandin et al., 2002). Plusieurs gènes impliqués dans le processus d'élimination de *Plasmodium* ont été identifiés.

TEP1 code une protéine appartenant à la famille des TEPs (thioester-containing proteins), potentielle molécule de reconnaissance des parasites (Blandin et al., 2004). *TEP1* est sécrétée par les hémocytes du moustique dans l'hémolymphe. Elle possède la propriété de reconnaître les microorganismes et de les cibler afin qu'ils soient détruits (Levashina et al., 2001). Il a été démontré que cette molécule était un des facteurs responsables de la compétence vectorielle d'*A. gambiae* et donc du polymorphisme de compatibilité (Blandin et al., 2004). La liaison de *TEP1* à la surface des oocinètes conduit à la mort du parasite chez les anophèles susceptibles et résistants. Cette fonction a été démontrée par l'application de la technique de l'ARN interférence. L'inactivation du gène *TEP1* a permis d'augmenter le nombre d'oocystes chez les individus susceptibles et de convertir les individus résistants en individus hautement susceptibles. Par contre, le mécanisme entraînant la mort du parasite reste encore inconnu (Blandin et al., 2004). Bien que *TEP1* intervienne de la même façon dans les deux souches, deux différences majeures ont été observées. La première est relative aux cinétiques et à l'efficacité du processus de mort du parasite : environ 80% des oocinètes sont tués chez les moustiques susceptibles 32 heures post-infestation, alors que la totalité des oocinètes est tuée chez les moustiques résistants dans la même période de temps, dont 80% meurent dans les premières 24 heures. La seconde différence concerne le devenir des parasites morts. Les parasites sont éliminés par lyse dans la souche susceptible alors que dans la souche résistante, les parasites sont lysés et encapsulés. Ce devenir serait contrôlé par des gènes différents de *TEP1* (Blandin et al., 2004). De plus, les souches d'anophèles susceptibles et résistants présentent un polymorphisme allélique pour le gène *TEP1*. L'allèle *TEP1s* est associé à la souche susceptible alors que l'allèle *TEP1r* est détecté uniquement chez la souche résistante. L'analyse comparative des séquences de ces deux allèles a mis en évidence de nombreux polymorphismes dans la région thioester. Les variations de séquence observées entre ces deux allèles pourraient affecter la réactivité et/ou l'efficacité de la protéine et pourraient expliquer la compatibilité différentielle des deux souches (Blandin et al., 2004).

LRIM1 (Leucine Rich-repeat Immune gene 1) code une protéine appartenant à la famille des PRRs (Pattern Recognition Receptors) dont le taux des transcrits augmente suite à une infestation par des bactéries ou par *Plasmodium* (Christophides et al., 2002 ; Dimopoulos et al., 2002). Le gène *LRIM1* est présent chez les deux souches d'anophèles. L'inactivation de ce gène a montré une forte augmentation du nombre d'oocystes résultant de la transformation des oocinètes que ce soit dans la souche susceptible ou résistante (Volz et al., 2006). Ce

résultat signifie que LRIM1 est responsable de la mort des parasites, mais le mécanisme d'action reste à définir (Osta et al., 2004). De la même façon que pour TEP1, on pourrait supposer que des variations de séquence de *LRIM1* seraient à l'origine de l'élimination partielle des parasites chez la souche susceptible, ce qui pourrait également expliquer la compatibilité différentielle des deux souches.

Alors que l'encapsulation mélanotique est un processus d'élimination des parasites tués *via* TEP1 ou LRIM1 dans la souche résistante, ce même mécanisme serait responsable de la mort et de l'élimination des parasites dans la souche susceptible modifiée génétiquement (Osta et al., 2004). En effet, l'inactivation des gènes codant deux c-type lectins CTL4 (c-type lectin 4) et CTLMA2 (c-type lectin mannose binding 2) a conduit à une élimination massive des parasites par mélanisation chez cette souche susceptible. Ce résultat démontre l'implication de ces deux c-type lectins dans l'inhibition de l'encapsulation mélanotique des parasites survivants chez les individus susceptibles. Les gènes *CTL4* et *CTLMA2* ont donc un effet protecteur sur les oocinètes, leur effet prédominant étant de promouvoir la susceptibilité en inhibant le processus de mélanisation du parasite (Osta et al., 2004).

Bien que l'identification de gènes antagonistes ou protecteurs permettent de progresser dans la compréhension des mécanismes responsables de la compétence vectorielle et donc du polymorphisme de compatibilité, les rôles précis de ces gènes restent à élucider.

L'étude de l'interaction entre *A. gambiae* et *P. falciparum* a été réalisée en populations naturelles où un moustique parasite ne contient généralement pas plus d'une dizaine d'oocystes (Pringle, 1966 ; Billingsley et al., 1994). Cette étude a montré que les populations de moustiques présentaient une fréquence élevée des allèles transmissibles impliqués dans la résistance. Deux loci liés à la résistance ont ainsi été mis en évidence : *Pfin1* et *Pfin2* (Niare et al., 2002). Ces allèles pourraient être des facteurs clés qui permettraient de limiter le développement du parasite dans le vecteur en milieu naturel. Cependant les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore connus.

B. L'interaction glossine-Trypanosoma

Les mouches tsé-tsé du genre *Glossina* sont les vecteurs des Trypanosomes, parasites protozoaires. Des populations naturelles sont résistantes au parasite et seulement 10% des glossines en milieu naturel ou en laboratoire présentent une infestation du tube digestif (Aksoy, 2003 ; Gibson & Bailey, 2003). Durant les trois premiers jours suite à l'infestation par *Trypanosoma brucei*, les parasites se multiplient de façon exponentielle dans le tube

digestif de la mouche. Au troisième jour, le nombre de parasites augmente encore ou est maintenu à un niveau élevé chez certains vecteurs alors que le nombre de parasites commence à chuter, allant jusqu'à l'élimination complète des parasites au cinquième jour chez d'autres glossines. Les glossines peuvent être séparées en deux groupes distincts suivant leur niveau d'infestation. Dans le premier groupe, le niveau d'infestation est élevé alors que dans le second, il n'est pas détectable (Gibson & Bailey, 2003). Ces vecteurs présentent donc un polymorphisme de compatibilité vis à vis de ce parasite.

Différents facteurs pourraient être responsables de l'élimination des parasites qui se produit à partir du troisième jour. Plusieurs preuves indirectes impliqueraient les lectines présentes dans le tube digestif de la glossine dans ce processus. Une lectine spécifique de la D-glucosamine et ayant une spécificité moindre pour la N-acetyl-D-glucosamine identifiée dans le tube digestif de la glossine serait capable de se lier au parasite (Ibrahim et al., 1984 ; Ingram & Molyneux, 1988). Des expériences ont montré que l'ingestion de ces sucres qui lient les lectines et de ce fait inhibent leur action, entraînerait une augmentation significative de la proportion de glossines infestées (Maudlin & Welburn, 1987 ; Mihok et al., 1992 ; Welburn et al., 1994 ; Peacock et al., 2006). De plus, le moment auquel ces lectines sont sécrétées correspond à la période pendant laquelle les parasites sont éliminés, des taux significatifs de lectines étant détectés au troisième jour (Lehane & Msangi, 1991). Ces lectines seraient responsables de l'élimination de la majorité des trypanosomes en déclenchant un processus nommé proto-apoptosis chez le parasite (Welburn et al., 1999; Pearson et al., 2000). Cependant, à l'heure actuelle, aucune lectine trypanocide n'a encore été purifiée (Aksoy et al., 2003).

D'autres expériences ont montré que le système immunitaire des glossines pourrait également être un facteur responsable de la compétence vectorielle. Les glossines sont capables de détecter la présence de pathogènes tels que les trypanosomes dans leur tube digestif, ceux-ci interagissant probablement avec le système immunitaire antimicrobien du vecteur. Ce mécanisme semble assez surprenant, les peptides antimicrobiens étant des facteurs généralement impliqués dans l'élimination des microorganismes (bactéries, champignons) et considérés comme inactifs contre les parasites. Cependant, une augmentation des taux de transcrits correspondant à certains peptides antimicrobiens –attacine, défensine– a été effectivement observée dans le corps gras et dans l'hémolymphe à partir du troisième jour post-infestation (Hao et al., 2001 ; Boulanger et al., 2002a ; Hao et al., 2003). De plus, des expériences conduites avec l'attacine recombinante ont montré que ce peptide possédait, *in vitro*, une forte activité inhibitrice sur les trypanosomes, en plus de son activité bactéricide.

D'autre part, la prise d'un repas de sang parasité, supplémenté du peptide recombinant a réduit radicalement la prévalence des parasites dans le tube digestif. Ces résultats suggèrent que l'attacine possède une activité trypanolytique (Hu & Aksoy, 2005). De récents résultats ont démontré, *in vivo*, l'implication dans la compatibilité des peptides antimicrobiens régulés par la voie Imd par l'application de la technique d'ARN interférence (Hu & Aksoy, 2006). *Relish*, gène dont le produit participe à la voie Imd, active la synthèse des peptides antimicrobiens suivants : cécropine, diptéricine, attacine, défensine et metchnikowine (Hedengren et al., 1999 ; Leulier et al., 2000). L'inactivation des gènes *attacine* et *Relish* chez *Glossina morsitans morsitans* a permis de démontrer (i) le rôle de *Relish* en tant que régulateur de la transcription des peptides antimicrobiens chez la glossine et (ii) que ces peptides influençaient la prévalence de l'infestation parasitaire ainsi que les niveaux de densité. Le nombre de parasites a nettement augmenté suite à l'inactivation du gène *attacine*, l'effet provoqué par l'inactivation de *Relish* étant encore plus significatif. La voie Imd étant constituée de multiples effecteurs, l'impact plus prononcé de l'inactivation de *Relish* sur la susceptibilité pourrait refléter les effets combinés de ces peptides dont l'attacine ferait partie (Hu & Aksoy, 2006).

Un autre exemple frappant de l'implication des peptides antimicrobiens dans la susceptibilité-résistance peut être observé chez *Stomoxys calcitrans*, insecte piqueur sympatrique des glossines (Boulanger et al., 2002b). Il possède des caractéristiques anatomiques et physiologiques du tube digestif très semblables à celles de la glossine et se nourrit sur les mêmes hôtes vertébrés que les glossines, s'exposant ainsi aux trypanosomes. Cependant, *S. calcitrans* n'est pas vecteur de ces parasites. Un peptide antimicrobien spécifique de cet insecte a été identifié à partir d'extraits protéiques de l'épithélium du tube digestif, la stomoxyne. Cette molécule, exprimée de façon constitutive, présente une activité trypanolytique qui s'ajoute aux activités bactéricides et fongicides. Le gène codant ce peptide a été recherché dans le génome de *Glossina*, sans succès. Ce peptide antimicrobien pourrait donc être responsable de la résistance de *S. calcitrans* à *Trypanosoma* (Boulanger et al., 2002b).

C. L'interaction moustique-nématodes filaires

Les moustiques, responsables de la transmission de nombreux parasites protozoaires, sont également impliqués dans les cycles de vie de parasites métazoaires tels les nématodes filaires.

MacDonald et ses collègues ont démontré, il y a plus de 40 ans, que le caractère héréditaire de la susceptibilité-résistance dans le modèle *Aedes aegypti*-filaires était récessif, lié au sexe et déterminé par un gène unique f^m (MacDonald, 1962a). Ce gène contrôlerait la susceptibilité-résistance du moustique vis à vis des parasites *Brugia malayi*, *B. pahangi* et *Wucheria bancrofti* et non celle vis à vis de *Dirofilaria immitis* et *D. repense* (MacDonald, 1962a ; Macdonald & Ramachandran, 1965). D'autres gènes pourraient également être impliqués, deux QTL (Quantitative trait loci), *fsb* [1, LF178] et *fsb* [2, LF98], ayant été identifiés par la technique des RFLPs. Ces loci affectent la susceptibilité-résistance du vecteur (Severson et al., 1994). Un polymorphisme de compatibilité est observé parmi les différentes espèces de moustiques mais également parmi les différentes souches provenant de la même espèce (MacDonald, 1962b ; MacDonald, 1962a ; Macdonald & Ramachandran, 1965 ; Macdonald & Sheppard, 1965). Cependant, les facteurs responsables de la compatibilité ne sont pas encore connus. A l'heure actuelle, deux mécanismes prédominants impliqués dans le système de défense du moustique participeraient aux processus de la compatibilité : les peptides antimicrobiens, dont il a déjà été fait mention dans le paragraphe précédent et l'encapsulation mélanotique.

En ce qui concerne les peptides antimicrobiens, les premières études ont montré que l'injection de cécropines synthétiques inhibait, *in vivo*, le développement de plusieurs espèces de *Brugia* (Chalk et al., 1995). D'autres expériences ont montré qu'après l'activation du système de défense d'*A. aegypti* par l'inoculation de bactéries ou par blessure de la cuticule, le nombre de parasites était réduit chez ces moustiques. Ces résultats suggèrent que les facteurs impliqués dans l'immunité induite par la présence de bactéries ou par une blessure pourraient éliminer les parasites. Bien que la présence de peptides antimicrobiens tels que la défensine ait été détectée chez *A. aegypti* (Lowenberger et al., 1995), son induction n'a pas été observée suite à l'ingestion d'un repas de sang infesté chez la souche susceptible et dans aucune des quatre souches résistantes testées (Lowenberger et al., 1996). Une étude comparative du contenu protéique des tissus thoraciques -site du développement du parasite chez le moustique- prélevés sur une souche d'*A. aegypti* susceptible et deux souches résistantes à *B. malayi* a été réalisée (Wattam & Christensen, 1992). Sept polypeptides

spécifiques des deux souches résistantes ont pu être identifiés après l'ingestion d'un repas de sang parasité ou non. Un ou plusieurs de ces polypeptides pourraient empêcher le développement des parasites (Wattam & Christensen, 1992).

L'encapsulation mélanotique est un mécanisme qui requiert les hémocytes, la mélanine ainsi que des composants humoraux chez le moustique. Ce mécanisme joue un rôle majeur dans l'élimination des parasites métazoaires tels que les filaires chez le moustique (Christensen, 1981 ; Christensen et al., 1984 ; Christensen & Tracy, 1989 ; Chen & Chen, 1995 ; Liu et al., 1997 ; Beerntsen et al., 2000). Le vecteur *Armigeres subalbatus* est naturellement résistant à l'infestation par *B. malayi*. Il élimine la majorité des microfilaires qui atteignent l'hémolymph par une réaction d'encapsulation, alors que ce même moustique est susceptible à *B. pahangi* qu'il laisse se développer (Yamamoto et al., 1985). Les enzymes et les substrats impliqués dans la cascade ont été clairement identifiés (Beerntsen et al., 2000). Des études ultrastructurales et des observations réalisées *in vitro* de la réponse mélanotique ont suggéré que les hémocytes auraient un rôle crucial dans la reconnaissance et la destruction du parasite (Chen & Laurence, 1985 ; Christensen & Forton, 1986 ; Chikilian et al., 1994). Dernièrement, les processus déclencheurs de cette réponse ainsi que l'identification et la caractérisation des molécules impliquées dans la reconnaissance ont été rapportées dans le système *A. subalbatus*-*D. immitis* (Wang et al., 2005). La protéine AsGRP (*A. subalbatus* β 1,3-glucan recognition protein) a été caractérisée chez *A. subalbatus*. Cette protéine est sécrétée par les hémocytes dans l'hémolymph. Suite à l'inoculation de bactéries ou à l'injection de parasites, le taux de transcrits correspondant à AsGRP est très fortement induit. Cette molécule présente une affinité particulière pour le β 1,3-glucan, composant retrouvés à la surface des bactéries et des champignons. De façon assez surprenante, elle présente également une affinité pour des molécules présentes à la surface du parasite. AsGRP fonctionnerait alors en tant que PRR (Pattern Recognition Receptor). Cette liaison entraîne l'activation de la pro-phénoloxydase, enzyme clé de la voie de synthèse aboutissant à l'encapsulation mélanotique. La fonction de cette molécule a été démontrée par l'application de la technique de l'ARN interférence. L'injection des parasites a été réalisée suite à l'inactivation du gène qui code AsGRP. Aucun des parasites n'était encapsulé, démontrant la nécessité de AsGRP dans le processus d'encapsulation (Wang et al., 2005). Cette protéine de reconnaissance pourrait être impliquée dans la susceptibilité différentielle des différentes souches de moustiques vis à vis des filaires.

D. L'interaction Mouche des sables-*Leishmania*

La susceptibilité et la résistance de la mouche des sables face au développement complet du parasite protozoaire du genre *Leishmania* semblent être sous contrôle génétique, et dans le cas de *Phlebotomus papatasi*, ce contrôle serait polygénique (Wu & Tesh, 1990a). Ce polymorphisme de compatibilité pour *Leishmania major* a été observé en population naturelle sur trois souches de phlébotomes provenant de régions géographiques différentes (Wu & Tesh, 1990b). La susceptibilité-résistance dépendrait du devenir des multiples interactions qui se produisent dans le tube digestif de l'hôte (Kamhawi, 2006). Bien que les gènes de la compatibilité n'aient pas été identifiés, les différentes barrières observées chez les souches résistantes de vecteurs s'opposant au développement du parasite permettent d'envisager les fonctions auxquelles ces gènes pourraient être associés.

L'ingestion de sang induit plusieurs réponses physiologiques chez l'hôte dont la sécrétion d'enzymes digestives. La capacité du parasite à survivre aux attaques de ces enzymes est un des premiers événements déterminant la compatibilité, ces enzymes étant néfastes au développement du parasite (Sacks & Kamhawi, 2001 ; Volf et al., 2001 ; Ramalho-Ortigao et al., 2003). Pour surmonter cette attaque enzymatique, le parasite a mis en place une stratégie lui permettant de retarder ou d'inhiber le pic d'activité de ces enzymes, les modalités de cette stratégie n'étant pas encore complètement élucidées (Sacks & Kamhawi, 2001). Cependant, il semblerait que l'activité des enzymes protéolytiques soit inhibée pendant la digestion par des facteurs provenant du parasite compatible (Borovsky & Schlein, 1987). Ces facteurs seraient des glycoconjugués appartenant à la classe des molécules contenant des phosphoglycanes qui seraient soit attachés à la surface du parasite par un ancrage lipidique phosphatidylinositol (lipophosphoglycane, LPG), soit sécrétés en tant que protéophosphoglycane (PPG) (Schlein et al., 1990 ; Ilg et al., 1994 ; Mengeling & Turco, 1998). En effet, des parasites mutants, déficients pour ces molécules, ont été éliminés dans les premières 24 heures suite à l'ingestion du repas de sang. La restauration de l'expression de ces molécules a permis aux parasites de survivre (Sacks et al., 2000).

La prise d'un repas de sang induit également chez l'hôte, la sécrétion de lectines qui participent à la digestion et aux mécanismes de défense dirigés contre les parasites. Les parasites sont agglutinés par ces lectines (Grubhoffer et al., 1997). De plus, l'inhibition de l'activité de ces lectines conduit à une augmentation du nombre de parasites *L. major* chez *P. duboscqi*, indiquant que les lectines sécrétées ont un rôle important dans la survie du parasite et pourraient être impliquées dans la compatibilité (Volf et al., 1998 ; Volf et al., 2001).

Lors de la digestion, les mouvements de contraction du tube digestif ou péristaltisme participent à l'excrétion du repas de sang. Récemment, un neuropeptide myo-inhibiteur a été caractérisé chez *L. major*. Ce neuropeptide arrête le péristaltisme de *P. papatasi* et de *Lutzomyia longipalpis* qui sont des vecteurs compatibles, alors que l'action de ce même peptide provenant de parasites non compatibles s'avère beaucoup moins efficace. Ce facteur permettrait donc au parasite de persister dans le tube digestif (Vaidyanathan, 2004 ; Vaidyanathan, 2005).

L'excrétion du contenu du tube digestif après digestion pourrait entraîner et éliminer les parasites. Des études comparant le développement de *L. major* dans des vecteurs susceptibles et résistants ont montré qu'après le troisième jour, les parasites avaient été éliminés dans la souche résistante. Cette élimination correspondait à la digestion du repas de sang et à l'élimination des déchets par défécation (Lawyer et al., 1990 ; Kamhawi et al., 2000). L'incapacité des parasites à persister dans le tube digestif après la digestion serait reliée à leur incapacité à s'attacher à la paroi *via* des sites spécifiques. Des études ultrastructurales ont montré que les parasites s'attacheraient par leur flagelle à l'épithélium et cet attachement se ferait par les LPGs cités précédemment (Lang et al., 1991 ; McConville et al., 1992). Ces LPGs présentent une structure polymorphe quant à leur substitution en résidus sucrés suivant le parasite observé (Turco et al., 1987 ; McConville et al., 1992 ; McConville et al., 1995 ; Mahoney et al., 1999 ; Sacks, 2001). De nombreux résultats confirment l'implication des LPGs dans l'attachement des parasites : (i) les LPGs purifiés se lient à l'épithélium du tube digestif *in vitro* (Kamhawi et al., 2000) ; (ii) les LPGs inhibent complètement l'attachement des parasites à l'épithélium du tube digestif lors de tests *in vitro* (Sacks et al., 1995) ; (iii) les parasites mutants déficients en LPGs ne réussissent pas à s'attacher ou à persister, *in vivo*, dans le tube digestif après excrétion du repas de sang (Sacks et al., 2000). La liaison du parasite à la surface des microvillosités du tube digestif de l'hôte serait un événement indispensable au développement du parasite qui pourrait expliquer le polymorphisme de compatibilité (Sacks & Kamhawi, 2001).

Le récepteur de ces LPGs a été identifié chez les hôtes *P. papatasi* et *P. duboscqi*, il s'agit de PpGalec, molécule de la famille des galectines (Kamhawi et al., 2004). Ppgalec est capable de se lier aux LPGs et cette association est critique pour la survie du parasite, mais la fonction première de ce récepteur est certainement détournée au profit du développement du parasite. L'expression de ce récepteur est spécifique à *P. papatasi* et à *P. duboscqi*, vecteurs compatibles de *L. major* dans la nature. Les souches ne possédant pas cette molécule sont résistantes à ces parasites. Compte tenu de la grande diversité que présentent les LPGs, on

peut s'attendre à ce que cette diversité s'applique aussi aux récepteurs (Kamhawi et al., 2004). Ceci est tout à fait représentatif du processus de co-évolution, conduisant à une « course aux armements ». La composition et la longueur des chaînes latérales sucrées des LPGs résulteraient de la pression de sélection exercée par la diversité des récepteurs des vecteurs. Ce récepteur, par sa présence ou son absence et/ou par ses différentes formes, est responsable de la compétence vectorielle et du polymorphisme de compatibilité de l'hôte (Sacks, 2001).

La caractérisation d'un peptide antimicrobien, une défensine, a été rapportée dans le système *P. duboscqi*-*L. major* (Boulanger et al., 2004). Ce peptide possède une activité antiparasitaire ainsi qu'une activité antibactérienne et antifongique. Il a été détecté dans le tube digestif et dans l'hémolymphe. Il a été démontré que l'expression de ce peptide antimicrobien était induite suite à l'ingestion d'un repas de sang parasité. Cette induction serait liée à la présence des phosphoglycannes (LPG) à la surface du parasite, l'induction observée suite à l'ingestion de parasites mutants n'exprimant pas ces molécules étant beaucoup plus faible. Dans ce cas, la défensine participerait au contrôle subtil du développement de la population de parasites (Boulanger et al., 2004).

E. L'interaction *Drosophila*-guêpe parasitoïde

Cette interaction fait figure de cas particulier, les parasitoïdes n'étant pas considérés comme de « vrais » parasites dans la mesure où ils entraînent la mort de leur hôte : la guêpe parasitoïde dépose dans le corps de la drosophile un œuf dont le développement aboutira à la mort de l'hôte compatible (Carton et al., 1986). Un polymorphisme de compatibilité a été observé dans les populations naturelles, mettant en évidence des individus susceptibles et résistants au parasitoïde. Cette compatibilité serait déterminée génétiquement et serait spécifique des espèces et même des souches, des études ayant démontré que le succès d'infestation dépendrait du statut génétique à la fois de l'hôte et du parasitoïde (Dupas & Boscaro, 1999 ; Poirie et al., 2000). Dans le système *Drosophila melanogaster*-*Leptopilina boulardi*, le mécanisme permettant d'empêcher l'installation du parasitoïde est l'encapsulation mélanotique qui consiste ici, en la formation de couches successives d'hémocytes tout autour de l'œuf de la guêpe conduisant à une capsule cellulaire mélanisée (Carton & Nappi, 1997). Des croisements réalisés sur des souches susceptibles et résistantes de *D. melanogaster* à *L. boulardi* ont démontré que la capacité à encapsuler le parasitoïde était déterminée par un gène majeur *Rlb* (Résistance à *L. boulardi*). Ce gène possède deux allèles : *Rlb*⁻, allèle susceptible et *Rlb*⁺, allèle résistant dominant présent chez les individus

capables d'encapsuler le parasitoïde (Carton et al., 1992). Ce gène serait impliqué dans le polymorphisme de compatibilité de ce système. Sa localisation, réalisée par différentes approches complémentaires aurait permis d'aboutir à la caractérisation moléculaire de *Rlb*, ces résultats n'étant pas encore publiés (Carton et al., 2005).

Un second locus, *Rat* (Résistance à *Asobara tabida*), impliqué dans la capacité à encapsuler une autre espèce de parasitoïde, *A. tabida*, a également été mis en évidence par des études de croisements entre souches susceptibles et résistantes de *D. melanogaster* à ce parasitoïde. Ce locus présente également deux allèles *Rat*⁺ et *Rat*⁻, *Rat*⁺ étant dominant (Orr & Irving, 1997 ; Benassi et al., 1998). Il a été localisé dans la même région que *Rlb*. Ces résultats montrent l'implication d'au moins deux systèmes génétiques différents dans la compatibilité vis à vis de deux espèces de parasitoïdes (Poirie et al., 2000).

III. Les interactions mollusque-trématode

Les travaux réalisés lors de cette thèse se sont attachés à rechercher des gènes candidats potentiellement impliqués dans le polymorphisme de compatibilité que présentent les interactions impliquant un hôte invertébré mollusque et un parasite trématode. Cette partie s'attache à décrire ces modèles, leurs caractéristiques, les interactions immunobiologiques qui peuvent se produire ainsi que ce qu'on sait du polymorphisme de compatibilité en prenant compte des approches expérimentales qui ont été mises en œuvre afin de trouver les mécanismes sous-jacents.

A. Généralités

Ces trématodes constituent un groupe important de vers parasites à large impact médical et vétérinaire. Le nombre d'espèces de trématodes est estimé à plus de 5000 (Gibson & Bray, 1994), parmi lesquelles certaines sont responsables de pathologies humaines telles que la bilharziose causée par les schistosomes qui est la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Plus de 200 millions de personnes dans le Monde sont touchées par cette maladie responsable du niveau élevé de morbidité et de mortalité dans 74 pays des régions tropicales et subtropicales. Deux cent quatre vingt mille personnes décèdent de cette maladie chaque année. Trois espèces spécifiques de schistosomes qui infestent l'homme sont majoritairement responsables des problèmes de santé publique : *Schistosoma mansoni*, présent principalement en Afrique et en Amérique du sud ; *S. haematobium*, que l'on retrouve en Afrique et au Moyen Orient ; et *S. japonicum* qui est endémique de l'Asie. Quatre-vingt pour cent de la transmission de cette maladie se produit en Afrique sub-saharienne. Tous les hôtes intermédiaires de ces parasites sont des mollusques gastéropodes d'eau douce (<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/diseaseinfo.htm>). Le trématode *Fasciola hepatica* dont le mollusque intermédiaire est également un mollusque gastéropode d'eau douce, est responsable de la distomatose hépatique, une pathologie humaine ré-émergente (McCarthy & Moore, 2000).

Les trématodes présentent des cycles de vie complexes et se développent généralement chez trois hôtes successifs (Figure 1). Le cycle est le suivant : le stade larvaire miracidium pénètre dans le premier hôte intermédiaire mollusque et se transforme en sporocyste. Les sporocystes secondaires (pour les schistosomes) ou les rédies (pour les échinostomes)

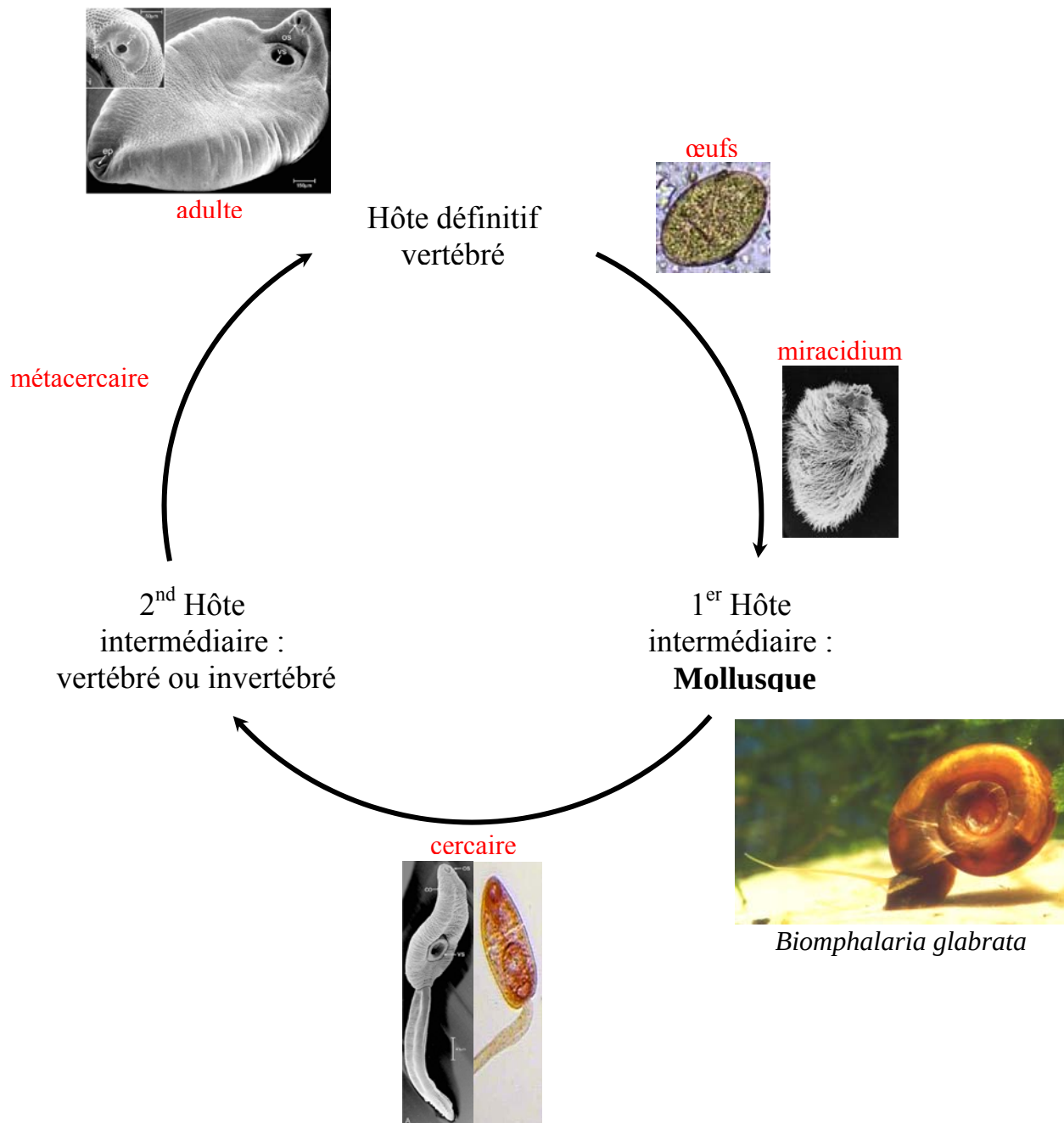


Figure 1 : Cycle de vie des trématodes. Les illustrations représentent différents stades d'*Echinostoma caproni*.

résultent d'une multiplication asexuée du parasite à l'intérieur de ce premier hôte intermédiaire. Puis les mollusques parasités émettent des cercaires, larves nageantes qui peuvent soit pénétrer directement dans l'hôte définitif (cas des schistosomes pour lesquels le cycle ne comporte que deux hôtes successifs), soit s'enkyster sur un substrat végétal (cas des cercaires de *F. hepatica* qui seront ensuite ingérées par l'hôte définitif), soit pénétrer dans un second hôte intermédiaire (invertébré ou vertébré) dans lequel les cercaires s'enkystent sous forme de métacercaires. Finalement, le parasite est transmis à l'hôte définitif vertébré où il atteint son stade adulte et se reproduit sexuellement. Cette dernière étape peut se faire de manière active par une larve nageante ou passive par ingestion des métacercaires enkystées.

B. Caractéristiques de l'interaction avec le premier hôte intermédiaire

Ce travail de thèse s'est plus particulièrement focalisé sur l'interaction avec le premier hôte intermédiaire qui se révèle être de façon exclusive un mollusque (van der Knaap & Loker, 1990). La compatibilité dans les interactions mollusque-trématode peut être extrêmement variable. Contrairement à l'interaction avec le second hôte intermédiaire, c'est une association extrêmement spécifique pour les deux participants puisque chaque espèce de trématodes ne peut se développer que dans une seule ou un très petit nombre d'espèces apparentées de mollusques (Esch & Fernandez, 1994). Cette spécificité peut aller jusqu'à se restreindre aux niveaux des populations et des souches (Lo & Lee, 1995 ; Webster & Woolhouse, 1998). Bien que cette interaction ne présente pas d'intérêt médical ou vétérinaire direct, elle est d'une grande importance pour la survie du parasite. Cette spécificité est une caractéristique qui a pour conséquence majeure de limiter les trématodes à impact médical tels que les schistosomes aux aires géographiques occupées par des mollusques gastéropodes compatibles (van der Knaap & Loker, 1990). La spécificité de l'hôte peut être influencée par plusieurs facteurs de type écologique, éthologique ou encore physiologique (Jourdan & Theron, 1987), mais également par une composante immunologique (van der Knaap & Loker, 1990). Par ailleurs, le parasite effectue une multiplication asexuée intense au sein de ce premier hôte intermédiaire mollusque. C'est un processus extrêmement important d'un point de vue démographique qui permet de compenser les pertes énormes subies par le parasite lors du changement d'hôte, sachant, qu'en moyenne, seulement six cercaires sur plusieurs milliers relarguées quotidiennement par un mollusque parasité par un schistosome réussissent à atteindre un hôte définitif (Theron, 2005). Cette spécificité stricte ajoutée à cette phase d'intense multiplication clonale font de ce mollusque un facteur clé de la transmission du

parasite aux hôtes définitifs vertébrés et plus globalement de l'expansion de la parasitose en milieu naturel.

Que le succès ou l'échec de l'infestation de l'hôte par un parasite soit le résultat d'un dialogue, d'une interaction complexe entre les mécanismes de défense de l'hôte et les stratégies d'infectivité du parasite est un fait largement accepté. Cependant, dans le cas d'une combinaison mollusque-trématode compatible, l'échec d'une infestation reflète généralement l'existence de processus de résistance chez le mollusque, alors que le succès de l'infestation révèle la susceptibilité de l'hôte mollusque. Ici, le terme « résistance » fait référence à la capacité inhérente des organismes à empêcher l'établissement et/ou le développement d'une espèce ou d'une souche de parasites compatibles (Coustau & Theron, 2004).

Ce concept de susceptibilité-résistance des mollusques vis à vis d'une infestation par des parasites trématodes semble approprié à la plupart des interactions impliquant des trématodes dont la stratégie d'évasion repose sur l'interférence. Dans les systèmes comprenant *B. glabrata* et différentes espèces d'*Echinostoma* ou encore dans le système *Pseudosuccinea columella*-*F. hepatica*, les parasites interfèrent de façon active avec les réponses de défense des mollusques susceptibles, alors que les hôtes résistants ne semblent pas affectés par ces effets immunosuppresseurs (DeGaffe & Loker, 1998 ; Humbert & Coustau, 2001 ; Gutierrez et al., 2003) (Cf §.III.C.). Par contre, l'existence de processus de résistance dans l'association *B. glabrata*-*S. mansoni* est remise en question (Theron & Coustau, 2005), ce débat n'étant pas récent (Wright, 1974). La plupart des études récentes se sont focalisées sur les bases génétiques et les aspects fonctionnels en utilisant des souches de mollusques et de parasites sélectionnées en laboratoire, le concept de résistance étant généralement accepté. Cependant, à la lumière de nouvelles observations faites pour le système *B. glabrata*-*S. mansoni* aussi bien au niveau des souches de mollusques qu'au niveau de l'individu et selon Basch (Basch, 1975), la compatibilité serait testée de façon indépendante pour chaque miracidium lors de l'interaction avec un même hôte. En effet, des coupes histologiques d'un mollusque *B. glabrata* réalisées suite à une infestation par plusieurs miracidia de *S. mansoni* ont révélé la présence de sporocystes dont le développement était normal mais également de sporocystes encapsulés (Theron & Coustau, 2005). Une autre interprétation de ces observations serait de considérer que le succès ou l'échec à l'infestation du mollusque résulte principalement de la capacité ou de l'incapacité d'un miracidium donné à éviter le système immunitaire inné de l'hôte qu'il pénètre. De ce fait, la réaction de défense de l'hôte dirigée contre le miracidium non-infestant ne serait plus envisagée comme un

mécanisme de résistance spécifique à *S. mansoni* mais plutôt comme une réponse de défense générale dirigée contre un organisme vivant, reconnu comme étant du non-soi. Le succès ou l'échec à l'infestation ne dépendrait pas du statut susceptible ou résistant du mollusque mais de la concordance (matched) ou de la non concordance (mismatched) des phénotypes de l'hôte et du parasite (Theron & Coustau, 2005). Une représentation de ce modèle prenant pour exemple la sélection de lignées susceptibles et résistantes est donnée dans la figure 2. Une souche de mollusques contrôle présentant 50% de susceptibilité pour une souche de parasites correspondrait à une association où la moitié des différents phénotypes de la souche de mollusques correspondrait aux phénotypes de la souche de parasites. La sélection d'individus susceptibles consisterait en l'élimination des phénotypes de la souche de mollusques qui ne correspondent pas aux phénotypes de la souche de parasites. Ce processus augmenterait le taux d'infestation. Par contre, la sélection d'individus résistants consisterait en l'élimination de la plupart des phénotypes de la souche de mollusques qui correspondraient à ceux de la souche de parasites, les phénotypes de la souche de mollusques différents de ceux de la souche de parasites seraient quant à eux, maintenus. Les mollusques ainsi sélectionnés, ne seraient pas exactement résistants à *S. mansoni* mais ne correspondraient pas au nombre limité de phénotypes des parasites employés lors de la sélection. De plus, il est à noter que ce nombre limité de phénotypes n'est pas du tout représentatif de la diversité génétique totale existant dans la population originelle de la souche de parasites ou dans une autre souche de parasites (Stohler et al., 2004). En effet, cette explication est étayée par le fait que des souches de mollusques sélectionnées comme étant résistantes pouvaient se montrer susceptibles à une autre souche de parasites (Webster & Woolhouse, 1998) ou à un isolat de parasites collecté de façon aléatoire à partir d'une même population de terrain qui se serait génétiquement diversifiée (Theron & Coustau, 2005).

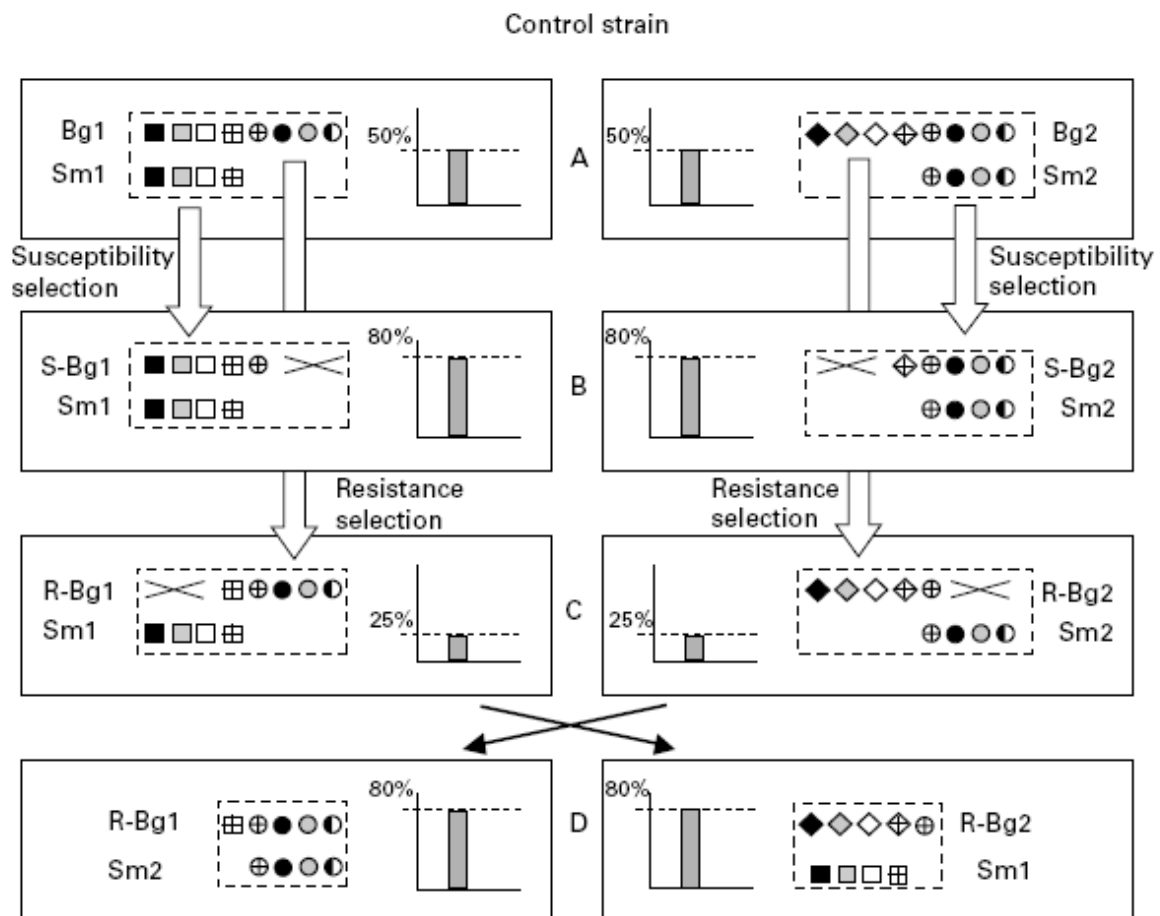


Figure 2 : Modèle de concordance des génotypes (matching genotype model).

Représentation schématique de la sélection d'une lignée de mollusques susceptibles et résistants à partir de deux souches de *B. glabrata* (Bg1 et Bg2) et de *S. mansoni* (Sm1 et Sm2). Les différents symboles représentent la diversité des génotypes représentative des mollusques et des parasites. Chaque histogramme représente le taux d'infestation. (A) Souche contrôle de mollusques présentant 50% de susceptibilité vis à vis d'une souche de parasites. (B) Sélection d'individus susceptibles (C) Sélection d'individus résistants. (D) Une souche de mollusques résistante à une souche de parasites peut être susceptible à une autre souche de parasites. D'après Théron & Coustau, 2005.

C. Les différentes stratégies d'évitement du parasite

La compatibilité hôte-parasite résulterait largement de la capacité des larves de trématodes à échapper aux défenses internes de l'hôte et ce, par diverses stratégies d'évasion. En effet, une fois dans l'hôte, le parasite est continuellement confronté à une réponse potentiellement hostile venant du mollusque. Ces stratégies d'évitement font appel à différents mécanismes (Figure 3).

1. Le camouflage moléculaire et le mimétisme moléculaire

Dans le cas des schistosomes, différents travaux orientent vers des hypothèses de camouflage/mimétisme moléculaire.

Il a été démontré que des larves de schistosomes adsorbaient à leur surface des déterminants macromoléculaires provenant de l'hôte (van der Knaap et al., 1985). Ce phénomène est appelé camouflage moléculaire. De cette façon les épitopes du parasite sont masqués empêchant toute reconnaissance et réponse du système interne de défense du mollusque.

En ce qui concerne maintenant le mimétisme, le schistosome semble posséder des gènes qui ont dû être sélectionnés au cours du temps et dont les produits d'expression seraient des déterminants communs à ceux du mollusque. Ces déterminants se trouveraient à la surface du parasite (Yoshino & Bayne, 1983 ; Damian, 1987) et ne provoqueraient pas de réponse de défense de la part du mollusque. De récents résultats ont démontré l'existence de deux épitopes oligosaccharidiques communs à *B. glabrata* et *S. mansoni* (Lehr et al., 2007), confortant des travaux réalisés il y a une vingtaine d'années (Dissous et al., 1986). Les motifs des épitopes du mollusque ont été identifiés, il s'agit de glycoprotéines N-glycosylées présentes dans l'hémolymphe. Des expériences complémentaires d'immunohistochimie visant à localiser ces épitopes chez le mollusque sont en cours.

Le fait que des stratégies passives d'évitement du système de défense du mollusque comme le camouflage moléculaire ou le mimétisme moléculaire puissent réellement protéger le parasite n'a pas été démontré. Cependant ce modèle est soutenu par certaines observations. Des miracidia de *Schistosomatium douthitti* irradiés peuvent pénétrer dans le mollusque et se transformer en sporocystes qui ne peuvent pas produire de cellules germinatives. Bien que ces sporocystes soient métaboliquement inertes, ils ne sont pas encapsulés. Ce phénomène

s'expliquerait par le fait que ces sporocystes présentent une surface qui n'active pas le système de défense du mollusque et donc qui les protègent de façon passive (Loker, 1978).

Pour revenir au modèle de concordance des génotypes développé précédemment, la compatibilité pourrait être définie comme la concordance entre les molécules du mollusque impliquées dans la reconnaissance et celles du parasite impliquées dans les mécanismes de mimétisme. Le parasite pourrait échapper au système de défense interne de l'hôte seulement si son phénotype génétiquement déterminé concorde avec le phénotype de l'hôte (Theron & Coustau, 2005).

2. Interférence par immuno-suppression, immuno-modulation

Les stratégies de nature plutôt passives qui viennent d'être évoquées sont celles qui semblent employées préférentiellement par les schistosomes. Quant aux echinostomes, ils possèderaient une stratégie d'évasion beaucoup plus active et agressive que celle des schistosomes : ils interfèreraient directement avec le système de défense du mollusque par l'intermédiaire de produits d'excrétion-sécrétion. La suppression ou la modulation des fonctions de défense de l'hôte par l'intermédiaire de produits d'excrétion-sécrétion ont été également rapportées pour de nombreuses espèces de parasites telles que les champignons entomopathogènes (Vilcinskas & Gotz, 1999), les nématodes ou les complexes nématobactériens (Pastrana et al., 1998 ; Ribeiro et al., 1999) ou encore d'autres helminthes (filaires, cestodes...) (Lightowers & Rickard, 1988).

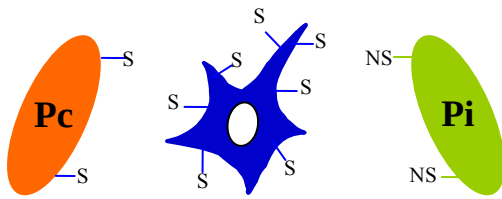
Les hémocytes sont les composants majeurs de la défense anti-digène des mollusques (van der Knaap & Loker, 1990). Ce sont des cellules phagocytaires professionnelles qui circulent dans l'hémolymph et migrent à travers les tissus connectifs, le système vasculaire des mollusques étant un système ouvert. Les hémocytes effectuent ainsi une surveillance continue. Ces cellules de défense semblent affectées de façon significative par la présence de larves d'echinostomes (Lie & Heyneman, 1977). Cet effet augmente avec le nombre de parasites (Lie & Heyneman, 1979) et devient maximum à proximité des parasites (Lie, 1982). Des observations réalisées sur des mollusques infestés ont montré que les hémocytes perdaient souvent leur capacité à adhérer en présence des sporocystes et avaient tendance à s'éloigner du site où étaient localisés les parasites (Lie & Heyneman, 1976). De plus, les hémocytes obtenus à partir de ces mollusques infestés sont altérés à plusieurs niveaux : leur morphologie (les cellules s'arrondissent) et leur capacité d'étalement (Noda & Loker, 1989a), leur capacité de phagocytose (Noda & Loker, 1989b). Des tests de cytotoxicité réalisés *in*

vitro avaient également révélés que les hémocytes provenant de mollusques infestés semblaient beaucoup moins efficaces dans l'élimination de larves de trématodes (Loker et al., 1986). Ces expériences consistaient à mettre en présence des hémocytes de la souche de *B. glabrata* 10R2 infestée ou non par *E. paraensei* avec des sporocystes de la souche de *S. mansoni* PR1. Alors que 90% des sporocystes sont éliminés par les hémocytes provenant de mollusques non infestés, seulement 25% le sont par les hémocytes provenant de mollusques infestés par *E. paraensei*. Cette différence significative d'efficacité renforce l'hypothèse de l'interférence. Alors que les hémocytes viennent très rarement au contact direct des sporocystes d'échinostomes, ceux-ci adhèrent immédiatement aux larves mortes d'échinostomes. Les échinostomes relargueraient donc de façon active ces produits d'excrétion-sécrétion toxiques pour les hémocytes (Loker & Adema, 1995). Tous ces résultats suggèrent que les hémocytes seraient les cibles de l'interférence.

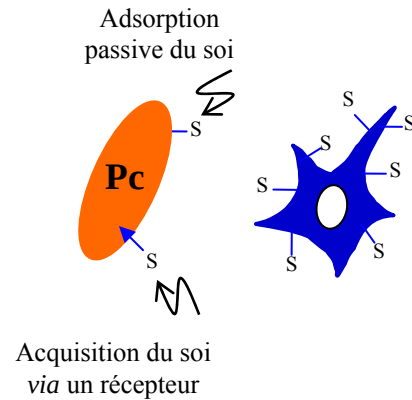
Bien que la survie des schistosomes semble reposer majoritairement sur une stratégie qui empêche la reconnaissance, et donc qui ne provoque pas de réponse de défense de la part de l'hôte, une immunomodulation beaucoup moins agressive, beaucoup plus subtile que celle des échinostomes a pu être mise en évidence. Elle se développerait beaucoup plus lentement, ses effets n'étant visibles que plus tardivement (Loker & Adema, 1995). Les sporocystes de schistosomes et/ou leurs produits d'excrétion-sécrétion inhiberaient également plusieurs fonctions des hémocytes telles que la biosynthèse des protéines (Lodes et al., 1991), leur mobilité (Lodes & Yoshino, 1990), la phagocytose (Fryer & Bayne, 1990 ; Amen et al., 1992) et l'élimination des bactéries (Nunez et al., 1994), mais d'une façon beaucoup moins prononcée que celle des échinostomes.

Compte tenu de toutes ces observations, les schistosomes et les échinostomes présentent des stratégies de contournement du système de défense de l'hôte qui, à première vue semblent fondamentalement différentes. Cependant, il semblerait que les trématodes emploient plutôt une combinaison des stratégies évoquées, la combinaison « choisie » étant propre à chaque espèce. Certains trématodes seraient donc plus représentatifs d'une stratégie que d'une autre. Malgré l'accumulation de toutes ces connaissances, à l'heure actuelle, encore aucune molécule permettant au parasite d'échapper au système interne de défense du mollusque n'a été identifiée et aucun mécanisme spécifique de l'interférence n'a été établi.

A. Mimétisme moléculaire

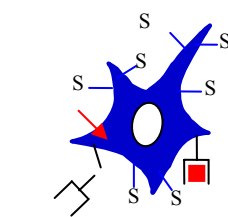


B. Camouflage moléculaire

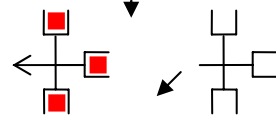


C. Interférence

Récepteurs et/ou molécules de reconnaissance de surface des hémocytes bloqués ou inactivés par les ES.



Relargage des produits d'excrétion-sécrétion parasitaires (ES).



Inhibition ou dégradation des molécules de reconnaissance circulantes (opsonines) dans l'hémolymphe.



Hémocyte



Parasite

Altérations évidentes suite à une infestation par des echinostomes des capacités d'adhérence et d'étalement des hémocytes : rétraction des pseudopodes, les cellules s'arrondissent.

Inhibition de la synthèse ou du relargage de produits cytotoxiques par les hémocytes.

Figure 3 : Les différentes stratégies d'évitement. (A) Le mimétisme moléculaire : Le parasite compatible (Pc) synthétise et expose à sa surface des déterminants moléculaires qui imitent le soi (S) alors que le parasite incompatible (Pi) synthétise des molécules qui stimulent une réponse (NS pour non-soi). (B) Le camouflage moléculaire : Pc acquiert des molécules de l'hôte de façon passive ou active et n'est pas reconnu. (C) L'interférence : les produits d'excrétion-sécrétion du parasite interfèrent activement avec une ou plusieurs étapes de la réponse antiparasitaire. D'après van der Knaap & Loker, 1990.

D. Travaux antérieurs menés sur la compatibilité : outils et voies de recherche utilisés

Les tous premiers travaux de recherche ont été motivés par l'observation de ce polymorphisme de compatibilité qui est largement répandu dans les interactions mollusque-trématode. Une des hypothèses de départ était que les interactions qui se produisent entre les gènes du mollusque et ceux du parasite influençaient le devenir de l'infestation (Basch, 1976). Dans ce paragraphe, sont développés les différentes voies de recherche menées ainsi que les différents outils utilisés depuis lors dans le but (i) d'identifier la nature précise des gènes et des produits associés responsables du succès ou de l'échec de cette interaction et (ii) d'élucider les mécanismes sous-jacents et considérés comme étant opérationnels dans les associations compatibles ou incompatibles.

1. La génétique fondamentale

Différentes voies de recherche ont été adoptées. Les premiers travaux ont utilisé une approche de génétique fondamentale et ont permis d'analyser le déterminisme génétique de la susceptibilité-résistance de différents isolats de mollusques. Le travail de Newton au début des années 50 sur *B. glabrata* a posé les bases de ce que nous savons aujourd'hui sur la génétique de ce mollusque. Les méthodes fondamentales de croisements qu'il a instaurées restent toujours adaptées aux études actuelles (Newton, 1953 ; Newton, 1954 ; Newton, 1955). Deux caractéristiques biologiques majeures de ce mollusque ont alors été utilisées et expliquent le succès de ces recherches : (1) chez ces mollusques, la pigmentation sauvage suit un schéma d'hérédité mendélien permettant de vérifier que les croisements se sont effectivement bien produits, et (2) *B. glabrata* est hermaphrodite et peut se reproduire par auto- ou allofécondation. Ces caractéristiques ont permis d'établir que la susceptibilité était un caractère héréditaire chez *B. glabrata* impliquant plusieurs gènes (Newton, 1953). Ces études ont ouvert la voie à une exploration plus approfondie de la résistance déterminée génétiquement chez un hôte invertébré, aire de recherche inexplorée à cette époque. Comme dans beaucoup d'autres systèmes biologiques, des recherches approfondies sur la génétique de ces systèmes nécessitaient d'avoir à disposition des populations possédant des phénotypes beaucoup mieux définis.

Les études ultérieures, et notamment celles de Richards et de ses collaborateurs sur l'interaction *B. glabrata*-*S. mansoni* (Richards & Merritt, 1972 ; Richards, 1973 ; Richards,

1975a ; Richards & Shade, 1987), ont mis en évidence quatre types de populations qui présentent un niveau de susceptibilité-résistance variable mais bien défini : type I, non-susceptibles tout au long de leur vie ; type II, juvéniles susceptibles/adultes non-susceptibles ; type III, susceptibles tout au long de leur vie ; type IV, juvéniles susceptibles/adultes variables (Richards & Shade, 1987). Richards a réalisé la plupart de ses travaux sur la génétique des variations morphologiques de *B. glabrata*. Il a utilisé divers marqueurs morphologiques qui sont des caractères héréditaires à locus unique ou multi-loci, pour étudier la compatibilité entre mollusque et schistosome. Ils ont ainsi démontré la complexité génétique de cette relation mollusque-parasite et ont établi des phénotypes d'infectivité, certains étant reliés à l'âge. Ces études consistant en plusieurs séries de croisements, rétro-croisements ou croisements en retour entre mollusques susceptibles et non-susceptibles ont révélé que la résistance des mollusques juvéniles à une infestation à *S. mansoni* serait un caractère multi-loci contrôlé par au moins quatre gènes, chacun possédant plusieurs allèles. Les mollusques juvéniles résistants le sont définitivement tout au long de leur vie, alors que les mollusques juvéniles susceptibles peuvent devenir résistants à l'âge adulte (Richards, 1984). Chez les hôtes adultes, les résultats des croisements entre les parents susceptibles et résistants suggèrent que le déterminisme de la résistance dépendrait d'un seul gène avec dominance de l'allèle résistant : la descendance adulte F1 provenant des croisements entre des souches susceptibles et résistantes est résistante à l'infestation, alors que la descendance adulte F2 présente un taux de ségrégation de 3:1 pour le phénotype résistant/susceptible (Richards et al., 1992). Plusieurs hypothèses concernant la résistance de *B. glabrata* à *S. mansoni* ont été posées à partir de toutes ces expériences de croisements. En plus des quatre gènes du mollusque, chacun possédant plusieurs allèles qui influencent la susceptibilité des juvéniles, il existe au moins deux gènes primordiaux de la résistance dont les effets peuvent être caractérisés de la manière suivante. Tout d'abord, le gène *Mr* (Richards, 1984), il est dominant mais il n'est pas présent dans toutes les populations de *B. glabrata*. *Mr* est seulement exprimé chez le mollusque adulte et fonctionne de façon à réprimer le complexe de gènes qui est responsable de la susceptibilité juvénile et à rendre les mollusques résistants. Le mécanisme d'action de ce gène et de son ou ses produits n'est pas connu. Lorsque le gène *Mr* s'exprime, les juvéniles peuvent être susceptibles mais aucun des adultes ne le seront (Richards, 1975b). Ensuite, des arguments forts soutiennent l'existence d'un autre gène de la résistance : le gène *R* qui peut uniquement s'exprimer chez les mollusques non-susceptibles juvéniles ou adultes (Richards, 1975a). Le trait caractéristique observable de ce gène est l'accumulation des hémocytes autour du sporocyste en développement. Pour que cette

réponse cellulaire dirigée contre le parasite se produise, il faut que les mollusques soient non-susceptibles. Les gènes *Mr* et *R* seraient des gènes distincts. Certains mollusques peuvent avoir l'un ou l'autre et d'autres peuvent avoir les deux. Finalement, lorsque les deux gènes sont présents, l'expression de *Mr* permet l'expression de *R* chez les adultes. Lewis et ses collaborateurs (Lewis et al., 2001) ont proposé une distribution de ces gènes au sein des différents types de susceptibilité établis précédemment :

Tableau 1 : Les quatre types de phénotypes reconnus chez *B. glabrata* caractérisés par les fréquences des gènes *R* ou *Mr*.

	Type I	Type II	Type III	Type IV
gène <i>R</i>	Fixé	Variable	Variable	Variable
gène <i>Mr</i>	Fixé	Fixé	Absent	Présent
stade juvénile	Résistant	Susceptible	Susceptible	Résistant
stade adulte	Résistant	Résistant	Susceptible	Susceptible ou résistant

En tenant compte du grand nombre de gènes et d'allèles, il n'est pas surprenant de voir que les populations de mollusques présentent autant de variabilité dans leurs niveaux de susceptibilité-résistance.

Alors que des travaux plus récents montraient à nouveau que la résistance et la susceptibilité de *B. glabrata* à *S. mansoni*, du moins concernant les souches utilisées, étaient transmis génétiquement, la résistance étant dominante (Webster & Woolhouse, 1998 ; Webster, 2001), une autre équipe de chercheurs (Jones et al., 2001) réalisaient une nouvelle analyse de la transmission génétique de la résistance chez l'adulte en utilisant la même souche résistante de mollusques mais une souche susceptible différente. La souche de parasites était également différente de celle utilisée par Richards (Richards et al., 1992). Les résultats obtenus diffèrent des précédents. En effet, la descendance F2 ne ségrège pas selon la loi de Mendel et ce sont les individus susceptibles qui sont majoritairement représentés. Leurs résultats sont interprétés de la façon suivante : en fonction des souches choisies dans l'association mollusque-parasite observée, le phénotype résistance chez l'adulte pourrait dépendre d'un nombre de gènes variés se transmettant de façon indépendante et qui pourraient avoir des effets majeurs (Jones et al., 2001). Dès 1984, Richards reconnaissait que la résistance dépendait de la combinaison mollusque-parasite choisie et que la susceptibilité des adultes semblait impliquer « soit des gènes supplémentaires soit une dominance incomplète de la résistance » (Richards, 1984).

Ces analyses en génétique fondamentale, sans pour autant aboutir définitivement à l'identification des gènes de la résistance, ont fourni des bases, des connaissances et des outils que sont les différentes souches de mollusques compatibles et incompatibles bien définies, nécessaires à la poursuite de l'étude sur l'expression des gènes qui est spécifique à *B. glabrata*. Malgré tout, les lois de transmission concernant la susceptibilité-résistance ne sont pas encore établies. Ces recherches se poursuivent mais d'autres voies en génétique des populations et considérées comme des approches moléculaires de la résistance ont été développées.

2. Les approches en génétique des populations

L'analyse moléculaire de la résistance chez *B. glabrata* a débuté dans les années 80 par des tentatives de caractérisation de marqueurs génomiques neutres liés à la susceptibilité-résistance. Plusieurs outils ont été utilisés et de nombreux travaux se sont focalisés sur l'étude des isozymes qui sont des marqueurs biochimiques (Fletcher et al., 1981 ; Mulvey & Vrijenhoek, 1981 ; Mulvey & Woodruff, 1985). Malheureusement aucune liaison entre la résistance et des isozymes spécifiques n'a pu être démontrée. Malgré ces résultats, ces analyses ont vraiment souligné le degré considérable de polymorphisme qui pouvait exister au sein des souches de mollusques étudiées.

Par la suite, deux types de recherche basés sur une approche moléculaire et ayant pour but la caractérisation des gènes de la résistance ont été effectués : la caractérisation de marqueurs aléatoires liés à la résistance et l'identification et la caractérisation de régions génomiques associées à la résistance et contenant potentiellement des gènes candidats de la résistance.

La recherche de marqueurs neutres liés à la résistance a commencé par des analyses du polymorphisme de l'ADN de différentes souches de mollusques en utilisant la méthode des RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Le principe de cette méthode repose sur la comparaison de profils de coupures réalisées par des enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN par rapport à une autre (mollusque susceptible/résistant). Les variations qui peuvent exister dans une séquence d'ADN sont reconnues par l'enzyme et provoquent des longueurs de fragments de restriction différentes. L'ADN des individus est donc digéré par une ou plusieurs enzymes et les produits de restriction sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide. Le polymorphisme est révélé après

hybridation de type southern d'une sonde marquée sur les fragments transférés sur membrane (Botstein et al., 1980).

Cette approche a été effectuée sur les gènes codant les ARNs ribosomiques de *B. glabrata* provenant de souches susceptibles et résistantes à *S. mansoni* (Knight et al., 1991). A nouveau, cette étude a mis en évidence le fort polymorphisme de ces souches de mollusques sans toutefois révéler de marqueurs de la résistance.

Puis, des marqueurs moléculaires tels que les RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA ou polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire) et les microsatellites ont été développés. La technique des RAPDs fait appel à l'utilisation d'oligonucléotides de petites tailles (6 à 9 bases) de séquence aléatoire qui vont se fixer sur l'ADN cible au hasard. La PCR génère des produits d'amplification de séquence inconnue dont les profils sont analysés afin de détecter un polymorphisme (Williams et al., 1990). Quant aux microsatellites, ce sont des séquences présentes dans le génome, constituées par la répétition en tandem d'un motif simple d'ADN de quelques nucléotides. Les motifs peuvent être des unités mono-, di-, tri ou tétra-nucléotides. Ces régions sont hautement polymorphes dans le nombre de répétitions des motifs simples (polymorphisme de la taille des fragments amplifiés) et sont grandement réparties dans le génome, ce qui fait des microsatellites d'excellents marqueurs moléculaires. Afin de déterminer le nombre de répétitions à un locus donné, il faut amplifier par PCR à l'aide d'amorces spécifiques ce motif puis séparer les fragments sur un gel hautement résolutif (Tautz, 1989).

Les études utilisant les RAPDs ont d'abord permis de confirmer l'étendue de la variabilité génétique des souches de laboratoire ou encore des mollusques provenant de différentes régions de transmission de schistosomes (Vidigal et al., 1994 ; Carvalho et al., 2001). Elles ont également été utiles à la différenciation génétique de souches définies de *B. glabrata* susceptibles ou résistantes (Larson et al., 1996 ; Vidigal et al., 1998). Des démarches effectuées sur différentes souches de *B. glabrata*, susceptibles ou résistantes à *S. mansoni* se sont attachées à associer ces marqueurs à la susceptibilité-résistance (Larson et al., 1996 ; Lewis et al., 1997 ; Knight et al., 1999b ; Spada et al., 2002). Des études similaires ont été réalisées par Abdel-Hamid et ses collaborateurs (Abdel-Hamid et al., 1999) sur des espèces de *B. tenagophila*. Lors de ces études, deux marqueurs liés au phénotype « adulte résistant » ont été finalement identifiés par une analyse RAPD (Knight et al., 1999b). Leur caractérisation a montré qu'ils correspondaient à des éléments répétés du génome mais l'association de ces marqueurs aux gènes de la résistance *R* et/ou *Mr* n'a pas encore été démontrée (Lewis et al., 2001). Ils pourraient s'avérer très utiles dans l'élaboration d'une carte génétique/physique du

mollusque. De plus, plusieurs marqueurs microsatellites ont été isolés à partir du génome de *B. glabrata* (Campbell et al., 2000 ; Mavarez et al., 2000) et trois loci homozygotes comportant des allèles différents dans les souches susceptibles et résistantes ont été mis en évidence (Jones et al., 1999).

La recherche et l'obtention de marqueurs fiables devraient permettre l'identification et la caractérisation de régions génomiques associées à la susceptibilité-résistance. Le but ultime étant de fournir un outil puissant qu'est la cartographie génétique. Cet outil permettrait d'identifier et de déterminer finalement les relations fonctionnelles qui existent entre les gènes impliqués dans la résistance aux parasites et les modes d'interaction entre l'hôte et le parasite. En effet, à l'heure actuelle, aucune carte de liaison ou carte physique du génome de *B. glabrata* n'est à disposition. Mais plusieurs expériences visant à établir cette cartographie sont en cours et ce toujours dans le but d'identifier les régions du génome du mollusque qui confèrent la résistance ou la susceptibilité vis à vis des schistosomes (Jones et al., 2001). Une partie de ces expériences impliquent de scanner le génome entier à l'aide de marqueurs ADN hypervariables et largement dispersés afin de génotyper des individus à l'intérieur d'une même famille (Jones et al., 2001).

Alors que la cartographie (carte de liaison génétique, carte physique) devrait participer à une meilleure compréhension des bases de la génétique moléculaire et de l'évolution de la résistance aux schistosomes, cette voie de recherche risque d'être longue et fastidieuse compte tenu du peu d'informations qui sont à disposition (peu de marqueurs génomiques) et qu'il faudra générer pour réaliser ce travail. D'ailleurs, à l'heure actuelle toujours aucun gène de la résistance n'a encore pu être identifié.

3. Des études comparatives et fonctionnelles

D'autres approches moléculaires se sont plutôt orientées vers des études comparatives de l'expression des gènes entre souches compatibles et incompatibles *via* différentes stratégies. Cette troisième voie correspond à une approche plus fonctionnelle visant à caractériser les mécanismes déterminant la compatibilité, c'est-à-dire les déterminants moléculaires plus particulièrement responsables des mécanismes de défense de l'hôte mollusque. Plusieurs laboratoires ont engagé ces démarches et principalement sur le système *B. glabrata*-*S. mansoni*. Toutes les stratégies employées sont des techniques à grande échelle, dont le but est de fournir le plus grand nombre de gènes candidats.

La stratégie d'hybridation soustractive utilisée par Miller (Miller et al., 1996) sur mollusques entiers mais aussi sur différents tissus (hépatopancréas, ovotestis et glande de l'albumine) consiste en la synthèse d'ADNc (complémentaires) monocaténares à partir des deux souches de mollusques, susceptible et résistante, l'ADNc provenant des individus susceptibles étant biotinylé. Ces ADNc biotinylés sont ensuite hybridés avec un excès d'ADNc synthétisés à partir des individus résistants. De cette façon, seuls sont récupérés les ADNc spécifiques des individus résistants après capture des hétéro- ou homoduplexes biotinylés sur des billes de streptavidine. Cette étude dont le but était de révéler des marqueurs RFLPs, a pu mettre en évidence deux transcrits qui ne présentaient aucune similarité et dont les taux étaient supérieurs chez les individus résistants au niveau de la glande de l'albumine. L'une de ces séquences qui possède effectivement les propriétés de marqueur RFLP correspond à un transcrit régulé tout au long du développement.

La technique de DDRT-PCR (differential display reverse transcriptase PCR ou tri des ARN messagers) s'est trouvée également fort utile dans la « découverte » de gènes candidats impliqués dans l'interaction mollusque-trématode. Cette technique permet de comparer simultanément les profils d'expression provenant de différents échantillons biologiques. Elle permet d'isoler dans un même temps les gènes qui seraient sur- ou sous-exprimés entre les échantillons analysés, sans avoir pris connaissance de la séquence au préalable. La DDRT-PCR est basée sur l'amplification par RT-PCR des ADNc issus des échantillons à comparer dans des conditions peu stringentes afin d'obtenir suffisamment de matériel dont les profils d'amplification seront comparés sur gel d'électrophorèse hautement résolutif. Les fragments différenciellement représentés sont isolés, clonés et séquencés afin de les identifier (Liang & Pardee, 1992). Cependant, cette technique conduit à l'obtention d'une importante proportion de faux positifs estimée à 50% (Martin & Pardee, 1999), le problème majeur étant le risque de co-purifier des fragments exprimés de façon constitutive qui recouvrent l'unique fragment réellement différenciellement exprimé (Mathieu-Daude et al., 1996). Cette technique a permis toutefois de mettre en évidence un gène présentant une forte similarité pour le gène codant le cytochrome P450 (Lockyer et al., 2000). L'expression de ce gène serait réprimée suite à une infestation par *S. mansoni* dans l'ovotestis d'individus résistants à 70%. En utilisant la même méthode, Knight et ses collaborateurs ont identifié trois gènes dont l'expression serait modulée suite à une infestation chez des mollusques adultes non susceptibles (Knight et al., 2000). Ces gènes présentent des similarités pour une métalloprotéase, une rétro-transcriptase et le dernier code une protéine qui interagirait avec le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 4$. Enfin, des fragments d'ADNc présents uniquement chez les mollusques infestés ont été

isolés (Jones et al., 2001). Un de ces fragments correspond à la protéine de choc thermique HSP70 qui avait été auparavant isolée et caractérisée à partir de la lignée cellulaire embryonnaire de *B. glabrata* appelée Bge, (*Biomphalaria glabrata* embryonic cell) activée par contact avec le parasite (Laursen et al., 1997). Lors d'une étude récente, cette molécule a été à nouveau identifiée chez des individus infestés. Le transcrit correspondant était surexprimé ainsi que ceux correspondant à une dizaine d'autres candidats. Parmi eux, une séquence protéique contiendrait au moins deux domaines "globine-like" mais sans pour autant être une myoglobine (Lockyer et al., 2004). Compte tenu de l'intérêt croissant pour les hémocytes, cellules de défense circulantes impliquées dans l'élimination du parasite, deux dernières études se sont penchées sur l'expression des gènes hémocytaires toujours en utilisant la méthode de DDRT-PCR. Les candidats les plus intéressants présentent des similarités pour une transposase (Miller et al., 2001), une molécule d'adhérence, une défensine de neutrophiles, des sérine/thréonine kinases, des peroxydases et des glucosidases (Schneider & Zelck, 2001).

Plus récemment, la technique d'hybridation suppressive et soustractive (SSH) grâce à laquelle la représentation des transcrits faiblement représentés est normalisée, a permis de découvrir des séquences qui n'auraient pas été détectées auparavant. En effet, plusieurs nouveaux candidats présentent une expression différentielle entre mollusques résistants et susceptibles infestés : une lectine, Fribinogen related protein 2 (FREP2) ; un inhibiteur de cathepsin, une stefin/cystatin B ; un inhibiteur de protéase à sérine-6, serpin-6 et d'autres gènes qui avaient déjà été identifiés (Nowak et al., 2004).

Une autre voie adoptée par certains laboratoires consiste à s'engager dans la production d'ESTs (Expressed sequence tags). Ce sont de courts fragments d'environ 750 pb (paires de bases) générés par le séquençage de clones sélectionnés au hasard à partir d'une banque d'ADNc (Adams et al., 1991). L'analyse d'ESTs constitue une méthode d'identification de gènes à haut débit par l'étude des transcrits d'un type cellulaire ou d'un tissu dans des conditions expérimentales définies. Les ESTs sont identifiés par confrontation des séquences aux banques de données. Les approches ESTs sont utiles non seulement pour l'identification de nouveaux gènes mais aussi pour la cartographie du génome car ils peuvent s'avérer être de bons marqueurs. En effet, Knight et ses collaborateurs ont démontré l'occurrence de RFLPs entre mollusques susceptibles et résistants au parasite (Knight et al., 1998). Plus tard, l'étude des profils d'expression des transcrits hémocytaires provenant de mollusques résistants exposés ou non au parasite, basée sur une approche ESTs a été réalisée (Raghavan et al., 2003). Le gène majoritaire qui ressort de cette étude est une rétro-

transcriptase dont l'expression est modulée suite à l'infestation : le nombre de transcrits augmente. Etant donné la faible quantité d'informations de séquences spécifiques à *B. glabrata*, un des inconvénients majeurs des approches ESTs utilisée dans le but d'identifier de nouveaux gènes et de ne pouvoir faire aucune déduction quant à la fonction du gène si aucune similarité n'est observée.

Toutes ces approches moléculaires ont permis d'identifier toute une série de nouveaux gènes et d'enrichir les connaissances et les informations de séquences sur *B. glabrata*. Par ces approches, des gènes candidats qui pourraient être impliqués dans les interactions complexes se produisant entre l'hôte mollusque et le trématode parasite et qui pourraient expliquer la susceptibilité différentielle du mollusque ont été révélés. Mais la fonction de ces gènes et leurs implications réelles restent à démontrer.

4. D'autres outils à disposition

Des outils tels que la lignée de cellules embryonnaires de *B. glabrata* ainsi que le lancement de programmes de séquençage du génome du mollusque devraient pouvoir fournir de nouvelles informations manquantes et indispensables à l'identification et à la démonstration de la fonction des gènes candidats qui pourraient participer aux voies moléculaires impliquées dans la compatibilité.

a. La lignée de cellules embryonnaires, Bge

La lignée de cellules embryonnaires dérivée de *B. glabrata*, Bge, (Hansen, 1976) citée précédemment représente un outil particulièrement intéressant dans l'étude des interactions hôte mollusque-parasite. Cette lignée cellulaire de mollusque, unique à l'heure actuelle, est devenue un système modèle d'étude *in vitro*. Ces cellules possèdent la particularité de sécréter des facteurs solubles qui favorisent la croissance et la différenciation de nombreuses espèces de trématodes comme *S. mansoni*, *E. caproni* et *Fascioloides magna* (Yoshino & Laursen, 1995 ; Ataev et al., 1998 ; Laursen & Yoshino, 1999 ; Coustau & Yoshino, 2000). L'accomplissement du développement intra-mollusque complet de *S. mansoni* (à partir du stade sporocyste mère jusqu'au stade cercaire) représente un des résultats majeurs des différentes expériences de co-culture menées en présence des cellules Bge (Ivanchenko et al., 1999).

Une seconde particularité de cette lignée cellulaire est qu'elle partage plusieurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles avec les hémocytes circulants de *B. glabrata* (Yoshino et al., 1999). Les cellules Bge et les hémocytes possèdent tous deux une apparence de type fibroblastique, un contenu similaire en enzymes lysosomales, des propriétés d'adhérence à un substrat et sont capables d'encapsuler un élément étranger comme des sporocystes de *S. mansoni*, et ce dans des conditions expérimentales réalisées *in vitro* (Yoshino et al., 1999). Par contre, l'encapsulation de sporocystes d'*E. caproni* par les cellules de la lignée Bge n'a pas été observée. Cette adhérence différentielle vis à vis du parasite pourrait provenir de l'existence de différentes combinaisons ligand/récepteur (Coustau & Yoshino, 2000) ou des effets inhibiteurs des produits d'excrétion-sécrétion d'*E. caproni* (Humbert & Coustau, 2001). Cependant, il semblerait que les interactions moléculaires intervenant entre les cellules Bge et ces deux parasites impliquent des voies de signalisation différentes. Cette lignée cellulaire représente donc un outil inestimable permettant d'analyser les gènes de l'hôte potentiellement impliqués à la fois dans les interactions métaboliques générales qui conduisent au développement du parasite (Coustau & Yoshino, 2000), et dans les interactions immunobiologiques faisant intervenir les processus d'adhérence et d'encapsulation de *S. mansoni* (Duclermortier et al., 1999 ; Humphries & Yoshino, 2006). De plus, la lignée Bge pourrait être envisagée comme système de transformation génétique *in vitro* dans lequel les cellules Bge pourraient être transfectées de façon stable avec un gène d'intérêt quelconque. L'investigation des effets produits par la transcription du gène ainsi introduit sur différents processus tels le développement larvaire ou encore l'encapsulation pourrait être réalisée dans des conditions expérimentales *in vitro*. Des expériences de transfections transitoires effectives de cellules Bge utilisant des constructions ADN contenant un promoteur hétérologue (provenant de *Drosophila* ou du cytomégalo virus) suivi du gène rapporteur de la luciférase (Lardans et al., 1996) illustrent bien la faisabilité d'une telle technique sur les cellules de mollusque. Afin d'atteindre cet objectif, le clonage et la caractérisation moléculaire du promoteur correspondant à la protéine de choc thermique HSP70 de cette lignée cellulaire ont été accomplis, ce promoteur inductible permettant la transfection transitoire en système homologue d'un gène rapporteur étranger (la luciférase) (Laursen et al., 1997 ; Yoshino et al., 1998). Ces expériences ouvrent la voie au développement de méthodes menant à l'intégration stable, la réplication et à l'expression de gènes d'intérêt de mollusque dans la lignée cellulaire Bge. L'identification de marqueurs sélectifs qui permettront de repérer efficacement les cellules transformées demeure indispensable à la réalisation de ces expériences.

b. Les programmes de séquençage

Un consortium international « *Biomphalaria glabrata* Genome initiative » <http://biology.unm.edu/biomphalaria-genome/index.html> a été créé dans le but d'effectuer le séquençage du génome (35 591 trace records) mais également d'ESTs (10 882 ESTs en janvier 2007). Le laboratoire de Parasitologie fonctionnelle et évolutive est un membre de ce consortium et a participé de manière significative à l'apport de nouvelles ESTs. Ces séquences ont été obtenues à partir d'une banque d'ADNc hématocytaires de *B. glabrata* (Mitta et al., 2005). A partir de cette banque, plusieurs gènes immunitaires ont été identifiés. Certains n'avaient encore jamais été décrits chez les mollusques (PGRP, Peptidoglycan Recognition Protein ; LBP/BPI, LPS Binding Protein/Bactericidal permeability increasing ; LGBP, LPS and β -1,3-Glucan binding Protein...) et d'autres chez les invertébrés (MIF, Macrophage migration Inhibitory Factor ; AIF, Allograft Inhibitory Factor). L'étude de l'expression de ces gènes d'intérêt suite à une infestation a confirmé leur implication potentielle dans la réponse au parasite. J'ai personnellement participé à ce travail (confrontation aux banques de données et recherche de similarités). Dans la mesure où ce travail a été mené en parallèle et ne présente qu'un lien indirect avec mon projet principal, les détails ne seront pas abordés dans le cadre de ce manuscrit ; la publication correspondante est associée à ma thèse en annexe.

IV. Le modèle d'étude : *Biomphalaria glabrata*-*Echinostoma caproni*

Dans ce travail, l'interaction mollusque-trématode étudiée concerne le mollusque gastéropode, premier hôte intermédiaire *B. glabrata* et le trématode parasite *Echinostoma caproni*. Nous nous intéressons aux mécanismes moléculaires responsables de l'échec ou de la réussite à l'infestation. Le trématode *E. caproni* est un compétiteur de *S. mansoni* capable de se développer dans le même mollusque hôte *B. glabrata* (Jourdan & Mounkassa, 1986). Bien que ce trématode ne présente pas d'intérêt appliqué, son hôte définitif étant un oiseau aquatique (Jeyarassasingam et al., 1972), ce modèle nous permet d'un point de vue fondamental de comparer deux interactions tout à fait différentes concernant deux espèces de trématodes parasites, *E. caproni* et *S. mansoni* qui présentent un même hôte intermédiaire mollusque, *B. glabrata*. Comme cela a été dit précédemment, *E. caproni* provoque chez le mollusque une très forte immuno-suppression du système de défense interne, contrairement à *S. mansoni*.

Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré que le devenir de cette interaction (succès ou échec de l'infestation) était également déterminé génétiquement. La résistance ne semblerait pas dépendre d'un seul locus (Langand & Morand, 1998). Des souches de *B. glabrata* totalement compatibles (nommées EAF-S) et totalement incompatibles (nommées CB-R) à *E. caproni* ont pu être sélectionnées au laboratoire à partir d'un même isolat provenant du Brésil et polymorphe pour le caractère susceptibilité-résistance (Langand et al., 1998). L'existence de ces souches génétiquement bien déterminées permet d'aborder les mécanismes moléculaires déterminant le devenir d'une infestation.

Les travaux d'Ataev et Coustau, (1999) se sont focalisés sur la dynamique d'infestation d'*E. caproni* chez ces deux souches de *B. glabrata*. Les larves du parasite sont capables de pénétrer à l'intérieur des mollusques des deux souches mais également de migrer jusqu'au site final d'infestation qui est la région cardiaque. Chez les mollusques résistants, deux jours post-infestation (PI), une forte accumulation des hémocytes est observée dans la région cardiaque. Cette réponse cellulaire augmente continuellement et se termine par l'encapsulation des sporocystes qui se sont installés dans le ventricule ou dans l'aorte, trois jours PI.

Ils ont également pu observer chez des mollusques résistants que, bien que certains sporocystes situés dans la cavité péricardique n'étaient pas encapsulés, leur développement ne paraissait pas normal comparé à des sporocystes se développant chez des mollusques susceptibles. La cavité péricardique n'est pas le site de développement habituel des sporocystes. Leur dégénérescence pourrait donc être due à des conditions physico-chimiques impropres à leur développement. Cependant, ce type de développement anormal et des dégénérescences ont également été observés au niveau du ventricule et de l'aorte qui sont des sites « appropriés ». Tous les sporocystes observés 2 et 3 jours PI, et ce quelque soit leur niveau d'encapsulation, étaient caractérisés par l'absence de mitose et d'embryon de rédie d'une part, et d'autre part la picknotisation des noyaux et l'élargissement des espaces intercellulaires indiquaient clairement leur dégénérescence (Figure 4). La présence dans l'hémolymphe des mollusques résistants d'un ou de plusieurs facteurs solubles qui interfèreraient avec le développement de *E. caproni* est donc envisageable, ces facteurs s'associant à la réponse cellulaire. Ces résultats suggèrent l'existence de différences au niveau des molécules solubles présentes dans l'hémolymphe des individus susceptibles et résistants.

Concernant le nombre d'hémocytes circulants présents avant l'infestation, aucune différence significative entre souches susceptible et résistante n'a été rapportée (Ataev & Coustau, 1999). Par contre, l'exposition au parasite a engendré des réponses différentes selon les deux souches. Chez les individus résistants, l'augmentation du nombre de cellules circulantes adhérentes et non-adhérentes est fortement significative (3 et 1 jours PI, respectivement), alors que cette augmentation est observée après un petit temps de retard chez les individus susceptibles (8 et 1 jours PI, respectivement). Le nombre croissant de cellules circulantes et adhérentes chez les mollusques résistants comparés aux mollusques susceptibles pourrait refléter l'incapacité d'*E. caproni* à interférer avec les différentes fonctions des hémocytes des mollusques résistants. Cependant la résistance à *E. caproni* ne peut pas être corrélée au nombre d'hémocytes circulants.

Les echinostomes interfèreraient avec le système de défense interne du mollusque par l'intermédiaire de produits d'excrétion-sécrétion. Humbert & Coustau (2001) ont comparé les effets de ces produits sur les fonctions de défense des hémocytes provenant des souches susceptible et résistante. Les expériences réalisées *in vitro* ont confirmé l'existence du phénomène d'interférence par *E. caproni*. L'exposition aux produits d'excrétion-sécrétion

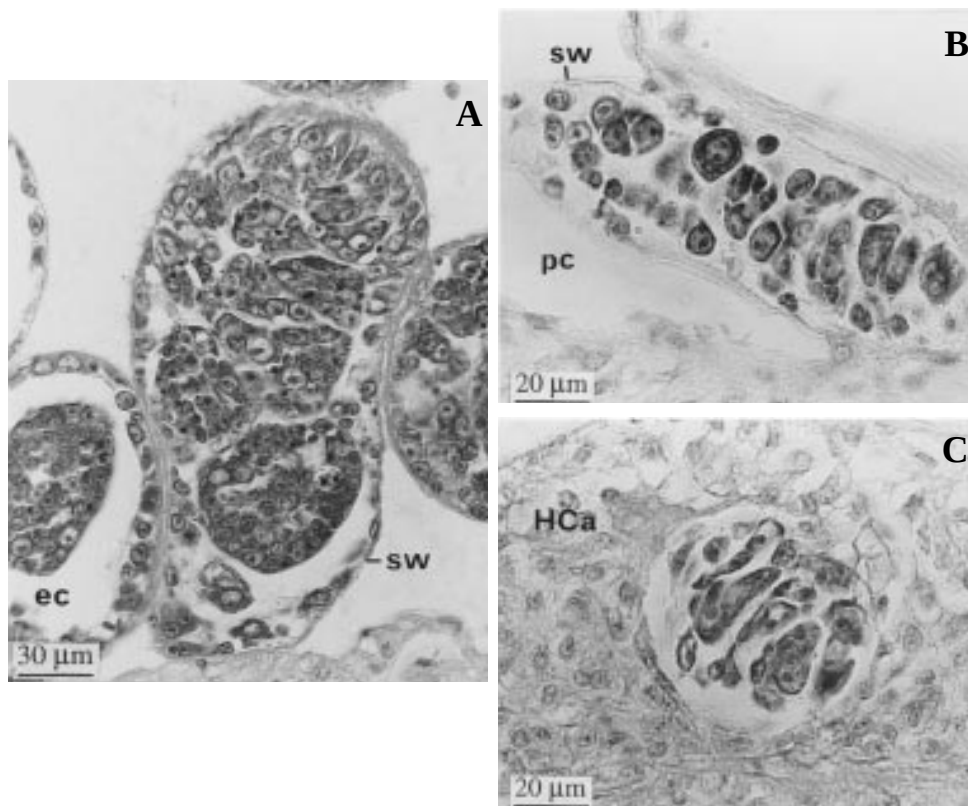


Figure 4 : Développement de sporocystes d'*E. caproni* chez *B. glabrata* observé en coupes histologiques. (A) Sporocystes mères, 5 jours post-infestation, chez un mollusque susceptible, cavité embryonnaire (ec), membrane du sporocyste (sw). (B) Sporocyste mère installé dans la cavité péricardique (pc) d'un mollusque résistant, 3 jours post-infestation. (C) Sporocyste mère encapsulé dans le ventricule d'un mollusque résistant, 3 jours post-infestation, agrégat d'hémocytes (HCa). D'après Ataev & Coustau, 1999.

produit un effet tout à fait significatif sur l'étalement des hémocytes. Suite à cette exposition, les hémocytes issus des mollusques susceptibles rétractent leurs pseudopodes et s'arrondissent immédiatement (dès les premières minutes). De plus, leur activité de phagocytose diminue. Ces observations suggèrent que les produits d'excrétion-sécrétion altèrent les capacités d'étalement et d'adhérence des hémocytes provenant de mollusques susceptibles, ainsi que leur capacité de phagocytose. Les fonctions d'adhérence et de phagocytose ciblées par les produits d'excrétion-sécrétion du parasite sont indispensables dans le processus d'encapsulation, il est donc vraisemblable que de tels effets inhibent la formation de la capsule chez les individus susceptibles. Par contre, aucun de ces effets n'est observé pour les hémocytes issus des mollusques résistants suite à un traitement similaire. Les cellules conservent une morphologie identique à celle observée avant l'exposition, leurs capacités d'adhérence et de phagocytose restent intactes (Figure 5). Bien qu'à ce stade, des études supplémentaires soient nécessaires à l'élucidation précise des mécanismes de la résistance, l'insensibilité apparente des hémocytes issus d'individus résistants à l'activité immunosuppressive du parasite peut être directement reliée au phénomène de résistance. Les réponses différentielles des hémocytes en présence de ces produits suggèrent qu'il existe également des différences constitutives entre hémocytes des mollusques susceptibles et résistants.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que facteurs humoraux et facteurs cellulaires pourraient avoir un rôle essentiel dans la compatibilité différentielle que présentent les souches EAF-S (susceptible) et CB-R (résistante). Ce sont ces résultats et les difficultés rencontrées lors des différentes approches de génétique fondamentale ou de génétique des populations menées jusqu'à présent par les autres groupes de chercheurs qui ont orienté nos choix dans les différentes approches moléculaires que nous avons développées dans le but d'identifier les déterminants moléculaires responsables de la susceptibilité-résistance de *B. glabrata* vis à vis de *E. caproni*. Ces approches consistent en la comparaison des souches compatible et incompatible, non infestées, étant donné que ce travail n'est pas focalisé sur les interactions immunologiques mais sur les mécanismes de la compatibilité qui peuvent potentiellement faire intervenir des gènes impliqués dans d'autres processus ou grandes fonctions que l'immunité.

Les différences observées lors de ces précédents travaux, concernant les facteurs humoraux, ont été recherchées par une approche protéomique comparative réalisées sur les protéines extraites à partir du plasma des mollusques susceptibles et résistants. L'approche

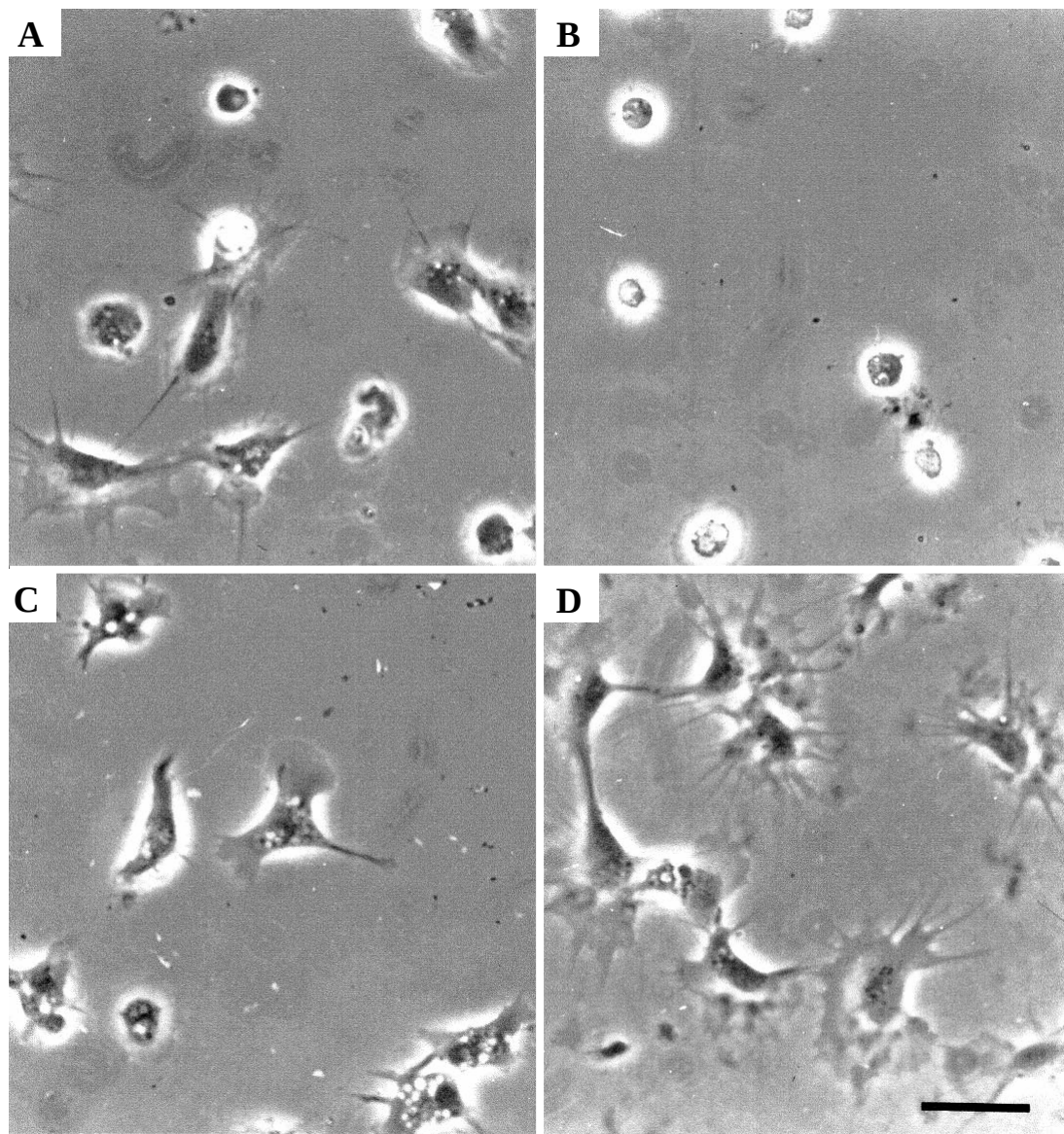


Figure 5 : Propriétés d'adhérence des hémocytes provenant des souches de *B. glabrata* susceptibles (EAF-S) avant (A) et après (B) exposition aux produits d'excrétion-sécrétion d'*E. caproni* ; et résistants (CB-R) avant (C) et après (D) exposition. D'après Humbert & Coustau, 2001.

protéomique consistait en la séparation des protéines en électrophorèse bidimensionnelle suivie de l'identification des protéines différentiellement représentées par spectrométrie de masse. De même, afin d'étudier les différences constitutives observées pour les hémocytes, une analyse globale et différentielle de leur protéome a été réalisée ainsi qu'une approche transcriptomique plus ciblée visant à comparer le taux des transcrits correspondant aux gènes potentiellement impliqués dans les processus d'adhérence. Au cours de nos investigations, et suite aux résultats obtenus par les différentes approches que je viens d'évoquer, nous nous sommes finalement orientés vers une dernière approche transcriptomique beaucoup plus globale basée sur la comparaison des transcrits d'individus entiers par la technique de SSH (hybridation suppressive et soustractive) afin de révéler l'implication potentielle d'autres tissus ou compartiments dans les mécanismes de susceptibilité-résistance.

Chapitre 1

Chapitre 1

Recherche de candidats impliqués dans la compatibilité parmi les protéines plasmatiques des mollusques par une approche protéomique

Publication n°1

Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. (2005), *International Journal for Parasitology*, 35: 215-224.

Afin d'identifier les molécules et les mécanismes potentiellement impliqués dans la compatibilité de *B. glabrata* vis à vis d'*E. caproni*, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur un compartiment particulier de l'hôte : le plasma. Ce compartiment a été choisi car des travaux précédents ont mis en évidence l'existence de différences entre le plasma des mollusques susceptibles et résistants. Ces différences s'illustrent, *in vivo*, par le développement anormal et/ou la dégénérescence d'un sporocyste du parasite *E. caproni* chez le mollusque *B. glabrata* résistant et ce, avant que le sporocyste soit encapsulé par les hémocytes (Cf Figure 4B) alors que ce développement se poursuit normalement chez le mollusque susceptible, (Ataev & Coustau, 1999). Ces résultats suggèrent que les facteurs humoraux seraient activement impliqués dans les processus qui sous-tendent la susceptibilité-résistance de *B. glabrata* vis à vis d'*E. caproni*. Nous avons donc réalisé une étude moléculaire comparative qui s'est plus particulièrement intéressée aux protéines plasmatiques des mollusques susceptibles et résistants. Cette étude consistait en la comparaison des profils protéiques des souches susceptible (EAF-S) et résistante (CB-R) « naïves » c'est-à-dire qui n'ont jamais été en contact avec le parasite, en électrophorèse bidimensionnelle.

Cette analyse protéomique différentielle a permis de mettre en évidence treize protéines candidates différentiellement représentées entre mollusques susceptibles et résistants. Les gènes correspondant à cinq d'entre elles ont pu être caractérisés par une combinaison de techniques de spectrométrie de masse. Il s'agit d'une cystatine, inhibiteur de cystéine protéase, de deux isoformes d'une endo- β -1,4-mannanase et de deux isoformes de protéines de liaison du calcium, toutes ces protéines présentant un taux de représentativité

supérieur chez les individus susceptibles. De plus, l'étude de l'expression de ces gènes en PCR-Quantitative réalisée chez des mollusques susceptibles et résistants exposés ou non au parasite et dans différents tissus des mollusques a montré que (i) le taux apparent de protéines était corrélé au taux des transcrits correspondants, (ii) l'expression de ces cinq gènes était régulée différemment suite à l'exposition au parasite *E. caproni*, (iii) ces gènes, pour la plupart d'entre eux, s'exprimaient dans la glande de l'albumine du mollusque.

Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*

D. Vergote^b, A. Bouchut^a, P.E. Sautière^b, E. Roger^a, R. Galinier^a, A. Rognon^a,
C. Coustau^a, M. Salzet^b, G. Mitta^{a,*}

^aParasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5555, CNRS Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, 66 860 Perpignan cedex, France

^bNeuro-immunologie des Annélides, UMR 8017, CNRS Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

Received 21 September 2004; received in revised form 27 October 2004; accepted 3 November 2004

Abstract

Snail immune responses towards a trematode infection are known to rely on both plasmatic and cellular host factors. As an approach to further investigate the suspected involvement of plasmatic factors in *Biomphalaria glabrata* resistance/susceptibility to *Echinostoma caproni*, we compared protein patterns of plasma collected from susceptible and resistant snails. This proteomic approach revealed that 13 plasmatic proteins exhibited significant differences in their apparent representativity. The genes corresponding to five of them were characterised by a combination of mass spectrometry and molecular cloning. They encode two isoforms of a glycolytic enzyme, two isoforms of a calcium binding protein and an inhibitor of cysteine protease. Furthermore, we investigated gene expression in parasite-exposed or -unexposed snails as well as in various tissues by quantitative PCR. This study showed that: (i) differential representation of plasma proteins between the snail strains was correlated with a differential level of transcripts; (ii) expression of these genes after parasite exposure was differentially regulated in the two strains; and (iii) these genes were expressed predominantly in the albumen gland.

© 2004 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*; *Echinostoma caproni*; Host-parasite interactions; Proteomic; Susceptibility; Albumen gland

1. Introduction

Snail-trematode immunobiological interactions have been studied on the fresh-water snail *Biomphalaria glabrata* following infection by the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and by the echinostome species, *Echinostoma paraensei* and *Echinostoma caproni*. In contrast to *S. mansoni*, these two echinostomes are known to strongly interfere with the snail immune response via their excretory-secretory (ES) products (Loker and Adema, 1995; Humbert and Coustau, 2001). Analysis of interactions between *E. paraensei* ES products and *B. glabrata* plasmatic factors led to the identification of the numerous fibrinogen-related proteins

(FREPs) (Adema et al., 1997; Leonard et al., 2001; Zhang et al., 2001, 2004; Zhang and Loker, 2003). At least some of these extremely diversified molecules are capable of binding and precipitating *E. paraensei* ES products, suggesting that they may play an important role in snail-trematode molecular interactions. In addition to the discovery of FREPs, previous studies provided evidence that plasmatic factors may play an important role in the outcome of a trematode infection. In vivo comparison of *E. caproni* development in *B. glabrata* snails selected for their susceptibility or resistance (Langand et al., 1998) revealed that, in resistant snails, sporocysts were abnormally developed and degenerated regardless of their level of encapsulation (Ataev and Coustau, 1999). These results suggested that, in addition to cellular factors, humoral factors are actively involved in the molecular processes underlying resistance or susceptibility to *E. caproni* (Ataev and Coustau, 1999).

* Corresponding author. Tel.: +33 4 68 66 2188; fax: +33 4 68 66 2281.
E-mail address: mitta@univ-perp.fr (G. Mitta).

Except for the presence of FREPs, virtually nothing is known on the composition of plasma, and plasmatic factors remain uncharacterised.

In the present study, we addressed the question of potential constitutive differences between plasma factors of resistant and susceptible snails. We used, for the first time in this model, a proteomic approach aimed at: (i) identifying proteins differentially represented in the plasmas of susceptible and resistant snails; (ii) characterizing the genes encoding these proteins; and (iii) analyzing their expression p.i. and in a range of tissues.

2. Material and methods

2.1. *Biomphalaria glabrata* strains and plasma preparation

Biomphalaria glabrata snails used in this study belonged either to the unselected Bg.Bra stock originating from Brazil (Guillou et al., 2004), or to the EAF-S or CB-R strains selected, respectively, for their susceptibility or resistance to *E. caproni* (Langand et al., 1998; Humbert and Coustau, 2001). At the time of the study, the percentages of adult snails susceptible to *E. caproni* were: Bg.Bra=70%, EAF-S=98% and CB-R=1%.

Hemolymph was extracted from the headfoot of 1,000 uninfected EAF-S and 1,000 uninfected CB-R snails according to standard procedure (Sminia and Barendsen, 1980) and immediately placed on ice. Approximately 100 ml of hemolymph were recovered from each strain and centrifuged at $800\times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant (plasma) was collected, centrifuged at $20,000\times g$ for 20 min at 4 °C and filtered using a stirred ultrafiltration cell with a cut-off 500 kDa (Millipore). The filtered plasma was then stored at –80 °C until use.

2.2. Experimental infection

The parasite *E. caproni* (Jeyarasingam et al., 1972) was maintained in Bg.Bra snails and mice (SWISS OF1 stock) as described previously (Trouvé et al., 1996). For one experiment, adult EAF-S and CB-R snails (measuring 9–14 mm in shell diameter) were exposed to *E. caproni* infection according to previously described procedures (Guillou et al., 2004). Ten individuals from each strain were collected at 3, 6, 12, 24, 48 and 96 h post-exposure and frozen in liquid nitrogen until RNA extraction.

2.3. Two-dimensional gel electrophoresis

2.3.1. Plasmatic protein extracts

Plasmatic proteins were precipitated by adding four volumes of a solution containing 10% trichloroacetic acid, 0.07% β -mercaptoethanol in acetone to 3 or 9 ml of plasma (for analytical or preparative electrophoresis, respectively). After 1 h at –20 °C, proteins were pelleted by centrifuging

at $15,000\times g$ for 30 min at 4 °C. Four volumes of acetone containing 0.07% β -mercaptoethanol were added to the pellet and incubated 1 h at –20 °C. After centrifugation ($15,000\times g$ for 30 min at 4 °C), the pellet was air-dried and incubated 90 min at room temperature in 350 μ l of 'lysis' buffer (9 M urea, 2% Triton X-100 and 10 mM Dithiothreitol (DTT)) (Wu et al., 2000).

2.3.2. Isoelectrofocusing (IEF)

IEF for the 2D gel electrophoresis was performed using the IEFCell system™ (Biorad). Immobilised pH 3–10 non-linear gradient (IPG) strips were rehydrated with the 350 μ l of protein extracts to which 0.2% v/v Bio-lyte (pH 3–10:pH 5–8:pH 7–9, 1:1:2, Biorad) were added. Passive rehydration was performed for 5 h at 20 °C, followed by an active rehydration at 50 V for 14 h at 20 °C. Isoelectrofocusing was raising gradually until 8,000 V and running until 90,000 V h at 20 °C. Strips were then incubated twice with 130 mM DTT in equilibration buffer (6 M urea, 375 mM Tris-HCl, 2% SDS, 20% glycerol, 0.02% Coomassie blue G-250, pH 8.8) for 15 min according to Wu (Wu et al., 2000). Proteins were then carbamidomethylated for 15 min (135 mM iodoacetamide in equilibration buffer).

2.3.3. SDS-PAGE

IPG strips™ were transferred on a 12% polyacrylamide gel containing 0.8% of cross-linker piperazine diacrylamide in a 0.5% agarose low melting point gel. Electrophoresis were performed in Tris/Glycine/SDS buffer according to the conditions defined by O'Farrell (O'Farrell, 1975). Proteins were separated 1 h at 30 V and then at 200 V until Coomassie blue has reached the bottom of the gel. After electrophoresis, gels were silver stained according to a modified protocol of Morrissey (Morrissey, 1981) or Coomassie blue stained according to Neuhoff (Neuhoff et al., 1988).

2.3.4. 2D image analysis

Three gels per condition were analyzed using the Progenesis™ v1.5 software program (Nonlinear dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Analysis protocol included spot detection and filtering, whole image warping on a reference gel, background subtraction, average gel creation, spot matching and volume normalization against total volume of all protein spots present in the gel. Each analysis step was manually validated. Statistical significance was assessed using a Student's *t*-test.

2.4. Protein identification

2.4.1. In-gel digestion for mass spectrometry

Proteins of interest were excised and gel pieces were washed in 25 mM ammonium bicarbonate/50% acetonitrile. After drying, gel pieces were placed for 30 min on ice in 50 μ l of protease solution (sequence grade modified trypsin, Promega, at 0.02 mg/ml in 25 mM ammonium bicarbonate).

Excess protease solution was then removed and replaced by 50 µl of 25 mM ammonium bicarbonate. Digestion was performed at 30 °C overnight. Peptide extraction was performed twice for 15 min with 50% acetonitrile/1% trifluoroacetic acid (TFA) for further Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS) analysis or with 50% acetonitrile/1% formic acid for further ESI-MS-MS (Electro Spray Ionization-Mass spectrometry-Mass spectrometry) analysis. Trypsin digests were then lyophilised in a SpeedVac concentrator (Savant) and resuspended in 5 µl of 0.1% TFA or 0.1% formic acid.

2.4.2. MALDI-ToF MS

MALDI-ToF MS analysis of trypsin digests was performed on a Voyager DE Pro™ (Applied Biosystems) in reflector mode at an accelerating voltage of 20 kV. One microliter of trypsin digests was spotted on 1 µl of dried α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 15 mg/ml in acetone) and covered with 1 µl of HCCA (10 mg/ml in 70% acetonitrile/0.1% TFA). About 300 laser shots were accumulated to obtain the final spectrum. Peptide masses were determined after peak smoothing and internal calibration using the two autolysis trypsin fragment $[M+H]^+ = 2211.1$ and 842.51 Da.

2.4.3. ESI-MS-MS analysis

After desalting by on reversed-phase C18 Zip-Tip micro-column (Millipore, Bedford, MA, USA), samples were loaded into nanoESpray capillaries (Protana, Odense, Denmark) using a 5 µl on-column syringe. Capillaries were inserted into an Applied Biosystems Q-STAR Pulsar™ using an Ion spray source (nanoESI-Q-ToF). Doubly-charged peptides were selected, fragmented by N₂ collision and analysed by ESI-MS-MS. The sequences obtained were manually assigned to search against SWISSPROT, NCBI and GenPept and the division dbEST of GenBank (ESTs of

B. glabrata) using MS-Pattern (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/mspattern.htm>).

2.5. RNA extraction

RNA extraction, and reverse transcription were performed from whole body *B. glabrata* according to previously described procedures (Guillou et al., 2004).

2.6. Gene characterization

First-strand cDNAs were prepared from total RNAs with oligo d(T)₁₇ for primer using the Superscript II™ (Invitrogen). The 3' portion of the cDNAs were amplified by PCR using an oligo d(T)₁₇ and the different degenerate primers designed from the tags obtained by ESI-MS-MS (Table 1). PCR was performed in 50 µl mixtures containing 2 µl of first-strand cDNA using the DyNAzymeEXT™ kit (Finnzymes). Primer concentration of 2 and 0.2 µM were used for the degenerate primers and the oligo d(T)₁₇, respectively. In order to clone the 5'- or 3'-ends of the cDNAs, we used the GeneRacer™ Kit (Invitrogen).

The PCR products were ligated into the pCR2.1-TOPO™ vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Dideoxy sequencing reactions of the recombinant plasmids were sequenced using a dideoxy-dye-terminator method (CEQ™ DTC-Quick Start kit, Beckman Coulter) and a CEQ™ 8000 apparatus (Beckman Coulter). M13 forward and reverse primers were used for sequencing. Sequences were obtained using the CEQ™ 8000 sequence analysis software.

2.7. Real-time PCR

Real-time PCR analysis of gene expression was performed on total RNAs extracted from parasite-exposed

Table 1
Sequences obtained by ESI-MS-MS and degenerated primers designed for cDNA cloning

Spot	Sequences	Degenerate primers
1	[PND]S[FM]Y[QK][QK]G...T[IL]ND...[IL][FM]AVK HATS[QK]V-	
3	[IL][FM]DEVGD [QK][QK][FM]DSGWR	HTIWTBGAYGARGTIGGIGAY
4	YNEGNAZENK	GGIAAYGCITAYGARAAYAAR
6	DVDGDGN[IL]EPR	GAYGTIGAYGGIGAYGGIAAY
7	DVDGDGN[IL]EPR	GAYGTIGAYGGIGAYGGIAAY
8	[IL][FM][DA/W][IL]DY	
31	[IL][QK]W[FM][QK]YDDSR	MARTGGTTYMARTAYGAYGAY
43	ns	
48	V[IL]TP[IL]ATAVK [IL]DG[IL][IL]VDER [FM]VNW[QK]AAA[IL]K	YTIGAYGGIYTIATHGTIGAYGA
51	ns	TTYGTIAAYTGGCARGCIGC
58	[FM][IL]NW[QK]ADA[IL]K DSG[FM][IL]VTGGSWNPY SYDYDT[IL]R [IL]DG[F- M][IL]VDWR	TTYHTIAAYTGGCARGCIGA
137	ns	
138	ns	

ns, no sequence obtained by ESI-MS-MS; [], ambiguous amino acids are in square brackets; M, oxydised methionine; wobble, M = A + C, R = A + G, W = A + T, Y = C + T, H = A + C + T, B = G + T + C, I, inosine.

Table 2
Specific primers used for real time PCR

Gene	Primer name and sequence
RiboS19	R19F1: TTCTGTTGCTCGCCAC R19R1: CCTGTATTGCATCCTGTT
SPOT1	S1F1: CCATGTTGAAGATTGCCCTAG SR1: CACCATTCAAGTCAGCGGCG
SPOT58	DisS58F1: GCACTCAGCAGGAGACTAT DisS58R2: GACCATTCCAATTGTAATTTTG
SPOT48	DisS48F1: GCATTCTGCTGGAGATTTC DisS48R2: TTACACCATTAGAAGTTAAGC
SPOT6	DisS6F2: AACTAACGAGACAAATCA DisS6R2: CTGATTGGTCAAGGAATCC
SPOT7	DisS7F2: CGCCGACGGTGACGG DisS7R2: GGACTGGTCAAGATGGTT

EAF-S and CB-R snails. RNA extraction, reverse transcription, PCR and relative quantitation were performed according to previously described procedures (Guillou et al., 2004) with a Light cycler™ apparatus (Roche Molecular Biochemicals, Germany). Specific primers for real-time quantitative PCR (Table 2) were edited using the Light Cycler Probe Design™ Software version 1.0.

3. Results

3.1. Differentially represented proteins in plasma from susceptible and resistant strains

The 2D electrophoretic profiles of plasmatic proteins of CB-R and EAF-S strains is illustrated in Fig. 1A. Image analysis revealed 197 plasmatic proteins on the gels. Among these spots, we selected all spots showing a differential representation greater than 2.5-fold. Statistical analysis revealed that differences observed for the following 13 spots—1, 3, 4, 6, 7, 8, 31, 43, 48, 51, 58, 137 and 138—were significant ($P < 0.05$). Ten of these proteins were more represented in the plasma of susceptible snails and three were more represented in the plasma of resistant snails (Fig. 1B and C).

In order to identify these proteins, we first performed an in-gel digestion with trypsin. Trypsin digest were then analysed by ESI-MS-MS to obtain sequence tags for these proteins (Table 1). These sequences were compared to databases using MS-Pattern software. Sequence tags obtained for spot 1 matched with four ESTs of *B. glabrata*. These ESTs (accession numbers: AA547743, AA547744, AA547745 and AA547746) correspond to the 5' portion of cDNAs displaying high similarities to molecules belonging to the cystatin family of protease inhibitors. For example, AA547745 displayed an *E*-value of 1×10^{-5} for a cystatin of *Drosophila melanogaster* (accession number: S12913). In order to better characterise the gene encoding this protein, RT-PCR experiments were performed using primers designed from the ESTs

(see Fig. 2). From the PCR product sequenced, we designed forward primers which were used to obtained the 3' portion of the cDNA. This cDNA is 459 bp in length and encodes a 117 amino acids precursor (Fig. 2). The deduced amino acids sequence begins with a 18 residue signal peptide. The cleavage site for signal peptidase is most likely located after the serine residue preceding the glutamine in position 19 as predicted by the SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and PSORT II prediction program (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>). This signal peptide is directly flanked by a carboxyl-terminal 99 amino acid sequence. This protein has a calculated monoisotopic mass of 10,509.26 Da and a theoretical pI of 6.74, which are in good agreement with the position of the protein in the gel. Theoretical masses of peptides generated by the PeptideMass software (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>) were compared to the experimental peptide mass fingerprint of spot 1 obtained by MALDI-ToF mass spectrometry. Four common fragments were identified covering 49% of the protein (signal peptide excluded). Combined results from cDNA cloning and mass spectrometry therefore confirmed that the spot 1 is a novel *B. glabrata* protein belonging to the type-2 cystatin family (Bg type-2 cystatin, GenBank accession number AY678119).

The sequence tags obtained from the other spots were insufficient to identify the other proteins using the same approach. Consequently, tags obtained from spots 3, 4, 6, 7, 31, 48 and 58 were used to design the degenerate forward primers shown in Table 1. These primers and a d(T)₁₇ primer were used in RT-PCR experiments to amplify cDNA fragments corresponding to the 3' portion of the genes encoding these different proteins. After cloning and sequencing, reverse primers were designed from these sequence and 5'-RACE PCR experiments were performed to obtain the complete open reading frame. cDNAs corresponding to the spots 6, 7, 48 and 58 were characterised.

cDNAs corresponding to the proteins 6 and 7 (GenBank accession numbers: AY678123 and AY678120) encode precursors displaying high degrees of similarities (Fig. 3). They encode two isoforms containing four EF-hand domains (detected by RPS-BLAST program, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) characteristic of Calcium Binding Proteins (CaBPs). These precursors are highly similar to other CaBPs like calmodulins for example. Furthermore, these proteins are probably secreted as predicted by the PSORT II prediction program (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) and which is in agreement with the plasmatic location of the proteins. These two proteins were named Bg CaBP 1 (spot 6) and 2 (spot 7).

cDNAs corresponding to the proteins 48 and 58 also encode two highly similar isoforms (Fig. 4). Confrontation of the deduced amino acids sequence to the databank reveal high similarities to an endo-1,4- β -mannanase of the bivalve

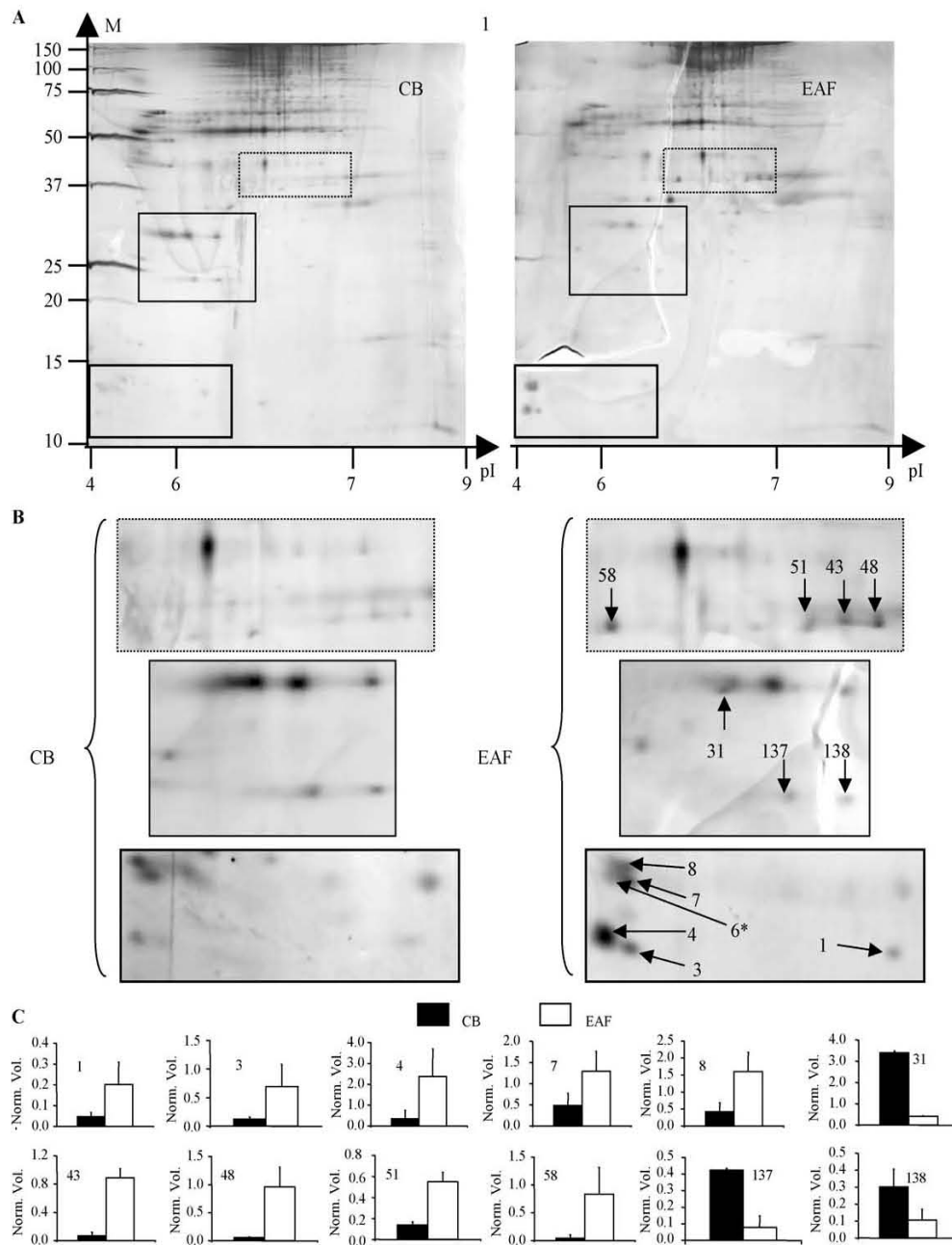


Fig. 1. Comparison of plasmatic protein patterns from uninfected susceptible and resistant snails. (A) Silver-stained 2D gels of plasmatic proteins from *Biomphalaria glabrata* resistant (CB-R) and susceptible (EAF-S) snails. Molecular mass (M) calibration is indicated on the left of the gel and pI calibration on the bottom of the gel. The pI calibration was done with pI standards run in the same conditions on a separate gel. Areas containing differentially represented proteins are boxed. (B) Enlarged views of the areas of interest. Positions of differentially represented proteins are indicated by arrows. * Spot 6 was not detected on CB-R gels. (C) Normalised volume of plasmatic proteins differentially represented between CB-R and EAF-S quantified with Progenesis™ software. The figure shows the average values obtained from three gels for each condition. * Significant differences when using the Student *t*-test ($P < 0.05$).

Mytilus edulis (E -value = 1×10^{-106} , Swiss-Prot accession number Q8WPJ2, Xu et al., 2002). These two proteins were named endo-1,4- β -mannanase 1 and 2 (GenBank accession numbers: AY678121 (S58) and AY678122 (S48)). Note that S58 is also probably secreted as predicted by the PSORT II prediction program.

3.2. Differential plasmatic representation of the proteins is correlated to a differential transcription level between the two strains

The expression ratio of each gene to ribosomal protein (S19) appears substantially higher in susceptible snails


```

ccatgttgaagattgcctagttgtgttgctggctgttgccctttcatttcaagtcagctc
M L K I A L V V L L A V V P F I S S Q L
gttgagggtcaggtgcctacactaccacttttaaatgaccccaatgtttgttgccgtc
V G G Q V P Y T T T L N D P N V L F A V
aaagcaatcaacagcttctatcagcaacaaggggacaacaacctgagaacaggagtc
K A I N S F Y Q Q Q G D N N L R T G V K
attgtccacgccacatctcaggtggtgtgtgctgttatagattcaccattcaagtc
I V H A T S Q V V A G A L Y R F T I Q V
agcggcggaagcacgaacgaagattgtacagtagccgtctggagccgccatggctatct
S G S T N E D T V A V W S R P W L S
ggtaatgaagccaccaactacagggaacaccatcctgtgtagcatcagcataaataact
G N E A T Q L Q G T P S V A S A
gcccaacttatttattgattttttttattataagataagcttaaatctatttcaaaata
aaacatttaatacggattcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Fig. 2. cDNA (complete coding sequence and 3' untranslated region) corresponding to the protein 1. The deduced amino acids sequence is shown in upper case letters. The precursor displays a signal sequence highlighted in pale grey. The domain shared by all cysteine protease inhibitors is boxed. The amino acids shared by type 2 cystatins are highlighted in dark grey. Fragments of the protein identified by analysis of mass spectrometry data are underlined (mass fingerprint and tags obtained by MALDI-ToF and ESI-MS-MS, respectively). Polyadenylation signal is double-underlined. The primers designed from the ESTs are indicated in italic and bold.

(Fig. 5A). These results are in agreement with the differential representation of the corresponding protein quantified using the Progenesis™ software (Fig. 5B). Therefore, differences in plasmatic protein content appear correlated with differences in expression ratios of the corresponding genes.

3.3. Effect of infection on expression ratios

Expression ratio of the different genes were analysed in susceptible and resistant snails at different times (0, 3, 6, 12, 24, 48 and 96 h) post-exposure to *E. caproni* (Fig. 6). Expression ratios of all genes are substantially lower in uninfected resistant than in uninfected susceptible snails. A global analysis of expression ratios during the kinetics of infection reveals a significant increase of transcript levels for the different genes in resistant snails. Indeed, transcripts corresponding to proteins 1, 6, 7, 48 and 58 are 2.8, 16.9, 6.5, 5.4 and 4.8 times more abundant at different times after infection of resistant snails, respectively. In contrast, in susceptible snails, significant decreases are observed for all the genes following parasite exposure.

3.4. Comparison of expression ratios in various snail tissues

To investigate tissue transcription of the genes encoding proteins 1, 6, 7, 48 and 58, quantitative PCR analyses were

carried out using total RNA from the various snail tissues representative of the entire snail (Fig. 7). For the five genes, the highest expression ratios were observed in the albumen gland. Weak amounts of transcripts were detected in other tissues, particularly in hemocytes and head-foot for the gene encoding protein 1 and in head-foot for the gene encoding protein 7.

4. Discussion

Although, the importance of both humoral and cellular factors in determining the success or failure of a trematode infection has been highlighted for a number of years, past molecular studies mainly focused on the cellular effectors (Miller et al., 2001; Raghavan et al., 2003). Except for the highly diversified family of plasmatic fibrinogen-related proteins (Adema et al., 1997; Zhang et al., 2004), little is currently known on humoral factors.

As an approach to further investigate the suspected involvement of plasmatic factors in *B. glabrata* resistance/susceptibility to *E. caproni*, we compared protein patterns of plasma collected from susceptible and resistant snails. This proteomic approach revealed that 13 out of the 197 plasmatic proteins exhibited significant differences in their apparent representativity.

Characterization of the cDNA corresponding to the spot 1 has been possible by direct comparison of tags obtained by

```

Spot7 MFAYALLICLPMLAFQDFLANQEFNRFDVDGDGNIEPREVQYFRRFADGDGRISRQE
Spot6 MFAYALLICLPMLAFQDFLANQEFNRFDVDGDGNIEPREVQYFRRFDTNGDNQISRQE

Spot7 YRDEVDTHHINFPEAHRALLRLFDEIDYDNDNHLDQSDYNTLFNNADANQNDLVNHNELR
Spot6 YRQEVDTHLNPETHRALLRLFDEVDYNDGFLDQSDFNKLFTNADANQNDLVNHNELV

Spot7 -----
Spot6 TYFHQLTGGPVIG

```

Fig. 3. Deduced amino acid sequences and alignment of protein 6 and 7 precursors (complete and partial CDS, respectively). Conserved amino acids are highlighted in grey. Signal sequences are highlighted in dark grey. The four EF-hand domains are boxed. Theoretical tryptic fragments matching with the peptide mass fingerprint obtained after tryptic digestion of these proteins are represented in italic and bold. These matching fragments cover 39 and 56% of the protein 7 and 6, respectively (signal peptide excluded).

Spot58	M KTLITGFLVVLCTLKLVC A RLAVSGNQFTYNGQRIFLSGGNLPWIQYAYDFGDHQWDSR
Spot48	-----
Spot58	K GT F EN Q LT Q LKNAGGNSIRLWVHIQGESTPAFDGNGYVTAPDHQGT L INDFKDMLDIAQ
Spot48	-----
Spot58	R H NILVFP T LWNA A VDQ D NSHRLD G FI D WRK L QSYIDKALVPLASAVR G HPALGAWD I M
Spot48	-----LDGLIVDERKLQSYIDKVL T PL A TAVKGHPALGAWD I M
Spot58	N EP E GMINTD I SNWDRCYD S TALKNSGAGWAGKKY S YDTLRFINWQADAIKNVDSGFLV
Spot48	N EP E GMINPD I GNSDRCYD A TALKNSGAGWAAKKYGYHD I IRFVNWQAAA I KHVD P GF L V
Spot58	T VG S WNPK S NTD Q FGFVDHYSDNCLV K LGPNGK L DFY Q FHTYSYQGNFDNVSPFKHSAG
Spot48	T VGAWNP K SNTDRFGFVDHYSDACLL K GGK P NGK L DFY Q VHSYSYQGNFDNVSPFKHSAG
Spot58	DYGTGKPIVVGEFWEQDGGGMNIDQLFDYVYNHGYAGAWSWDLMAHGDNQRRGGISHIKNY
Spot48	DFGTGKPIVVGEFWEQDGGGMNINQLFEYVYNHGYAGAWSWDLQAHGANQRRGGISHIKGL
Spot58	NWNGQ I GINL
Spot48	TSNGV I PINV

Fig. 4. Deduced amino acid sequences and alignment of partial and complete CDS of proteins 48 and 58, respectively. Conserved amino acids are highlighted in pale grey. Signal sequence of protein 58 is highlighted in dark grey. Theoretical tryptic fragments matching the peptide mass fingerprint obtained after tryptic digestion of these proteins are represented in italic and bold. These matching fragments cover 48 and 45% of the proteins 48 and 58, respectively.

ESI-MS-MS to databases. This cDNA has been identified as encoding a type-2 cystatin. Cystatins are cysteine protease inhibitors that have been reported in all *phyla* of living organisms (Abrahamson et al., 2003). They control activity of cathepsins, themselves involved in various biological processes, including immune processes (Abrahamson et al., 2003). Some parasites such as the nematodes *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Acanthocheiloneuma vitea* or *Nippostrongylus brasiliensis* are known to secrete cystatins that inhibit hosts immune responses (Hartmann and Lucius, 2003). Whether the *B. glabrata* cystatin characterised here is involved in regulation of immune processes remains to be elucidated. However, its higher representativity in the plasma from susceptible snails is intriguing as it could reflect a constitutively stronger down-regulation of immunity facilitating parasite establishment in the first hours following infection.

cDNAs corresponding to the spots 6 and 7 are isoforms of a CaBP of the EF-hand type. CaBP play a key role in calcium

signaling and homeostasis. Because the CaBP identified here are extracellular proteins located in the plasma, it is more likely that they participate in calcium homeostasis. However, links between differential representation of these proteins and susceptibility/resistance may exist. A first possibility is that these proteins are involved in regulation of adhesion processes. Cellular adhesion is often calcium-dependant and may be regulated by calcium-dependant molecules such as C-lectins in *B. glabrata* (Duclermortier et al., 1999). Because adhesive processes are optimal for a given concentration range of extracellular calcium (Johansson and Soderhall, 1988), differences in some extracellular CaBP content may result in differences in extracellular calcium concentration and therefore in differential regulation of adhesive processes. A second possibility is that these CaBP are antiparasitic. Such activity has been shown for the human plasmatic CaBP, Calgranulin C. This protein: (i) is one of the initiation factors of *S. mansoni*-induced granulomas (Yang et al., 1997); (ii) is involved in

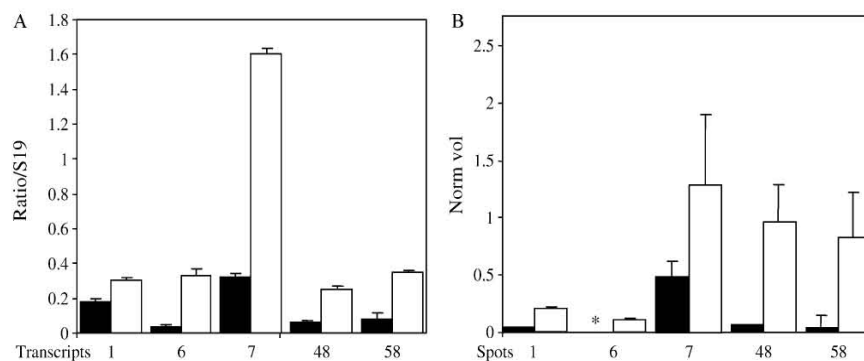


Fig. 5. Differential abundance of transcripts (A) and the corresponding plasmatic proteins (B) in the resistant CB-R (dark boxes) and susceptible EAF-S (light boxes) uninfected snails. (A) Transcript ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relative to S19 (ratio/S19). Each histogram is the average value of triplicates. (B) Normalised volumes (volume of each spot/all spot volumes added) of plasmatic proteins calculated with the Progenesis™ software. Histograms represent the average values from three gels. *, not detected.

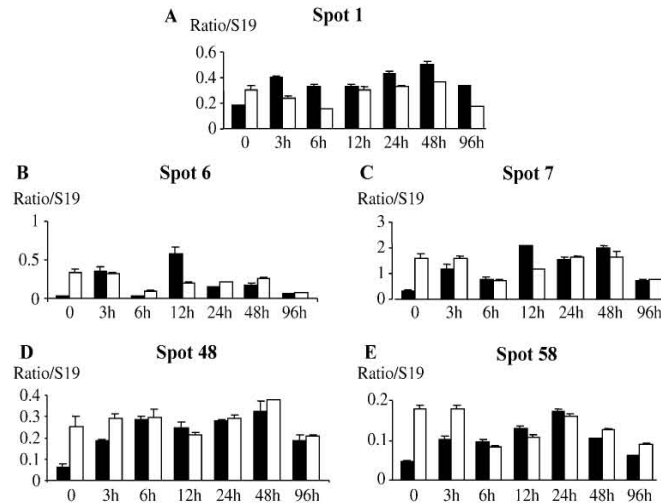


Fig. 6. Ratios of transcripts corresponding to spots 1 (A), 6 (B), 7 (C), 48 (D) and 58 (E) in the resistant CB-R (dark boxes) and susceptible EAF-S (light boxes) infected snails at different times post-exposure. Ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relatively to S19 expression levels (ratio/S19). Each histogram is the average value of triplicates $\pm$ SD.

the inflammatory response against *O. volvulus* (Marti et al., 1996) and; (iii) shows a filaricidal action against *B. malayi* (Gottsch et al., 1999). In our model, the massive induction of the gene encoding protein 6 in resistant snails 12 h p.i. could directly participate to the elimination of this parasite.

Two other cDNAs corresponding to spots 48 and 58 encode two isoforms of an endo-1,4- β -mannanase which displays significant similarities with a mannanase from *Mytilus edulis* (Xu et al., 2002). This type of molecule randomly cleaves within the β -1,4-mannan main chain of galactomannan, glucomannan, galactoglucomannan and

mannan. It has been purified from a range of plants, fungi, and bacteria, and has been reported in gastropod snails such as *Pomacea insularis* and *Littorina brevicula* (Yamaura et al., 1997; Yamaura et al., 1996). Mannanases could be involved in the *B. glabrata*/*E. caproni* interactions as carbohydrates are known to participate to helminth immune-evasion strategies (Harnett and Harnett, 2001; Haslam et al., 2001; Khoo and Dell, 2001). For example, previous results suggested that a glycosylated polypeptide was at least partly responsible for the immunosuppressive activity of *E. caproni* ES products on *B. glabrata* hemocytes (Humbert and Coustau, 2001). Such glycosidases could

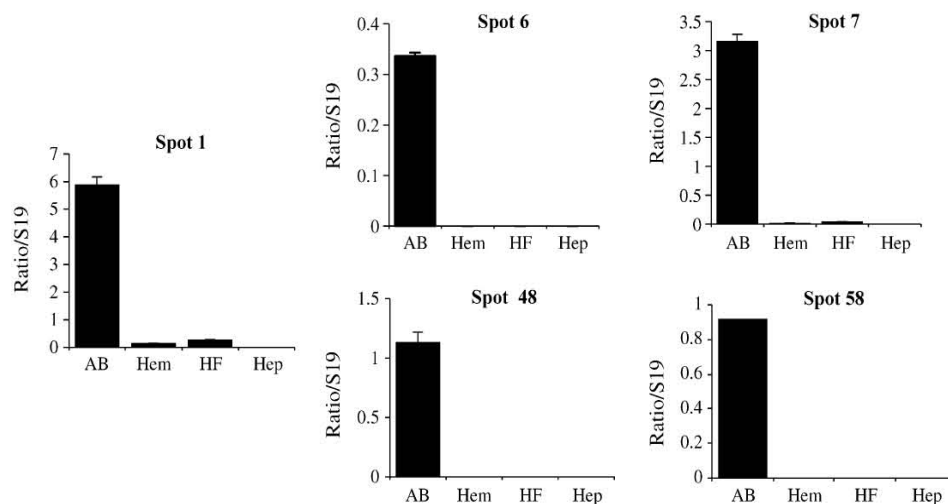


Fig. 7. Ratios of transcripts corresponding to spots 1, 6, 7, 48 and 58 in tissues of *Biomphalaria glabrata*: AB, albumen gland; Hem, hemocytes; HF, head foot; Hep, hepato-pancreas. Ratios were determined using real-time quantitative PCR and are shown relative to S19 levels (ratio/S19). Each histogram is the average value of triplicates $\pm$ SD.

therefore modify the structure of parasite molecules (whether secreted or surface-exposed) and their interactions with host factors. This hypothesis may be supported by previous observations showing that *S. mansoni*-susceptible *B. glabrata* exhibit a higher β -D-mannosidase activity than resistant snails (Zelck, 1999).

Expression studies of these five candidate genes showed that the transcript content of all candidates are stable in susceptible snails following infection, while they increase significantly in exposed resistant snails. For the gene corresponding to protein 6, we note a significant increase of transcripts level especially 12 h p.i. whereas transcription is quite stable in susceptible snails.

As high transcript levels of these genes are observed in the albumen gland, all the differences observed between susceptible and resistant snails could be linked to a differential regulation of genes expressed by this organ. In molluscs, the albumen gland is considered as an accessory sexual gland involved in the synthesis of various compounds like galactogen necessary for egg development (Wijdenes et al., 1983). Nevertheless, this organ is also involved in the production of defense effectors like agglutinins in planorbid snails (Michelson and Dubois, 1977; Stein and Basch, 1979; Boswell and Bayne, 1984) or antimicrobial proteins in opisthobranch gastropods (Iijima et al., 1994; Takamatsu et al., 1995). Our results further support the idea that the albumen gland may play a significant role in snail immune response.

In conclusion, this first proteomic approach has been successful in identifying secreted proteins that were differentially represented in the plasma from *E. caproni*-susceptible and—resistant *B. glabrata*. Molecular characterization of the corresponding genes provided informative data on the potential functions of these proteins. According to these predicted functions, various assumptions can be made on their potential involvement in susceptibility/resistance processes. Future functional studies are needed to clarify the role of these genes in the host-parasite interaction. Interestingly, our results also showed that these genes are mainly expressed in the albumen gland and raise the question of the potential importance of this organ in processes underlying susceptibility/resistance to *E. caproni*. In order to elucidate the role of the albumen gland in defense and/or resistance processes, future studies will focus on genes expressed by this organ in susceptible and resistant snails after infection.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS. The Proteomics facility used in this study was funded by the European Community (FEDER) the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, the Génopole of Lille and the Université des Sciences et technologies de Lille.

References

- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., Nathanson, C.M., 2003. Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.*, 179–199.
- Adema, C.M., Hertel, L.A., Miller, R.D., Loker, E.S., 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8691–8696.
- Ataev, G.L., Coustau, C., 1999. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 187–198.
- Boswell, C.A., Bayne, C.J., 1984. Isolation, characterization and functional assessment of a hemagglutinin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Dev. Comp. Immunol.* 8, 559–568.
- Duclermortier, P., Lardans, V., Serra, E., Trottein, F., Dissous, C., 1999. *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins. *Parasitol. Res.* 85, 481–486.
- Gotsch, J.D., Eisinger, S.W., Liu, S.H., Scott, A.L., 1999. Calgranulin C has filariacidal and filariastatic activity. *Infect. Immun.* 67, 6631–6636.
- 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.
- Harnett, W., Harnett, M.M., 2001. Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes. *Biochim. Biophys. Acta* 1539, 7–15.
- Hartmann, S., Lucius, R., 2003. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int. J. Parasitol.* 33, 1291–1302.
- Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., 2001. Mass spectrometric strategies: providing structural clues for helminth glycoproteins. *Trends Parasitol.* 17, 231–235.
- Humbert, E., Coustau, C., 2001. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata*-*Echinostoma caproni* system. *Parasitology* 122, 651–660.
- Iijima, R., Kisugi, J., Yamazaki, M., 1994. Biopolymers from marine invertebrates. XIV. Antifungal property of Dolabellin A, a putative self-defense molecule of the sea hare, *Dolabella auricularia*. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1144–1146.
- Jeyarasingam, U., Heyneman, D., Lim, H.K., Mansour, N., 1972. Life cycle of a new echinostome from Egypt, *E. liei* sp. nov. (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology* 65, 203–222.
- Johansson, M.W., Soderhall, K., 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* 106, 1795–1803.
- Kho, K.H., Dell, A., 2001. Glycoconjugates from parasitic helminths: structure diversity and immunobiological implications. *Adv. Exp. Med. Biol.* 491, 185–205.
- Langand, J., Jourdan, J., Coustau, C., Delay, B., Morand, S., 1998. Cost of resistance, expressed as a delayed maturity, detected in the host-parasite system *Biomphalaria glabrata*-*Echinostoma caproni*. *Heredity* 80, 320–325.
- Leonard, 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.
- Loker, E.S., Adema, C.M., 1995. Schistosomes, echinostomes and snails: comparative immunobiology. *Parasitol. Today* 11, 120–124.
- Marti, T., Ertmann, K.D., Gallin, M.Y., 1996. Host-parasite interaction in human onchocerciasis: identification and sequence analysis of a novel human calgranulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 454–458.

- Michelson, E.H., Dubois, L., 1977. Agglutinins and lysins in the molluscan family Planorbidae: a survey of hemolymph, egg-masses, and albumen-gland extracts. *Biol. Bull.* 153, 219–227.
- Miller, A.N., Raghavan, N., FitzGerald, P.C., Lewis, F.A., Knight, M., 2001. Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *Int. J. Parasitol.* 31, 687–696.
- Morrissey, J.H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117, 307–310.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255–262.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Raghavan, N., Miller, A.N., Gardner, M., FitzGerald, P.C., Kerlavage, A.R., Johnston, D.A., Lewis, F.A., Knight, M., 2003. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 181–191.
- Sminia, T., Barendsen, L., 1980. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails, *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncatus*. *J. Morphol.* 165, 31–39.
- Stein, P.C., Basch, P.F., 1979. Purification and binding properties of hemagglutinin from *Biomphalaria glabrata*. *J. Invertebr. Pathol.* 33, 10–18.
- Takamatsu, N., Shiba, T., Muramoto, K., Kamiya, H., 1995. Molecular cloning of the defense factor in the albumen gland of the sea hare *Aplysia kurodai*. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 377, 373–376.
- Trouvé, S., Renaud, F., Durand, P., Jourdan, J., 1996. Selfing and outcrossing in a parasitic hermaphrodite helminth (Trematoda, Echinostomatidae). *Heredity* 77, 1–8.
- Wijdenes, J., Van Elk, R., Joosse, J., 1983. Effects of two gonadotropic hormones on polysaccharide synthesis in the albumen gland of *Lymnaea stagnalis*, studied with the organ culture technique. *Gen. Comp. Endocrinol.* 51, 263–271.
- Wu, X., Ritter, B., Schlatjan, J.H., Lessmann, V., Heumann, R., Dietzel, I.D., 2000. Protein expression patterns of identified neurons and of sprouting cells from the leech central nervous system. *J. Neurobiol.* 44, 320–332.
- Xu, B., Hagglund, P., Stalbrand, H., Janson, J.C., 2002. Endo-beta-1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action. *J. Biotechnol.* 92, 267–277.
- Yamaura, I., Nozaki, Y., Matsumoto, T., Kato, T., 1996. Purification and some properties of an endo-1,4-beta-D-mannanase from a marine mollusc, *Littorina brevicula*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 674–676.
- Yamaura, I., Koga, T., Matsumoto, T., Kato, T., 1997. Purification and some properties of endo-1,4-beta-D-xylanase from a fresh-water mollusc, *Pomacea insularis* (de Ordigny). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 615–620.
- Yang, T.H., Tzeng, S., Cheng, I., Burnett, M.G., Yoshizawa, Y., Fukuyama, K., Lee, S.C., Epstein, W.L., 1997. Identification of the mouse calcium-binding proteins, MRP 8 and MRP 14, in *Schistosoma mansoni*-induced granulomas: biochemical and functional characterization. *J. Leukoc. Biol.* 61, 258–266.
- Zelck, U.E., 1999. Glycosidase activities in plasma of naive and schistosome-infected *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Parasitology* 119 (Pt 6), 563–568.
- 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. Dev. Comp. Immunol.* 27, 175–187.
- 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, 684–694.
- Zhang, S.M., Adema, C.M., Kepler, T.B., Loker, E.S., 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* 305, 251–254.

Chapitre 2

Chapitre 2

Recherche de candidats impliqués dans la compatibilité parmi les gènes des hémocytes qui participent potentiellement au processus d'adhérence par une approche transcriptomique

Publication n°2

Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of adhesion genes. (2006), *International Journal for Parasitology*, 36: 175-184.

Des propriétés d'adhérence différentielle ont été mises en évidence lors de travaux antérieurs réalisés *in vitro* entre les hémocytes provenant de mollusques *B. glabrata* susceptibles et résistants à *E. caproni*. En effet, suite à l'exposition aux produits d'excrétion-sécrétion (ES) du parasite *E. caproni*, les hémocytes issus des mollusques susceptibles perdent rapidement (dans les minutes qui suivent l'exposition) leur capacité à adhérer : les pseudopodes se rétractent, les cellules s'arrondissent ; alors que les hémocytes issus des individus résistants ne sont pas affectés par ces produits ES et conservent leur capacité d'adhérence intacte (Humbert & Coustau, 2001).

Etant donné que la susceptibilité-résistance de *B. glabrata* vis à vis de *E. caproni* peut être reliée de manière directe ou indirecte aux propriétés adhésives différentielles que présentent les hémocytes provenant de mollusques susceptibles et résistants, nous avons choisi de réaliser une étude beaucoup plus ciblée afin de comparer l'expression des gènes potentiellement impliqués dans les processus d'adhérence chez les mollusques susceptibles et résistants par PCR-Quantitative. Pour cela, nous avons recherché à partir des séquences de *B. glabrata* disponibles dans la division dbEST de Genbank, les séquences qui présentaient des similarités pour des gènes d'adhérence dans des systèmes hétérologues en utilisant le programme BLASTX (<http://blast.genome.jp/>). Les programmes RPS-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) et ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) ont été utilisés pour valider, par la recherche de domaines spécifiques, l'appartenance des gènes sélectionnés à la classe des molécules d'adhérence. L'analyse en PCR-Quantitative nous a permis de révéler quatre gènes dont les

taux des transcrits étaient constitutivement et significativement différents entre les hémocytes issus des individus susceptibles et résistants. Ces gènes codent deux protéines de type dermatopontine, une de type matriline et une de type cadhérine. De plus, l'expression de ces gènes a été étudiée, en cinétique, suite à l'exposition au parasite. Les résultats suggèrent que les protéines de type dermatopontine pourraient être impliquées dans les différences de compatibilité que présentent les deux souches de mollusques. Enfin, une étude de l'expression de gènes possédant des domaines protéiques de type VW (Von Willebrand) potentiellement impliqués dans la structuration de la matrice extra-cellulaire ou dans des processus de coagulation a été réalisée à l'échelle du mollusque entier. Elle a révélé que neuf de ces gènes étaient surexprimés de façon significative chez les individus susceptibles. Ce résultat nous a conduit à formuler l'hypothèse de la formation d'un réseau filamenteux dans l'hémolymphe de *B. glabrata* qui pourrait être beaucoup plus dense et compact chez les individus susceptibles que chez les individus résistants, ce réseau empêchant la migration des hémocytes en direction du parasite.

Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of adhesion genes[☆]

A. Bouchut, E. Roger, C. Coustau, B. Gourbal, G. Mitta *

Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5555, CNRS Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, Perpignan Cedex 66860, France

Received 12 July 2005; received in revised form 16 September 2005; accepted 20 September 2005

Abstract

Because susceptibility or resistance of *Biomphalaria glabrata* to the trematode *Echinostoma caproni* correlates with differential hemocytic adhesive properties, we compared the expression of genes involved in adhesion processes between hemocytes from susceptible and resistant snails. Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis revealed four genes whose transcripts were differentially represented between hemocytes from resistant and susceptible snails. These genes encode two dermatopontin-like, one matrilin-like and one cadherin-like proteins. Expression analyses performed following parasite exposure suggested that dermatopontins may be involved in the compatibility differences between these strains. We also investigated expression levels on whole snails of different genes potentially involved in extracellular matrix structure or coagulation. Our results support the hypothesis that susceptible snails possess a hemolymph coagulation-like system that is more potent than that of resistant snails. This system may prevent hemocyte migration towards the parasite larvae and therefore facilitate parasite settlement in susceptible snails.

© 2005 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*; *Echinostoma caproni*; Host–parasite interactions; Adhesion; Resistance; Hemocytes

1. Introduction

Snail-trematode immunobiological interactions have been studied in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* following infection by the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and by the echinostome species, *Echinostoma paraensei* and *Echinostoma caproni*. In these different models, compatibility polymorphism was highlighted (Langand and Morand, 1998). In order to elucidate the mechanisms underlying differences in compatibility, numerous comparative molecular studies between susceptible and resistant strains of molluscs were undertaken. These studies revealed that numerous genes were differentially expressed between strains of *B. glabrata* susceptible or resistant to *S. mansoni* or

E. caproni (Miller et al., 2001; Raghavan et al., 2003; Lockyer et al., 2004; Nowak et al., 2004; Vergote et al., 2005).

In our model *B. glabrata*/*E. caproni*, two snail strains of *B. glabrata* were selected (Langand et al., 1998). *Echinostoma caproni* miracidia are able to penetrate both susceptible and resistant snails. While the parasite undergoes normal development in susceptible snails, in resistant snails it is encapsulated and eliminated. Susceptibility/resistance mechanisms of *B. glabrata* to *E. caproni* are probably inherited in a multigenic fashion (Langand and Morand, 1998) and have been shown to rely on both cellular and humoral factors (Ataev and Coustau, 1999). Regarding humoral factors, five proteins differentially represented in the plasma of susceptible and resistant snails were recently characterised, using a proteomic approach (Vergote et al., 2005). Regarding the cellular factors, studies showed that excretory–secretory (ES) products from in vitro transformed *E. caproni* sporocysts inhibited key defence functions of susceptible host hemocytes such as adhesion and phagocytosis (Humbert and Coustau, 2001). Interestingly, hemocytes from resistant snails remained unaffected by these parasite ES products, suggesting that they exhibit constitutive differences compared with hemocytes from susceptible snails (Humbert and Coustau, 2001). Because such differences were

[☆] Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ database under the accession numbers: DQ114425, DQ114426, DQ113388, DQ113389, DQ113390, DQ113391, DQ113392, DQ113393, DQ113394, DQ113395, DQ113396, DQ113397, DQ113398, DQ113400, DQ113401, DQ113402, DQ113403, DQ113404, DQ113405, DQ113406.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 6866 2188; fax: +33 4 6866 2281.

E-mail address: mitta@univ-perp.fr (G. Mitta).

indirectly or directly related to adhesive properties of hemocytes, we developed a targeted approach to examine the expression of genes directly involved in adhesion processes.

In the present study, we compared the transcript content of all known hemocytic genes potentially involved in adhesion processes between hemocytes of the two strains. We selected the differentially represented transcripts and characterised their corresponding open reading frames (ORF). Finally, we analysed their expression after exposure to the parasite.

2. Material and methods

2.1. Database search and sequence analysis

The *B. glabrata* nucleotide sequences available on GenBank (db EST of GenBank included) in December 2004 (6989 sequences) were imported in a fasta format. The sequences were assembled in clusters using the Sequencher™ software (Gene Codes Corporation). Consensus sequences from clusters were submitted to database searches using BLASTX program (<http://blast.genome.jp/>). Specific domain searches were performed using the RPS-BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) or the ScanProsite program (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>). Additional adhesion genes present in singletons were searched for using the homologies description of the different sequence submitters.

Putative signal peptides were detected using PSORTII prediction software (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>). The hydrophobicity of Bg dermatopontins was investigated using the Kyte and Doolittle method (Kyte and Doolittle, 1982) and the ProtScale software (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>).

2.2. *Biomphalaria glabrata* strains

Biomphalaria glabrata snails used in this study belonged either to the unselected Bg.Bra stock originating from Brazil (Guillou et al., 2004), or to the EAF-S or CB-R strains selected, respectively, for their susceptibility or resistance to *E. caproni* infection (Langand et al., 1998). At the time of the study, the percentages of adult snails susceptible to *E. caproni* were: Bg.Bra=70%, EAF-S=98% and CB-R=1%.

The parasite *E. caproni* (Jeyarasingam et al., 1972) was maintained in Bg.Bra snails and mice (SWISS OF1 stock) as described previously (Trouvé et al., 1996). For one experiment, adult EAF and CB snails (measuring 9–14 mm in shell diameter) were exposed to *E. caproni* according to previously described procedures (Guillou et al., 2004).

The Swiss OF1 mice used for this study came from our animal house. Our laboratory has received the permit No. A 66040 for experiments on animals from both French Ministry of Agriculture and Fisheries and French Educational Ministry of Research and Technology. 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

(Decree no. 87-848 19th October 1987; number of the authorisation 007083).

2.3. Hemocyte recovery and RNA extraction

Hemolymph was extracted from the headfoot of 200 EAF-S and CB-R snails according to standard procedure (Sminia and Barendsen, 1980) and immediately placed on ice. Approximately, 10 ml of hemolymph were recovered for each strain and centrifuged at 2000×g for 10 min at 4 °C. The pellets of hemocytes were immediately used for total RNA extraction using the NucleoSpin® RNA II Kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). Total RNA from whole body was extracted according to previously described procedures (Guillou et al., 2004).

2.4. Quantitative reverse transcriptase PCR (Q-PCR)

Q-PCR analysis of adhesion gene expression was performed on total RNAs extracted from hemocytes and whole bodies from unexposed and/or exposed (to *E. caproni*) EAF-S and CB-R snails. Reverse transcription was performed according to previously described procedures (Guillou et al., 2004). Specific primers for Q-PCR were edited using the LightCycler Probe Design Software version 1.0 (Roche Diagnostics). PCR reactions were set up according to the LightCycler Manual (Roche Diagnostics). The following LightCycler run protocol was used: denaturation program (95 °C, 10 min), amplification and quantification programs repeated 40 times (95 °C for 15 s, 60 °C for 5 s, 72 °C for 16 s), melting curve program (60–95 °C with a heating rate of 0.1 °C/s and continuous fluorescence measurement), and a cooling step to 40 °C. Amplification of single highly specific products was verified (melting curve analysis). For each reaction, the crossing point (CP) was determined using the 'Fit Point Method' of the LightCycler Software 3.3 (Roche Diagnostics). PCR reactions were performed in triplicate and the mean values of the CPs were calculated. For each mRNA to be analysed, the absence of contaminating genomic DNA was verified by running a no-RT control using primers for the ribosomal protein S19 (S19, accession number CK988928).

Amplification efficiencies (*E*) of each PCR product were determined according to previously described procedures (Guillou et al., 2004). For each sample, the level of transcription of the target gene (Tg) was compared with the transcription of the ribosomal protein S19. The transcription ratio (*R*) was calculated according to the formula:

$$R = (E_{Tg})^{CPTg} / (E_{S19})^{CPS19}$$

Statistical significance was assessed using the Mann–Whitney test for non-paired series and the Wilcoxon test for paired series. *P* values <0.05 were considered as significant. All tests were done using STATVIEW v. 4.5 statistic software package.

2.5. PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR

In order to investigate potential differences in cDNA sequences of the various genes of interest, several specific forward and reverse primers were used in this study (Table 1, specific primers used for Q-PCR are also given).

Biomphalaria glabrata cDNAs were used to amplify the various fragments. PCR was performed in 50 µl mixtures containing 2 µl of first-strand cDNA using the DyNAzymeEXT™ kit (Finnzymes). PCR cycling conditions were 30 s at 94 °C, 1 min at 60 °C and 1 min 30 s at 72 °C for 40 cycles. For each mRNA to be analysed, the absence of contaminating DNA was verified by running a no-RT control using the same specific primers. PCR products were cloned using TOPO TA

Cloning® (Invitrogen Life Technologies) with the pCR®4-TOPO® vector and chemically competent TOP10F One Shot® *Escherichia coli*. Plasmid DNA of the positive recombinant clones was purified using QIAGEN® Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN). For each amplified fragment, six clones were sequenced in both directions using dideoxy sequencing method (CEQ™ DTCs-Quick Start kit, Beckman Coulter) and a CEQ™ 8000 apparatus (Beckman Coulter). M13 forward, M13 reverse and specific primers were used for sequencing. Sequences were obtained using the CEQ™ 8000 sequence analysis software. Sequence analysis was performed using Sequencher™ software (Gene Codes Corporation).

In order to clone the 5'- or 3'-ends of the cDNAs, we used the GeneRacer™ Kit (Invitrogen) following the manufacturer's

Table 1

Primers used for PCR and quantitative (Q)-PCR

Primers used for Q-PCR		Gene (GenBank™ accession numbers)
Forward	Reverse	
AGACGACCACTCACTG	CCAATGGCTTGGGTCTC	Bg cadherin like-1 (CV022372, -4)
ACCCACCAACCTTTAG	TCTGCGTAGGCTTTCT	Bg cadherin like-3 (CK656861)
ACACCAAAGACTTTACTTCAG	GTTGTCTCTAATCAGGTTGACATA	
TCCGAGTCTCAATCATTAGC	CATATACTGGATGGCCCT	Bg matrilin (AF486289)
GCAAGAAAGGTACACACT	AGTTGAAGGGCTGGTC	Bg dermatopontin 2 (CK988741, -817, CK989009, -525)
CCACGACAACAGAAGG	CTAGTGGTCCGTCAAAATC	Bg dermatopontin 3 (CK989092, -409, -721, -676, -715, CK990133)
ACAGCAGAGGATGGTG	GCCATACGCTTCATCTTT	Bg α-integrin like 2 (CK988729, -945, CK989314)
GCTGACAGAGACCAGG	GAAAAGACTCCACGCC	
GAGAACTGCCCACTCA	GGTCTCTGGCACATCA	Bg VWD domain containing protein 1 (CN655005, CN779676, -716, -707, CV042526)
TTCCCGTCTGGAACCT	CCTCTGAGGAGGTACATT	Bg VWD domain containing protein2 (CV548583, -258, -542, -237, -539, -566, CO870398)
AAAGACGTACCGAGGAT	CACTGAAAGCTAGAGCAC	Bg VWA domain containing protein 2 (CK988803, CK989503, -678, -931)
CCAATGTGTTTGAGATCGG	TGACCACAGCTACTCG	Bg VWA domain containing protein 3 (CK989946, -671, -217, -773, -438, CK988907)
GGCTTTGTTGCAGGAC	TCCATCTGGTATTTGAGAGT	Bg VWC domain containing protein3 (CK149358, -489)
CCCAGGAAGACTCTGC	GGGTGGCTCCTACAAT	Bg-spondin domain containing protein (CK989024, -796, CK988997)
TGCTCTACAGTCAGGAA	GTCTGAGCTAACGCCAC	Bg-thrombospondin domain containing protein (CV548567, -042547, CN779718, -445838, CK149156, -085011, CD760632)
ATTACCTACACAGCATCT	TGTCCAGGCTCAACAC	Bg multiple EGF and TSP domain containing protein (CV548577, -50, CO870431, -389, CN445784)
GGAACCTGTGACGCTG	ACATCCATTAGTGCAACC	Bg chitin binding, multiple EGF and TSP domain containing protein (CN445780, -65, -71, CO635925)
CTACCTAACCCTCACTAG	CTCCATCTTTGCTTGATGT	FREP 3.3 (AF515461)
<i>Primers used for cDNA cloning</i>		
Forward	Reverse	Gene
GTTATTGAACCAACACTGGC	ACAAAGTTGTAAATAGAGCTC	Bg cadherin like-1
TCCTGATGAAGGCCTAAATGG	AACTAGGTCTGAGGCATTCTG	Bg cadherin like-3
AACAGAGACTTCAAGACAGCC	TAACTTTGGTCACGCCAGGTC	Bg matrilin
CTCTTGATCTGGAAAAAATCAA	CAATGCAATCGGCTTTTAGTCTA	Bg dermatopontin 2
TAGACTTCATTACACTGACAACA	TGCTTTTCAATAATCCTTCCATC	Bg dermatopontin 3
GCTCCAGTAAGCGTTGTGCTG	TTCCATGCTGGACTACACACC	Bg α-integrin like-2
AGGTAGCCACACAGCAC	GGCTTTACTGAGGGTCT	Bg VWD domain containing protein 1
CTCTACTTTGTGGATCAGCTG	TTTCAGCCCATGTTTGACGGC	Bg VWD domain containing protein 2
TAACTGTCCTAGCGTGATCC	TCGTCACTCCAGTCAGGTAAG	Bg VWA domain containing protein 2
AACCACGTTAATACAAGACAT	AAAATTACCAGAGCCGC	Bg VWA domain containing protein 3
AAGGACGCATGTGAGGGAAGC	ATGCTGGTACTGCCTGGACAG	Bg VWC domain containing protein 3
TTGTCTGCTCCTGACAAGCGG	TTACAGACTTCCTTGACCGC	Bg-spondin domain containing protein
AATGCACTTGTCGCAACGGTG	GTGATGAGTTCCAATCTGCCG	Bg thrombospondin domain containing protein
TGTTCTTGTCCTCAAGTGTGAC	GTTCAAGTTGGACATTGGC	Bg multiple EGF and TSP domain containing protein
CAATTGTGACTACCCCTCCAC	AGGACATCCGATTGGAATCC	Bg chitin binding, multiple EGF and TSP domain containing protein
CTGGATGTTATCAGATCTC	AGATTGTAGTCTGGAGGTT	FREP 3.3

instructions. The resulting PCR products were ligated and sequenced as described above.

3. Results

3.1. Database search for adhesion genes and expression analysis

In order to examine a maximum of genes potentially involved in adhesion processes, we selected genes displaying similarities with: (i) cell adhesion molecules (CAM) like

cadherins, immunoglobulin superfamily molecules, selectins, integrins and mucins; (ii) extracellular matrix (ECM) molecules mediating cell–matrix or matrix–matrix interactions like collagen, thrombospondin, laminin or fibronectin; and (iii) intracellular proteins linking CAM and cytoskeleton and cell signalling proteins involved in the regulation of cytoskeleton structure and CAM activation. Table S1 (online) in Appendix shows the different genes retained for the analysis and the detected domains of the corresponding proteins.

As a first approach to screen differences in these genes, we investigated their presence in transcripts representativity in

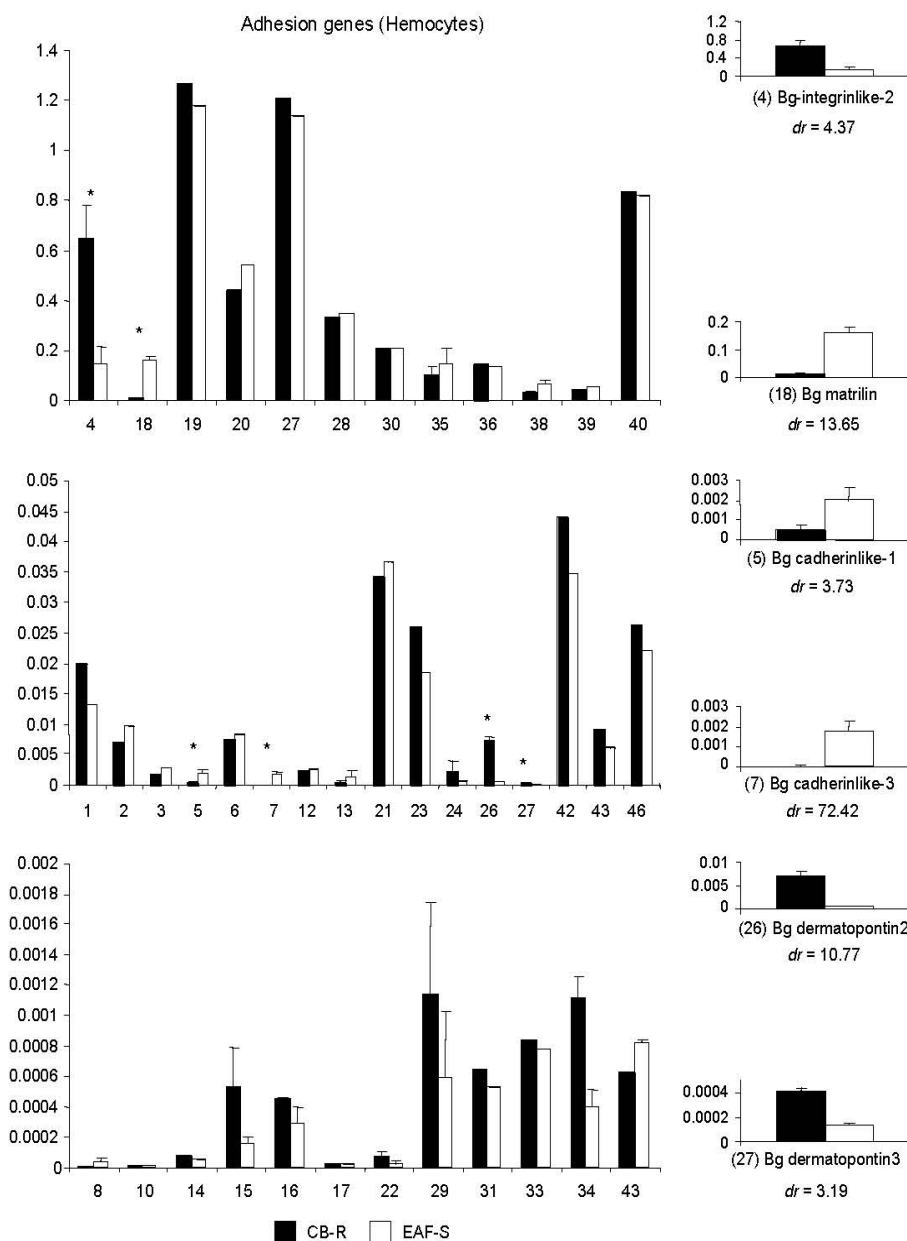


Fig. 1. Ratios of transcripts corresponding to genes potentially involved in adhesion processes in hemocytes from resistant CB-R and susceptible EAF-S snails. Ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relative to S19 expression levels (ratio/S19). Each histogram is the average value of triplicates $\pm$ SD. dr : differential representativity of transcript between strains. *Genes showing differences in transcript levels that were significant ($P < 0.05$) and greater than three-fold.

Table 2

GenBank accession numbers of cDNAs corresponding to Bg cadherin like-1, Bg matrilin, Bg dermatopontin-2 and -3 characterised from hemocytes of CB and EAF snails

Gene	CB strain	EAF strain
Bg cadherin like 3	DQ114425	DQ114426
Bg integrin like 2	DQ113388	DQ113389
Bg cadherin like 1	DQ113390	DQ113391
Bg matrilin	DQ113392	DQ113393
Bg dermatopontin-2	DQ113394	DQ113395
Bg dermatopontin-3	DQ113396	DQ113397

hemocytes from the two strains. Representation of the transcripts corresponding to the 46 genes was analysed, using Q-PCR, on total RNA extracted from hemocytes of 200 snails (from each strain). Among the 46 transcripts analysed, six showed significant differences ($P < 0.05$) in transcript levels that were greater than three-fold (results shown in Fig. 1).

3.2. cDNA characterisation of the genes displaying differential hemocytic transcript content in hemocytes from susceptible and resistant snails

In order to validate the differences in transcript content between hemocytes of susceptible and resistant snails, we verified that PCR primers were not edited on sites containing mutations between the two strains. cDNA sequences from six EAF-S susceptible snails and six CB-R resistant snails were obtained. Comparisons of sequences revealed that there were no mutations on sequences used to amplify Bg cadherin like-1, Bg matrilin, Bg dermatopontin-2 and -3. On the other hand, consistent point mutations between EAF-S and CB-R snails on

primer sequences for Bg α -integrin like-2 and Bg cadherin like-3 (see Table 2 for accession numbers in Genbank). In order to verify if these mutations have had an effect on the analysis of transcript levels, new primers were designed and Q-PCR was performed again. Differences in transcript levels could not be observed anymore for these last two genes (data not shown) and these genes were therefore removed from the analysis.

In addition, 5' and 3'-RACE PCR were performed to attempt characterise the complete ORFs of the genes encoding Bg cadherin like-1, Bg matrilin, Bg dermatopontin-2 and -3 from the two strains: complete characterisation was achieved for the three last genes. Only partial characterisation was obtained for the Bg cadherin like-1. The corresponding sequences were deposited in Genbank and the corresponding accession numbers are given in Table 2. Regarding the cDNA sequences of Bg cadherin like-1, Bg matrilin, Bg dermatopontin-2 and -3, several differences were observed between the cDNAs obtained from the two strains. While these differences do not change the amino-acid structure of the Bg dermatopontins corresponding precursors (data not shown), several differences in the amino-acid sequence of the precursors were observed between strains for Bg cadherin like-1 and Bg matrilin (Fig. 2A and B, respectively).

cDNAs corresponding to Bg dermatopontin-2 and -3 encode precursors displaying high degrees of similarity (86% identical amino acids, Fig. 3A). They encode two isoforms of 168 and 166 amino acids, respectively, and are likely to be secreted as predicted using PSORTII prediction software. These two isoforms seem to be expressed in whole individuals of both CB-R or EAF-S tested (Fig. 3B). Comparison of these sequences to protein databases showed that they were very

A	BgCad-1CB	VIEPNTGRIYLRRLTESTNNAYTLVVRATDSGNPQKSNDDVIVTIQRAERPVFVNISLA
	BgCad-1EAF	VIEPNTGRIYLRRLTESTNNAYTLVVRATDSGNPQKSNDDVIVTIKRAERPVFIIINQE
		* * *
	BgCad-1CB	TISIPETQAIGSSIIYNF
	BgCad-1EAF	TISIPETQAIGSSIIYNF
B	BgMatCB	MKYLAASVLLQVGLTLAF SLPNIARLSRREVVEDKGDHILICRQEPLELGIVLDSSSSLR
	BgMatEAF	MKYLAASVLLQVGLTLAF SLPNIARLSRREVVEDKGDHILICRQEPLELGIVLDSSSSLR
	BgMatCB	NRDFKTAIKFLQEFLSQYEISSDPNGVRVSIISYKGKIYPEIGFNLTTYDTKDEVIEAIG
	BgMatEAF	NRDFKTAIKFLQEFLSQYEISSDPNGVRVSIISYKGKIYPEIGFNLTTYDTKDEVIEAIG
	BgMatCB	RIPHKAGLRITDTGRAIQMHEAQLANGVVRPGVTKVSIVITDGNSEQWKLTKAEAEARK
	BgMatEAF	RIPHKAGLRITDTGRAIQMHEAQLANGVVRPGVTKVSIVITDGNSEQWKLTKAEAEARK
		*
	BgMatCB	DNIVMFAIGVGTDIRNSELNLAGDQSRVTKVDNYNQLSSIKESLAHQTCFVQEKTTTTT
	BgMatEAF	DNIVMFAIGVGTDIRNSELNLAGDQSRVTKVDNYNQLSSIKESLAHQTCFVQEKTTTTT
	BgMatCB	VPMDEPCGVSDPADIFFVFS PANLGS DGT LWATSF IGLTV DTD LNQGFRYGVLSGSCPD
	BgMatEAF	EPMDPCGVSDPADIFFVFS PANLGS DGT LWATSF IGLTV DTD LNQGFRYGVLSGSCPD
		*
	BgMatCB	DAGFNLDAYSTVEGIKNRLESYERNKVQELVKTLADDGFTTARGARANSRKIAVIAAGK
	BgMatEAF	DAGFNLDAYSTVEGIKNRLESYERNKVQELVKTLADDGFTTARGARANSRKIAVIAAGK
	BgMatCB	KTSELQDEVAALVAQNIQVFVADPADKGLTLEGATILSGRSSKLQAEAFVSALCPKRS
	BgMatEAF	KTSELQDEVAALVAQNIQVFVADPADKGLTLEGATILSGRSSKLQAEAFVSALCPKRS

Fig. 2. Deduced amino acids sequences and alignment of (A) Bg cadherin-like1 (partial coding sequence (CDS)) and of (B) Bg matrilin (complete CDS) obtained from the CB-R and EAF-S strains. Positions where amino acids are different between strains are marked with an asterisk. Signal sequences are in bold. The two von Willebrand domains are highlighted in grey and the metal ion-dependent adhesion site motif is underlined.



Fig. 3. (A) Alignment of invertebrate and vertebrate dermatopontin sequences and (B) transcript detection of *Bg* dermatopontin-2 and -3 in EAF-S and CB-R snails. Bgderm-1, -2 and -3: *Bg* dermatopontin-1, -2 and -3 from *Biomphalaria glabrata*; Limulusderm: dermatopontin from *Limulus polyphemus*; Suberitesderm: dermatopontin from *Suberites domuncula*; Bosderm: dermatopontin from *Bos taurus*. (A) The N-terminal signal sequences of the precursors are in bold and underlined. Cysteines are in bold. The three internal sequence repeats which are conserved in all dermatopontins are underlined. The three additional internal sequence repeats which are shared between *Bg* dermatopontin-2 and -3 and *Limulus* dermatopontin are boxed. (B) The transcription of the two dermatopontins characterised in this study (Bgderm-2 and -3) is analysed on two individuals of each strain by reverse transcriptase (RT)-PCR using specific primers discriminating these two isoforms (+). For each mRNA to be analysed, the absence of contaminating DNA was verified by running a no-RT control using the same specific primers (-).

similar to an *N*-glycosylated protein characterised from the organic shell matrix of *B. glabrata* (*E*-value 7×10^{-39} and 3×10^{-41} , respectively, accession number P83553 (Marxen et al., 2003)), named *B. glabrata* dermatopontin (annotated *Bg* dermatopontin-1 in Fig. 3A). In addition, these two isoforms display similarities with dermatopontins from the invertebrates *Limulus polyphemus* (accession number A44312, *E*-value 3×10^{-32} and 4×10^{-32} for isoforms 2 and 3, respectively (Fujii et al., 1992)) and *Suberites domuncula* (accession number CAC38786, *E*-value 3×10^{-30} and 6×10^{-30} , respectively (Schutze et al., 2001)). Furthermore, *Bg* dermatopontins display the cysteine array which is conserved in the other dermatopontins from vertebrates and invertebrates (see Fig. 3A). In contrast to the snail and sponge dermatopontins, both of which contain eight cysteines, the vertebrate (bovine, Neame et al., 1989) and *Limulus* dermatopontins (Fujii et al., 1992) contain an additional pair of cysteines (Fig. 3A). *Bg* dermatopontins share the three internal sequence repeats which are conserved in all dermatopontins: D-R-X-W/F-X-F/Y/I/M-X₁₋₂-C. In addition, another internal repeat unit was

detected in *Bg* dermatopontins-2 and -3 and in *Limulus* dermatopontin, V-N-D/S-F/W-D. This last consensus sequence was also repeated three times in these three precursors (Fig. 3A). As predicted by the Kyte and Doolittle method (Kyte and Doolittle, 1982) using the ProtScale software, these two internal repeating units are found in the sequence at positions of highest hydrophilicity (data not shown), which are likely exposed to the surface of the molecule.

cDNA corresponding to *Bg* matrilin encodes a precursor of 418 amino acids. The analysis of the primary structure by PSORTII prediction software reveals that it has a secretory protein-like structure with a 19-amino-acid signal sequence. Comparison of this sequence to protein databases showed that it is very similar to a cartilage matrix protein precursor, the Matrilin-1, from *Mus musculus* (*E*-value 1×10^{-20} , accession number Q80VN5). This last protein belongs to a family of fibril-forming vertebrate ECM proteins with four paralogues in the human genome (Deak et al., 1999). With the exception of matrilin 3, which has a single von Willebrand (VWA) domain, matrilins contain two VWA domains that flank a variable

number of EGF domains. These VWA domains are involved in protein–protein interactions contributing to the formation of the collagen-independent filamentous network (Chen et al., 1999). The matrilin from *B. glabrata* (Bg matrilin) also contains two VWA domains but no EGF domain was detected (Fig. 2). In addition, we detected a Metal ion-dependent adhesion site (MIDAS motif) within the first VWA domain of our protein (Fig. 2). The MIDAS motif may consist of five amino acids (DXSXS,T, and D) that contribute to adhesive properties of many VWA domains (Michishita et al., 1993; Goodman and Bajt, 1996; Puzon-McLaughlin and Takada, 1996).

3.3. Transcription of the candidate genes in susceptible and resistant snails after immune-challenge

In order to further investigate the potential involvement of the candidate genes (Bg cadherin like-1, Bg matrilin, Bg dermatopontin-2 and -3) in the differential susceptibility of strains, we compared their expression at various times after exposure to *E. caproni*. The kinetic rates of transcription of the four genes of interest were analysed, using Q-PCR, on total RNA extracted from pools of 10 snails at 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 96 h p.i.

Transcription of these four genes increased regularly following infection in resistant snails (Fig. 4). Maximum increases were observed 48 h post-exposure: transcript corresponding to Bg cadherin like-1, Bg matrilin, Bg dermatopontin-2 and -3 are 3.2, 3.4, 24 and 4 times more abundant, respectively, compared with controls. All increases are significant ($P < 0.05$). In susceptible snails, Bg cadherin like-1, Bg dermatopontin-2 and -3 kinetics appeared irregular: increases and decreases are alternatively observed. In addition, note that a significant difference ($P < 0.05$) in transcript level of Bg dermatopontin-2 between resistant and susceptible snails is observed 48 h p.i. (expression ratio of 0.050 vs 0.013, respectively).

3.4. Genes potentially involved in coagulation or ECM in non-exposed snails (whole body) of the two strains

The higher level of Bg matrilin transcripts in hemocytes of the susceptible individuals (13.65 times more than in the hemocytes of resistant individuals, Fig. 1), suggests that the susceptible snails may possess a more potent hemolymph coagulation-like system. Such a system may block hemocyte migration towards the parasite in the first hours following infection (see discussion). In order to investigate this hypothesis, we measured the transcript levels of the genes corresponding to proteins potentially involved in coagulation processes or ECM. Because expression of such genes may not be restricted to hemocytes, we analysed total RNA extracted from whole snails. We focussed our attention on genes corresponding to proteins containing Von Willebrand domains (gene numbers 16–25 and 33–35, Appendix), coagulation factor domains (gene numbers 14 and 15, Appendix), trypsin-like serine domains (gene numbers 28, Appendix), spondin and thrombospondin domains (gene numbers 29 and 30, 34, 35, respectively, Appendix), fibronectin domains (gene number 31, Appendix), fibrinogen-related domains (gene numbers 36–38, Appendix) and laminin domains (gene numbers 39 and 40, Appendix). Among the 23 transcripts analysed, four were not detected (genes numbers 19, 28, 32 and 33, Appendix) and 10 showed differences in transcript levels that were greater than three-fold (Fig. 5). Among these latter genes, nine showed higher transcript level in susceptible snails with significant differences ($P < 0.05$) varying between 3.83- and 23.57-fold (Fig. 5). Only one, the Bg-spondin domain containing protein, displayed a transcript content that was higher (4.33 more) in resistant snails (Fig. 5).

In order to validate the differences in transcript content between RNA from susceptible and resistant snails, we verified if PCR primers were not edited on sites containing mutations between the two strains. cDNA sequences from six EAF-S snails and six CB-R snails were obtained by PCR using primers

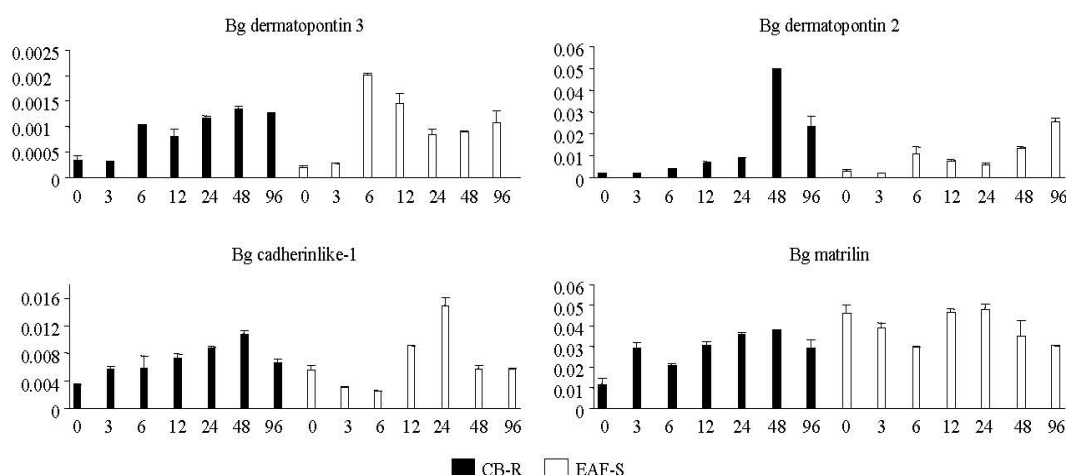


Fig. 4. Ratios of transcript levels corresponding to *Bg* dermatopontin-2 and -3, *Bg* cadherin like-1 and *Bg* matrilin in the resistant CB-R and susceptible EAF-S infected snails at different times post-exposure. Ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relative to S19 expression levels. Each histogram is the average value of triplicates $\pm$ SD.

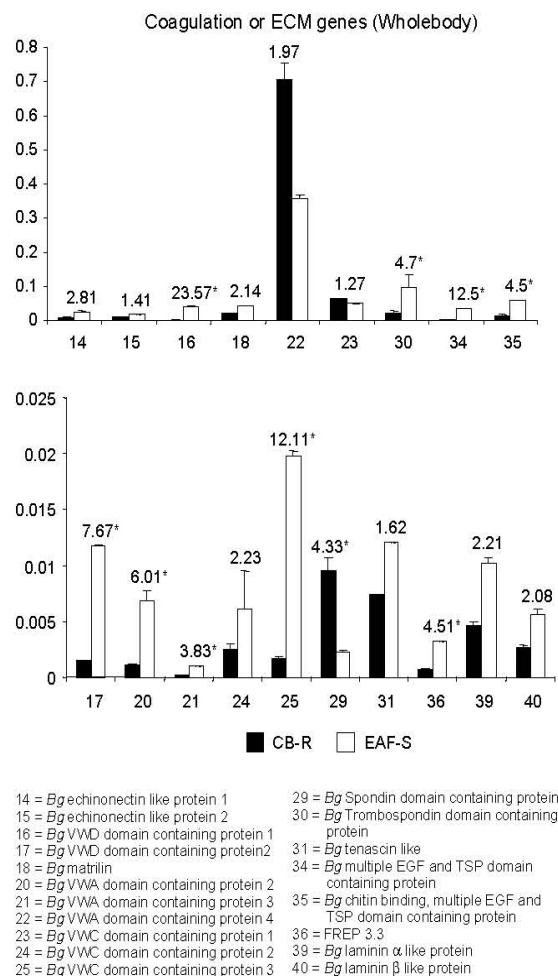


Fig. 5. Ratios of transcript levels corresponding to genes potentially involved in extracellular matrix (ECM) structure or coagulation processes in whole body resistant CB-R and susceptible EAF-S snails. Ratios were determined using quantitative PCR and are expressed relative to S19 levels. Each histogram is the average value of triplicates $\pm$ SD. Differential levels of the transcripts between strains is indicated above the histograms. *Genes showing differences in transcript levels that were significant ($P < 0.05$) and greater than three-fold.

flanking the PCR primers used for quantitative PCR and sequenced (accession numbers, Table 3). Comparisons of sequences revealed no mutations in sequences used for Q-PCR.

Table 3

GenBank accession numbers of cDNAs corresponding genes characterised from whole body of CB and EAF snails

Gene	CB/EAF strains
Bg VWD domain containing protein1	DQ113398
Bg VWD domain containing protein2	DQ113400
Bg VWA domain containing protein2	DQ113401
Bg VWA domain containing protein3	DQ113402
Bg VWC domain containing protein3	DQ113403
Bg-spondin domain containing protein	DQ113404
Bg-thrombospondin domain containing protein	DQ113405
Bg multiple EGF and TSP domain containing protein	DQ113406
Bg chitin binding, multiple EGF and TSP domain containing protein	DQ113407
FREP 3.3	DQ113408

4. Discussion

In order to investigate the molecular basis of compatibility in the *E. caproni*/*B. glabrata* model, we developed a comparative molecular approach to examine gene expression in the two strains of mollusc. As we observed previously there were some constitutive differences in adhesion capabilities of the hemocytes from the two snail strains (Humbert and Coustau, 2001), we compared the transcript content of a series of genes potentially involved in adhesion processes between hemocytes from susceptible and resistant snails. Transcripts of four genes were differentially present between hemocytes from resistant and susceptible snails. These genes encode proteins resembling dermatopontins (two), matrilin and cadherin.

The characterisation of the complete coding sequence (CDS) of dermatopontins (Bg dermatopontin-2 and -3) revealed that the precursors contain signal peptides suggesting that they could be constitutively secreted or stored and released from hemocytic granules. The structural features of the precursors suggest that these two new dermatopontins (Bg dermatopontin-2 and -3) share, in addition to dermatopontin general characteristics, some other particular features already observed in two other invertebrate dermatopontins from *S. domuncula* (cysteine array (Schutze et al., 2001)) and *L. polyphemus* (additional internal repeat (Fujii et al., 1992)). The function of these particular structural features has not been elucidated. Nevertheless, it was shown that these two dermatopontins triggered adhesive processes of dissociated cells from *S. domuncula* (Schutze et al., 2001) or hemocytes from *L. polyphemus* (Fujii et al., 1992). In addition, horseshoe crab dermatopontin is produced by hemocytes (as Bg dermatopontin-2 and -3) and stored in large secretory granules (Fujii et al., 1992). These features taken together suggest that *B. glabrata* hemocytic dermatopontins could participate in aggregation processes of hemocytes. Furthermore, we showed that the transcript content of these two genes was: (i) higher in hemocytes from unexposed resistant snails (in comparison with those of susceptible snails, Fig. 1); and (ii) greatly enhanced in resistant snails 48 h after exposure to the parasite (Fig. 4). Interestingly, previous histological studies showed that, in *E. caproni*-exposed resistant snails, the hemocytic capsule was mounted at 48 h post exposure (Ataev and Coustau, 1999). The fact that the higher level of expression of Bg dermatopontin-2 observed in resistant snails at 48 h after exposure (expression ratio of 0.050 vs 0.013 for susceptible) coincides with the capsule formation, further supporting the hypothesis that this gene may participate in adhesive processes taking place during capsule formation. Future studies will address this question by analysing gene expression using in situ hybridisation and determining whether or not Bg dermatopontin is over-expressed in capsule-forming hemocytes.

The characterisation of Bg matrilin showed that the precursor contains a signal peptide suggesting that it could also be constitutively secreted or stored in hemocytic granules. Analysis of the precursor suggests that this protein is a novel VWA domain containing protein. VWA domains are involved in cell adhesion, ECM structure and more generally in

multiprotein complex formation (Whittaker and Hynes, 2002). Bg matrilin shows similarities with matrilins from vertebrates which also contain two VWA domains and are involved in connecting cartilage components to form an integrated matrix network by forming a collagen-independent filamentous network (Chen et al., 1999). The function of Bg matrilin has yet to be elucidated. Nevertheless, our results allow us to hypothesise that this protein could be produced and secreted by hemocytes to participate in an induced filamentous network in the hemolymph of *B. glabrata* exposed to *E. caproni*. Such a network has already been described by Matricon-Gondran and Letocart (1999). The latter showed that infection by *E. caproni* induced the rapid appearance of tubular double-helical filaments in the hemolymph of *B. glabrata*. They showed that these filaments form bundles of a few parallel units associated with fine fibrils. They showed that hemocytes: (i) adhere to these bundles by means of the filopodia tip or by small areas of the cell surface; and (ii) become temporally sedentary after interaction. As we showed that the transcription of the gene corresponding to Bg matrilin is higher in naive susceptible snails (in comparison with resistant, Figs. 1 and 4), these susceptible snails could possess a more potent hemolymph coagulation system which could prevent hemocyte migration towards the parasite larvae and therefore facilitate parasite settlement in susceptible snails. This hypothesis is strengthened by our expression results from entire snails showing that a series of genes involved in coagulation processes or ECM structure have higher transcript levels in susceptible snails (Fig. 5). Future studies will focus on expression localisation of these different genes by *in situ* hybridisation and immunohistochemistry. This approach will be aimed at characterising, *in situ*, the potential involvement of these proteins in coagulation processes.

In addition to the expression studies, we observed a variability in the sequences obtained from hemocytes between the two strains. Among the six genes studied, numerous mutations were observed between sequences obtained from hemocytes of CB-R and EAF-S (data not shown, see Table 2 for accession numbers). Interestingly, such point mutations were not observed on transcripts recovered from whole snail bodies (10 genes). Recently, intense diversification through point mutations and recombinatorial processes was demonstrated for the fibrinogen-related proteins (FREPs) of *B. glabrata* (Zhang et al., 2004). Although the diversity observed in the present study on hemocyte adhesion genes only relies on point mutations, it raises the question of the existence of a gene wide diversification process taking place preferentially (or exclusively) in hemocytes of *B. glabrata*.

In conclusion, the present study has been successful in identifying adhesion genes that were differentially expressed in hemocytes and whole bodies of *E. caproni*-susceptible and -resistant *B. glabrata*. Complete molecular characterisation of these genes provided informative data on the potential functions of these proteins. According to these predicted functions, hypotheses were developed to explain their involvement in susceptibility/resistance processes and led to the conclusion that a hemolymph coagulation-like system may

play a critical role in the processes of susceptibility/resistance. Future functional studies will now focus on the role of these genes in the host–parasite interaction.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS. We are grateful to Pierre Tisseyre (FR2577 CNRS) for performing DNA sequencing. We are indebted to Yannick Bueno for technical assistance.

Appendix. Supplementary Material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijpara.2005.09.009

References

- Ataev, G.L., Coustau, C., 1999. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 187–198.
- Chen, Q., Zhang, Y., Johnson, D.M., Goetinck, P.F., 1999. Assembly of a novel cartilage matrix protein filamentous network: molecular basis of differential requirement of von Willebrand factor A domains. *Mol. Biol. Cell* 10, 2149–2162.
- Deak, F., Wagener, R., Kiss, I., Paulsson, M., 1999. The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 18, 55–64.
- Fujii, N., Minetti, C.A., Nakhasi, H.L., Chen, S.W., Barbehenn, E., Nunes, P.H., Nguyen, N.Y., 1992. Isolation, cDNA cloning, and characterization of an 18-kDa hemagglutinin and amebocyte aggregation factor from *Limulus polyphemus*. *J. Biol. Chem.* 267, 22452–22459.
- Goodman, T.G., Bajt, M.L., 1996. Identifying the putative metal ion-dependent adhesion site in the beta2 (CD18) subunit required for alphaLbeta2 and alphaMbeta2 ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 271, 23729–23736.
- 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.
- Humbert, E., Coustau, C., 2001. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata*–*Echinostoma caproni* system. *Parasitology* 122, 651–660.
- Jeyarasingam, U., Heyneman, D., Lim, H.K., Mansour, N., 1972. Life cycle of a new echinostome from Egypt, *E. liei* sp. nov. (Trematoda: Echinostomidae). *Parasitology* 65, 203–222.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- Langand, J., Morand, S., 1998. Heritable non-susceptibility in an allopatric host–parasite system: *Biomphalaria glabrata* (Mollusca)–*Echinostoma caproni* (platyhelminth Digenea). *J. Parasitol.* 84, 739–742.
- Langand, J., Jourdan, J., Coustau, C., Delay, B., Morand, S., 1998. Cost of resistance, expressed as a delayed maturity, detected in the host–parasite system *Biomphalaria glabrata*–*Echinostoma caproni*. *Heredity* 80, 320–325.
- Lockyer, A.E., Noble, L.R., Rollinson, D., Jones, C.S., 2004. *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Exp. Parasitol.* 107, 97–104.
- Marxen, J.C., Nimtz, M., Becker, W., Mann, K., 2003. The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. *Biochim. Biophys. Acta* 1650, 92–98.

- Matricon-Gondran, M., Letocart, M., 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. *J. Invertebr. Pathol.* 74, 248–254.
- Michishita, M., Videm, V., Amaout, M.A., 1993. A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* 72, 857–867.
- Miller, A.N., Raghavan, N., FitzGerald, P.C., Lewis, F.A., Knight, M., 2001. Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *Int. J. Parasitol.* 31, 687–696.
- Neame, P.J., Choi, H.U., Rosenberg, L.C., 1989. The isolation and primary structure of a 22-kDa extracellular matrix protein from bovine skin. *J. Biol. Chem.* 264, 5474–5479.
- Nowak, T.S., Woodards, A.C., Jung, Y., Adema, C.M., Loker, E.S., 2004. Identification of transcripts generated during the response of resistant *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection using suppression subtractive hybridization. *J. Parasitol.* 90, 1034–1040.
- Puzon-McLaughlin, W., Takada, Y., 1996. Critical residues for ligand binding in an I domain-like structure of the integrin beta1 subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 20438–20443.
- Raghavan, N., Miller, A.N., Gardner, M., FitzGerald, P.C., Kerlavage, A.R., Johnston, D.A., Lewis, F.A., Knight, M., 2003. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 181–191.
- Schutze, J., Skorokhod, A., Muller, I.M., Muller, W.E., 2001. Molecular evolution of the metazoan extracellular matrix: cloning and expression of structural proteins from the demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *J. Mol. Evol.* 53, 402–415.
- Sminia, T., Barendsen, L., 1980. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails, *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncatus*. *J. Morphol.* 165, 31–39.
- Trouvé, S., Renaud, F., Durand, P., Jourdan, J., 1996. Selfing and outcrossing in a parasitic hermaphrodite helminth (*Trematoda Echinostomatidae*). *Heredity* 77, 1–8.
- Vergote, D., Bouchut, A., Sautiere, P.E., Roger, E., Galinier, R., Rognon, A., Coustau, C., Salzet, M., Mita, G., 2005. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Int. J. Parasitol.* 35, 215–224.
- 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, 3369–3387.
- Zhang, S.M., Adema, C.M., Kepler, T.B., Loker, E.S., 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* 305, 251–254.

Supplementary Table S1 : *Biomphalaria glabrata* adhesion-related genes identified from Genbank

Gene number (D or ND ^a)	Accession # in GenBank	Name	Annotated BLASTX similarity (accession #, organism)	E-value ^b	RPS-BLAST or ScanProsite detected domains	E-value ^c
1 (D)	CK989451	Bg β -integrin related protein	β -integrin related protein (AE014302,)	5e-3	ND	
2 (D)	AF060203	Bg β -integrin (Davids et al., 1999)			Integrin beta subunit gnl CDD 3841	8e-149
3 (D)	CK988897	Bg α -integrin like-1	Integrin (Q9BPQ8, <i>Halocynthia roretzi</i>)	8e-03	Vitronectin receptor, alpha subunit, gnl CDD 21418	2e-07
4 (D)	CK988729 CK988945 CK989314	Bg α -integrin like-2	Integrin alpha-5 precursor (U12683, <i>Xenopus laevis</i>)	5e-04	ND	
5 (D)	CV022374 CV022372	Bg cadherin like-1	fat protein (M80537, <i>D. melanogaster</i>)	1e-06	Cadherin repeat domain, gnl CDD 14772	2e-09
6 (D)	CV173987	Bg cadherin like-2	fat protein (M80537, <i>D. melanogaster</i>)	2e-49	Cadherin repeat domain, gnl CDD 14772	2e-33
7 (D)	CK656861	Bg cadherin like-3	Cadherin Cad99C precursor (Q9VAF5, <i>D. melanogaster</i>)	1e-10	Cadherin repeat domain, gnl CDD 14772	1e-06
8 (D)	CK656889	Bg cadherin like-4	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 precursor (Q9HCU4, <i>H. sapiens</i>)	2e-09	Cadherin repeat domain, gnl CDD 14772	2e-06
9 (ND)	CK656719	Bg cadherin like-5	Neural-cadherin precursor (O15943, <i>D. melanogaster</i>)		Cadherin repeat domain, gnl CDD 14772	3e-08
10 (D)	AF058702	Bg Selectin 1 (Duclermortier et al., 1999)			C-type lectin (CTL) domain, gnl CDD 16518	3e-11
11 (ND)	CV548417, -760	Bg IGcam like protein	UNC-89 (U33058, <i>C. elegans</i>)	1e-41	Immunoglobulin domain cell adhesion molecule, gnl CDD 24182	3e-15
12 (D)	CO635909, -54026, CN655035	Bg CD36 like protein	CD36 antigen (I49590, <i>M. musculus</i>)	1e-04	CD36 family, gnl CDD 23154	3e-04
13 (D)	CV548755, -377, -736, -737	Bg Titin/projectin	2MDa-2 protein (Q8ISF6, <i>C. elegans</i>)	e-121	Serine/Threonine protein kinase domain, gnl CDD 17776 Fibronectin type 3 domain, gnl CDD 14799 Immunoglobulin like domain, gnl CDD 5322	6e-68 1e-09 2e-10
14 (D)	CK149330	Bg echinonectin like protein 1	Echinonectin (O76470, <i>L. variegates</i>)	2e-10	Coagulation factor 5/8 C-terminal domain, gnl CDD 14793	2e-14
15 (D)	CK149355	Bg echinonectin like protein 2	Echinonectin (O76470, <i>L. variegates</i>)	3e-09	Coagulation factor 5/8 C-terminal domain, gnl CDD 14793	4e-07
16 (D)	CN655005, CN779676, -716, -707, CV042526	Bg VWD domain containing protein1	Mucin (O97867, <i>Sus scrofa</i>)	4e-07	von Willebrand factor type D domain, gnl CDD 24219	2e-11
17 (D)	CV548583, -258, -542, -237, -539, -	Bg VWD domain containing protein2	hemolectin (Q9U5D0, <i>D. melanogaster</i>)	1e-56	von Willebrand factor type D domain, gnl CDD 24219 EGF-like domain signature 2,	2e-08

	566, CO870398				<u>PS01186</u>	D
18 (D)	CK988697 -725, CK989450 -985, -143, CK656770, CN476089 AF486289	Bg matrilin	collagen (Q8W XV8, <i>H. sapiens</i>)	9e-18	Von Willebrand factor type A (vWA), <u>gnl CDD 27936</u> vWA integrins alpha subunit, <u>gnl CDD 27955</u> VWA integrin (invertebrates), <u>gnl CDD 27962</u> vWA collagen alphaI-XII-like, Collagen, <u>gnl CDD 27968</u>	2e-24 1e-18 3e-15 9e-21
19 (D)	CK988847, -906, CK989235, -246, -838, 513, -847, 829, -577, 625, CK990068, -083	Bg VWA domain containing protein1	Cartilage matrix protein precursor (P51942, <i>M. musculus</i>)	1e-05	von Willebrand factor (vWF) type A domain, <u>gnl CDD 24254</u>	1e-12
20 (D)	CK988803, CK989503, -678, -931	Bg VWA domain containing protein2	Thrombospondin- related adhesive protein homolog (Q9U8J9, <i>N. caninum</i>)	2e-07	Von Willebrand factor type A (vWA), <u>gnl CDD 27936</u> vWA integrins alpha subunit, <u>gnl CDD 27955</u> VWA integrin (invertebrates), <u>gnl CDD 27962</u>	2e-14 4e-11 1e-08
21 (D)	CK989946, -671, -217, -773, -438, CK988907	Bg VWA domain containing protein3	Collagen (Q8NFW1, <i>H. sapiens</i>)	0.29	Von Willebrand factor type A (vWA), <u>gnl CDD 27936</u> VWA integrin (invertebrates), <u>gnl CDD 27962</u>	1e-07 5e-04
22 (D)	CV022382	Bg VWA domain containing protein4	DEC-1 (Q75R52, <i>L. stagnalis</i>)	9e-16	vWA collagen alphaI-XII-like, Collagen, <u>gnl CDD 27968</u> Von Willebrand factor type A (vWA), <u>gnl CDD 27936</u> vWA integrins alpha subunit, <u>gnl CDD 27955</u> VWA integrin (invertebrates), <u>gnl CDD 27962</u>	3e-16 4e-14 8e-11 1e-07
23 (D)	CK989591, CK988662	Bg VWC domain containing protein1	Chordin-like protein 1 precursor (Q90ZD5, <i>G. gallus</i>)	6e-06	von Willebrand factor type C domain, <u>gnl CDD 8945</u>	4e-04
24 (D)	CN549150	Bg VWC domain containing protein2	Fibrillar pro-collagen (1818327A, <i>S. purpuratus</i>)	3e-05	von Willebrand factor type C domain, <u>PS01208</u>	D
25 (ND)	CK149358, -489	Bg VWC domain containing protein3	CYR61 protein precursor (P18406, <i>M. musculus</i>)	3e-05	von Willebrand factor type C domain, <u>PS50184</u>	D
26 (D)	CK988741, -817, CK989009, -525	Bg dermatopontin 2	Dermatopontin (P83553, <i>B. glabrata</i>) Amebocyte aggregation factor (Q01528, <i>L. polyphemus</i>)	2e-41 2e-35	ND	
27 (D)	CK989092, -409, -721, 676, -715 CK990133	Bg dermatopontin 3	Dermatopontin (P83553, <i>B. glabrata</i>) Amebocyte aggregation factor (Q01528, <i>L. polyphemus</i>)		ND	

28 (D)	CK989867, CO870226, -13	Bg Coagulation factor like protein	Coagulation factor XI (Q9DAT3, <i>M. musculus</i>)	1e-38	Trypsin-like serine protease	7e-60
29 (D)	CK989024 CK989796 CK988997	Bg Spondin domain containing protein	F-spondin precursor (Q9W770, <i>G. gallus</i>)	5e-35	Spondin_N, gnl CDD 26581	4e-46
30 (D)	CV548567, -042547, CN779718, -445838, CK149156, -085011, CD760632	Bg Thrombospondin domain containing protein	SCO-spondin (Q9XSV8, <i>B. Taurus</i>)	7e-12	Thrombospondin type I repeat, D PS50092	
31 (D)	CV548755, -377,-736,- 737	Bg tenascin like	Tenascin XB (AL772248, <i>H. Sapiens</i>)	0.18	Fibronectin type 3 domain, gnl CDD 14799	0.006
32 (D)	CV548575	Bg multiple EGF domain containing protein1	Multiple EGF-like- domain protein 3 precursor (O88281, <i>R. norvegicus</i>)	3e-25	ND	
33 (ND)	CV548560	Bg multiple EGF domain containing protein2	Multiple EGF-like- domain protein 3 precursor (O75095, <i>H. sapiens</i>)	2e-30	VWA_Matrilin domain, gnl CDD 27961 2 EGF_3 EGF-like domains, PS50026	0.004 D
34 (D)	CV548577, -50, CO870431, -389, CN445784	Bg multiple EGF and TSP domain containing protein	fibulin-1D precursor (AF070477, <i>C. elegans</i>)	3e-27	VWA_Matrilin domain, gnl CDD 27961 2 EGF_3 EGF-like domains, PS50026 Thrombospondin type I repeat, PS50092	0.004 D D
35 (D)	CN445780, -65, -71, CO635925	Bg chitin binding, multiple EGF and TSP domain containing protein	Fibrillin 2 precursor, (Q61555, <i>M. musculus</i>)	1e-27	2 VWA_Matrilin domains, gnl CDD 27961 Chitin-binding domain type 2, PS50940 3 EGF_3 EGF-like domains, PS50026 Thrombospondin type I repeat, PS50092	4e-05 D D D
36 (D)	AF515461	FREP 3.3 (Zhang et al., 2003)			Fibrinogen-related domain, gnl CDD 16526	5e-77
37 (D)	AY028463	MFREP7var1 (Zhang et al., 2001)			ND	
38 (ND)	CK988666	Bg FREP 13-like	ND		ND	
39 (D)		Bg laminin α like protein	Laminin 5 (AX463740, <i>M. musculus</i>)	3e-11	2 Laminin-type epidermal growth factor-like domains, gnl CDD 8912	2e-05 and 2e- 04
40 (D)	CK800813	Bg laminin β like protein	Laminin beta 1 (Q8JHV7, <i>D. rerio</i>)	8e-12	EGF-like domain, PS00022	D
41 (D)	CK988689, -792	Bg profilin like protein	Profilin protein 2 (U40941, <i>C. elegans</i>)	1e-08	Profilin, gnl CDD 24270	1e-13
42 (D)	CK990067	Bg cofilin like protein	Cofilin/actin depolymerizing factor (P45594, <i>D. melanogaster</i>)	8e-12	Actin depolymerisation factor/cofilin -like domain, gnl CDD 8907	5e-17
43 (D)	CK989078, -430, -828	Bg talin like protein	talin 2 (Q9Y4G6, <i>H. sapiens</i>)	8e-50	Talin, gnl CDD 22037	1e-48
44 (D)	AF179902	Bg integrin interactor protein (Knight et al., 2000)			Ribosome anti-association factor IF6, gnl CDD 16568	4e-42

45 (D)	CV548159	Bg β -catenin like protein	β -catenin (Q8WRT5, <i>C. variopedatus</i>)	8e-35	Armadillo/beta-catenin-like repeats, gnl CDD 14914	0.001
46 (D)	AF486291	Bg focal adhesion kinase	focal adhesion kinase (AY144487, <i>L. variegates</i>)	1e-60	Tyrosine kinase, catalytic domain, gnl CDD 5392	5e-54

ND = Not detected

D = Detected

^a = Transcript of the corresponding gene detected or not detected

^b = The E-value is the probability due to chance, that there is another alignment with a similarity greater than the given one, obtained with BLASTX.

^c = The E-value is the probability due to chance, that there is another alignment with a similarity greater than the given one, obtained with RPS-BLAST.

Chapitre 3

Chapitre 3

Recherche de candidats impliqués dans la compatibilité parmi les protéines produites par les hémocytes par une approche comparative globale

Publication n°3

Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. (2006), *Acta Tropica*, 98: 234-246.

Afin de poursuivre et d'approfondir la recherche des différences constitutives mises en évidence entre les hémocytes issus des mollusques susceptibles et résistants, et dans le but d'identifier des candidats qui pourraient être impliqués dans la compatibilité, nous avons choisi de mettre au point la technique d'électrophorèse bidimensionnelle sur les échantillons protéiques extraits à partir des hémocytes. Nous avons ainsi pu comparer les profils électrophorétiques des souches susceptible (EAF-S) et résistante (CB-R) afin de révéler ces différences. Cette étude est complémentaire de la précédente, décrite dans le Chapitre 2, qui s'intéressait exclusivement aux transcrits correspondant aux gènes d'adhérence connus, car elle est globale et prend en compte l'ensemble du protéome hémocytaire.

Cette approche comparative en électrophorèse bidimensionnelle nous a permis de révéler douze protéines différenciellement représentées dans les hémocytes des mollusques susceptibles et résistants. Parmi ces protéines, les gènes correspondant à cinq d'entre elles ont pu être caractérisés par une combinaison de techniques de spectrométrie de masse. Il s'agit d'une aldolase, d'une protéine de filament intermédiaire, d'une cytidine déaminase, de la protéine ribosomique P1 et de l'histone H4. L'étude de l'expression de ces gènes en PCR-Quantitative a été réalisée chez les hémocytes issus des individus susceptibles et résistants ainsi que sur individus entiers suite à une infestation par *E. caproni*. Cette étude a mis en évidence que les représentativités des transcrits correspondant à la protéine de filament intermédiaire et à l'histone H4 étaient significativement modulées.

Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach[☆]

A. Bouchut^a, P.E. Sautiere^b, C. Coustau^a, G. Mitta^{a,*}

^a Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5555, CNRS Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, 66 860 Perpignan Cedex, France

^b Neuro-immunologie des Annélides, UMR 8017, CNRS Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

Received 20 December 2005; received in revised form 7 March 2006; accepted 18 May 2006
Available online 21 June 2006

Abstract

As an approach to investigate the suspected involvement of cellular factors in *Biomphalaria glabrata* resistance/susceptibility to *Echinostoma caproni*, we compared protein patterns from hemocytes collected from susceptible and resistant snails. This proteomic approach revealed that twelve hemocytic proteins exhibited significant differences in their apparent abundance. The genes corresponding to five of them were characterized by a combination of mass spectrometry and molecular cloning. They encode an aldolase, an intermediate filament protein, a cytidine deaminase, the ribosomal protein P1 and the histone H4. Furthermore, we investigated their expression in parasite-exposed or -unexposed snails. These last experiments revealed changes in transcript levels corresponding to intermediate filament and histone H4 proteins post-infection.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*; *Echinostoma caproni*; Host–parasite interactions; Proteomic; Compatibility; Hemocytes

1. Introduction

Snail–trematode immunobiological interactions have been studied in the fresh-water snail *Biomphalaria glabrata* following infection by the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and by the echinostome species, *Echinostoma paraensei* and *Echinostoma caproni*. In

these different models, compatibility polymorphism was highlighted (Richards, 1975; Richards and Shade, 1987; Lewis et al., 1993; Langand and Morand, 1998). In order to elucidate the mechanisms underlying differences in compatibility, numerous molecular studies comparing susceptible and resistant strains of molluscs were undertaken. These studies revealed that many genes were differentially expressed between strains of *B. glabrata* susceptible or resistant to *S. mansoni* or *E. caproni* (Miller et al., 2001; Raghavan et al., 2003; Lockyer et al., 2004; Nowak et al., 2004; Vergote et al., 2005).

In our *B. glabrata*/*E. caproni* model, two snail strains of *B. glabrata* were selected (Langand et al., 1998). *E. caproni* miracidia are able to penetrate both susceptible

[☆] Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ database under the accession numbers: DQ117975, DQ117976, DQ117977, DQ117978, DQ117979.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 68 66 21 88; fax: +33 4 68 66 22 81.

E-mail address: mitta@univ-perp.fr (G. Mitta).

and resistant snails. While the parasite undergoes normal development in susceptible snails, in resistant snails it is encapsulated and eliminated. Susceptibility/resistance mechanisms of *B. glabrata* to *E. caproni* are probably inherited in a multigenic fashion (Langand and Morand, 1998) and have been shown to rely on both cellular and humoral factors (Ataev and Coustau, 1999). Regarding humoral factors, five proteins differentially represented in the plasma of susceptible and resistant snails were recently characterized using a proteomic approach from the plasma (Vergote et al., 2005). Regarding the cellular factors, studies showed that excretory-secretory (ES) products from *in vitro* transformed *E. caproni* sporocysts inhibited key defence functions of susceptible host hemocytes such as adhesion and phagocytosis (Humbert and Coustau, 2001). Interestingly, hemocytes from resistant snails remained unaffected by these parasite ES products, suggesting that they exhibit constitutive differences compared with hemocytes from susceptible snails (Humbert and Coustau, 2001). In order to investigate molecular determinants of these differences, we developed comparative molecular approaches to study the levels of gene expression in both strain hemocytes.

The present work aimed at: (i) identifying proteins differentially represented in the hemocytes of susceptible and resistant snails by a comparative two-dimensional electrophoresis approach; (ii) characterizing the genes encoding these proteins; (iii) analysing their expression post-infection.

2. Material and methods

2.1. *B. glabrata* strains and hemocyte recovery

B. glabrata snails used in this study belonged either to the unselected Bg.Bra stock originating from Brazil (Guillou et al., 2004), or to the EAF-S or CB-R strains selected, respectively, for their susceptibility or resistance to *E. caproni* (Langand et al., 1998; Humbert and Coustau, 2001). At the time of the study, the percentages of adult snails susceptible to *E. caproni* were: Bg.Bra = 70%, EAF-S = 98% and CB-R = 1%.

Hemolymph was extracted from the headfoot of 100 uninfected snails from the EAF-S or from the CB-R snails according to standard procedure (Sminia and Barendsen, 1980) and immediately placed on ice. Approximately 10 ml of hemolymph were recovered from each strain and centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4 °C. The plasma was discarded and the hemocytes were washed two times with PBS before storage of the pellet at –80 °C until protein or RNA extractions. The

entire procedure was repeated to prepare six independent hemocyte protein and RNA fraction.

2.2. Experimental infection

The parasite *E. caproni* (Jeyarasasingam et al., 1972) was maintained in Bg.Bra snails and mice (SWISS OF1 stock) as described previously (Trouvé et al., 1996). Snail infections were performed according to previously described procedures (Guillou et al., 2004). Ten individuals from each strain were collected at 3, 6, 12, 24, 48 and 96 h post-exposure and frozen in liquid nitrogen until RNA extraction.

2.3. Two-dimensional gel electrophoresis

2.3.1. Hemocyte protein extracts

Proteins (from one pellet) were extracted using 350 µl of a buffer pH 7.5 containing urea 8 M, Tris 40 mM, DTT 1%, CHAPS 4%. After resuspension, an incubation of 2 h at room temperature was performed. Then the lysate was centrifuged at $15,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was stored at –80 °C until use.

2.3.2. Isoelectrofocusing (IEF)

IEF for the 2-D gel electrophoresis was performed using the IEFCell systemTM (Biorad) as previously described (Vergote et al., 2005). Isoelectrofocusing was raising gradually until 8000 V and running until 180,000 V h at 20 °C.

2.3.3. SDS-PAGE

IPG stripsTM were transferred on a 12% polyacrylamide gel containing 0.8% of cross-linker piperazine diacrylamide. Electrophoresis were performed in Tris/Glycine/SDS buffer according to the conditions defined by O'Farrell (1975). Proteins were separated 1 h at 30 V and then at 250 V until Coomassie blue has reached the bottom of the gel. After electrophoresis, gels were silver stained according to a modified protocol of Morrissey (1981) or a method compatible with mass spectrometry analysis (Shevchenko et al., 1996).

2.3.4. 2-D image analysis

Six gels per condition were analyzed using the ProgenesisTM v1.5 software program (Nonlinear dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Analysis was performed using previously described protocol (Vergote et al., 2005). Statistical significance was assessed using the Mann–Whitney *U*-test. *P* values < 0.05 were considered as significant. All tests were done using STATVIEW v. 4.5 statistic software package.

2.4. Protein identification

2.4.1. In-gel digestion for mass spectrometry

Proteins of interest were excised and gel pieces were washed twice in 150 μ l of 15 mM potassium ferricyanide and 50 mM sodium thiosulfate solution according to Gharahdaghi (Gharahdaghi et al., 1999). Trypsic digestion was performed using previously described procedure (Vergote et al., 2005). Peptide extraction was performed twice for 15 min with 100 μ l of 50% acetonitrile/1% trifluoroacetic acid (TFA) solution for further matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) analysis or with 100 μ l of 50% acetonitrile/1% formic acid solution for further liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) analysis. Trypsin digests were then lyophilized in a SpeedVac concentrator (Savant) and resuspended in 5 μ l of 0.1% TFA or 0.1% formic acid.

2.4.2. MALDI-ToF MS

MALDI-ToF MS analysis of trypsin digests were performed as previously described (Vergote et al., 2005).

2.4.3. NanoLC–MS–MS analysis

NanoLC–NanoESI–MS/MS analysis were performed on an ion trap mass spectrometer (LCQ Deca XP⁺, Thermo-electron) equipped with a nano-electrospray ion source coupled with a nano high-pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex).

Two microlitres of sample (trypsin digest) were injected into the mass spectrometer using the Famos auto-sampler (LC Packings Dionex). The sample was first desalted and then concentrated on a reserve phase precolumn of 0.3 mm i.d. $\times$ 5 mm (Dionex) by a solvent A (H₂O/Acetonitrile-95/5–0.1% HCOOH) delivered by the Switchos pumping device (LC Packings Dionex) at a flow rate of 10 μ l/min for 3 min. Peptides were separated on a 75 μ m i.d. $\times$ 15 cm C18 Pepmap column (Dionex). The flow rate was set at 200 nl/min. Peptides were eluted using a 5–100% linear gradient of solvent B (H₂O/Acetonitrile-20/80–0.08% HCOOH).

Electrospray needles were purchased from the New Objective society (Woburn, MA, USA). Spray voltage was set at 1.5 kV, and capillary temperature was set at 170 °C. The mass spectrometer operated in positive mode. Data acquisition was performed in a data-dependent mode consisting in a single run of alternation of a full scan MS over the range m/z 500–2000 and a full scan MS/MS of an ion selected in an exclusion dynamic mode (the most intense ion was selected and excluded for further selection for a duration of 3 min). MS/MS data

were acquired using a 2 m/z units ion isolation window and a 35% relative collision energy.

For the automated database search of fragment ion spectra the Bioworks3.1 software (Thermo-electron) was used. The obtained files were directly analysed using the MASCOT MS/MS ions search software (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=&SEARCH=MIS).

Theoretical masses of peptides from precursors (deduced from cDNA sequences) were generated by the PeptideMass software (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

2.5. RNA extraction

Total RNA was extracted from hemocyte pellets using the NucleoSpin[®] RNA II Kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). Total RNA was extracted from whole body snails according to previously described procedures (Guillou et al., 2004).

2.6. Gene characterization

First-strand cDNAs were prepared from total RNAs with oligo d(T)₁₇ for primer using the Superscript II[™] (Invitrogen). The 3' and 5' portions of the cDNAs were amplified by PCR using the GeneRacer[™] Kit (Invitrogen) using different primers designed from ESTs identified by MASCOT analysis (primer positions are given in bold in Figs. 2–6). PCR was performed in 50 μ l mixtures containing 2 μ l of first-strand cDNA using the DyNAzymeEXT[™] kit (Finnzymes).

The PCR products were ligated into the pCR4-TOPO[™] vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Dideoxy sequencing reactions of the recombinant plasmids were sequenced using a dideoxy-dye-terminator method (CEQ[™] DTCS-Quick Start kit, Beckman Coulter) and a CEQ[™] 8000 apparatus (Beckman Coulter). M13 forward, M13 reverse and specific primers were used for sequencing. Sequences were obtained using the CEQ[™] 8000 sequence analysis software.

Similarities were searched using BLASTX program (<http://blast.genome.jp/>). Specific protein domain searches were performed using the ScanProsite program (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>).

2.7. Quantitative reverse transcriptase PCR (Q-PCR)

Q-PCR analysis was performed on total RNAs extracted from hemocytes and whole bodies from unex-

posed and/or exposed (to *E. caproni*) EAF-S and CB-R snails. Reverse transcription was performed as described in Section 2.6. Primers design, Q-PCR and analysis were performed using standard procedure (Guillou et al., 2004).

Statistical significance was assessed using the Mann–Whitney test for nonpaired series and the Wilcoxon test for paired series. *P* values <0.05 were considered as significant. All tests were done using STATVIEW v. 4.5 statistic software package.

3. Results

3.1. Differentially represented proteins in hemocytes from susceptible and resistant strains

The 2-D electrophoretic profiles of proteins from hemocytes of CB-R and EAF-S strains are illustrated in Fig. 1A.

Image analysis revealed 2552 proteins on the gels. Among these spots, we selected all spots showing a differential representation greater than two-fold. Statistical analysis revealed that differences observed for 12 spots were significant (*P* < 0.05). Six of these proteins (670, 933, 1008, 1132, 1426, and 1496) were more represented in hemocytes of susceptible snails and six (628, 1040, 1181, 1401, 1646 and 1686) were more represented in hemocytes of resistant snails (Fig. 1B).

In order to identify these proteins, we first performed an in-gel digestion with trypsin. Trypsin digests were then analysed by nanoLC–MS–MS. Peak lists containing mass and intensity pairs were obtained from peptides and their fragmentation products. These lists were analysed and compared to databases using MS/MS Ions Search software. Sequence tags obtained for the spots 670, 1040, 1401, 1426 and 1686 displayed significant similarities and matched with ESTs of *B. glabrata* (Table 1). As the complete genome of *B. glabrata* is not yet available, we were not able to identify the other spots (628, 933, 1008, 1132, 1181, 1496 and 1646) and we exclude them from the present analysis.

In order to confirm these identifications, complete coding sequences (CDS) of these different genes were then characterized by RACE-PCR using primers designed from the ESTs. The PCR products were then cloned and sequenced. The sequences obtained are shown in Figs. 2–6, which correspond to the complete CDS of the genes encoding proteins 670, 1040, 1401, 1426 and 1686, respectively. The corresponding deduced amino acid sequences were then analysed to obtain the coverage percentage. Theoretical masses of peptides generated by the PeptideMass software were com-

Table 1
Sequence tags obtained by LC–MS–MS and matching with ESTs of *B. glabrata*

Spot	Sequences	ESTs accession numbers
670	FAQYLTPAQEDEL RLEAINLPNTEDNRRK GIIPGIK	CK989803
1040	YAAQINQLR NTAYAELATR GMDYADFWK IDLIQDCEAK IASLQAERDELAR DGMQLQHAQEEVK QLSELEREEBQR SLVEQAIGTAGK MSLELEIACYKK	CV022409 CK149507
1401	DYDVYMTKPDHTFIK SSPGELLPHGFTPLDLMSFEKPGN	CK989288
1426	AAGVSVEPYWPLFAK APAEKKKEAK	CK989132
1686	ISGLIYEETR GVLKVFLENVIRDAVTYTEHAKR	CK725238 CK725259

pared to the experimental peptide tags and experimental peptide mass fingerprint obtained by LC–MS–MS and MALDI–ToF MS respectively. Coverage percentages are given in Table 2.

The cDNA corresponding to spot 670 is shown in Fig. 2. The deduced sequence corresponds to a protein of 367 amino acids. This protein has a calculated monoisotopic mass of 39524.25 Da and a theoretical *pI* of 6.85, which are in good agreement with the position of the protein in the gel. Comparison of the deduced amino acid sequence to the databank revealed high similarities to proteins of the fructose-bisphosphate aldolase family (*E*-value = e^{-145} and e^{-144} for aldolase from platyhelminthes, Swiss-Prot accession number P53442 (El-Dabaa et al., 1998), Q9GP32 (Brehm et al., 2000), respectively). This *B. glabrata* protein was named Bg fructose-bisphosphate aldolase (GenBank accession

Table 2
Percentage of coverage of deduced amino acid sequences by experimental data (tags and fingerprints) obtained from the different proteins of interest

Spot	Coverage (%)
670	30.5
1040	21.5
1401	66
1426	30.5
1686	50.5

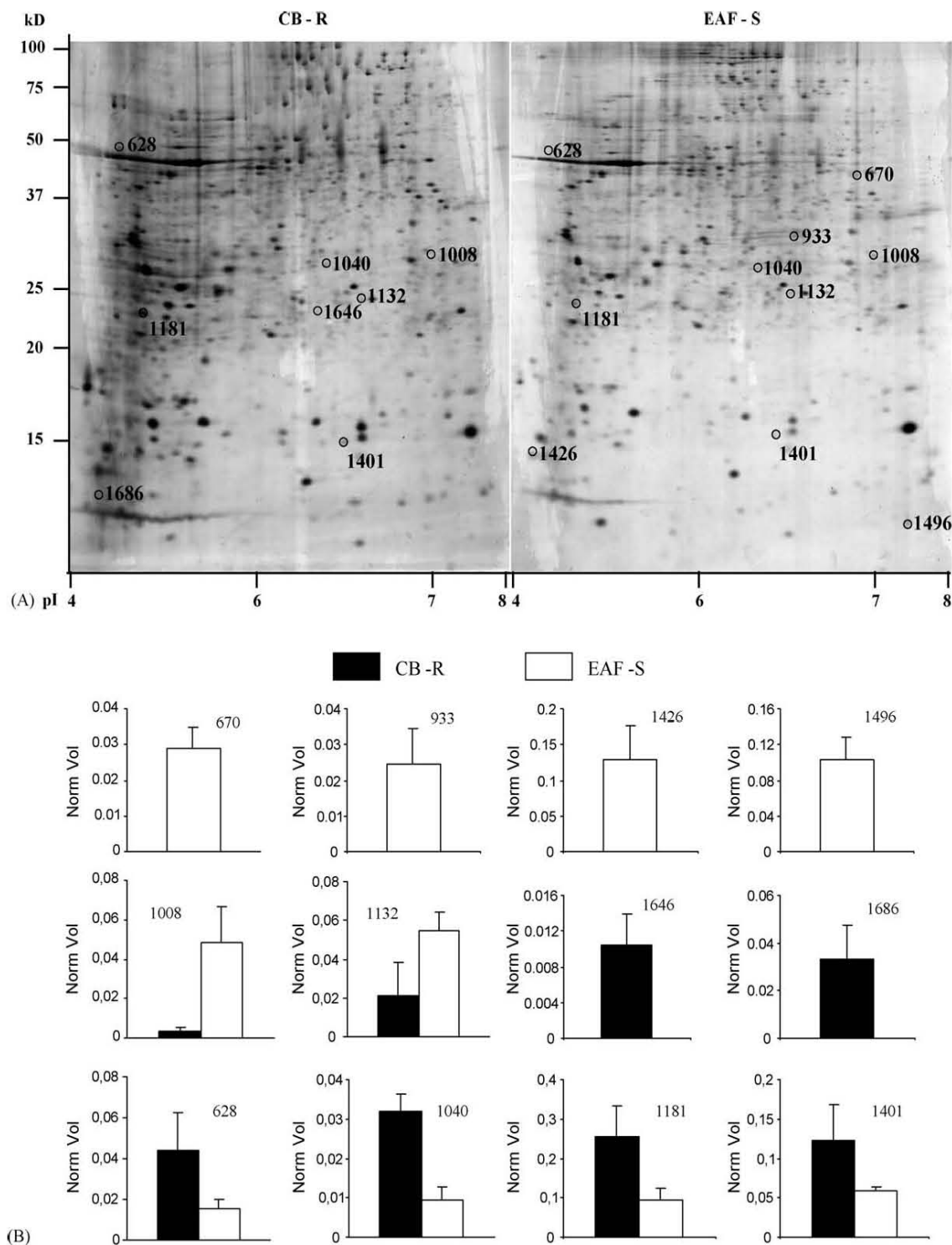


Fig. 1. Comparison of hemocyte protein patterns from uninfected susceptible and resistant snails. (A) Silver-stained two-dimensional reference gels of proteins from *B. glabrata* resistant (CB-R) and susceptible (EAF-S) snails. Molecular mass (M) calibration is indicated on the left of the gel and pI calibration at the bottom of the gel. The pI calibration was done with pI standards run in the same conditions on a separate gel. Spots differentially represented between gels are encircled. (B) Normalized volume of proteins differentially represented between CB-R and EAF-S quantified with Progenesis™ software. All differences are significant when using the Mann–Whitney U -test ($P < 0.05$). The figure shows the average values obtained from six gels for each condition. Spots 670, 933, 1426 and 1496 were not detected on CB-R gels and spot 1646 and 1686 were not detected on EAF-S gels.

GTTTTTGCCCTCGGTAGACAGTCCGACTGTACGTCGTATTATTTTT**GCAGTTCAAGAACTAGTTGG**ATATAATCTAGATCATG
 GCTAAGCCTAAATCCCGTTTTGCACAGTACTTAACACCTGCCAGGAAGATGAGCTGCGGGGCATTGCTAATGCCATCGTCCG
 A K P K S R **F A Q Y L T P A Q E D E L R** G I A N A I V R
 TGCTAAATGTGGCATTCTTGCTGCTGATGAATCAGTTGGCACTATGGGCAAAAGGTTAGAGGCTATCAACTGCCAAATACAG
 A K C G I L A A D E S V G T M G K **R L E A I N L P N T**
 AGGACAACAGACGCAAATACAGAGAGCTCCTTTTACAGCAGATGACAGTCTTTCAGAAAACATTAGTGGAGTTATTTGTTT
E D N R R K Y R E L L F T A D D S L S E N I S G V I L F
 GACGAAACATTGACAGAGCACTGCCGAGGCAAGCCTTTTGTAAAAGTTTTCAGAGAGAGGGGCATCATTCGGGAATTAA
 D E T F R Q S T A A G K P F V K V L Q E R **G I I P G I K**
 AGTTGACAAAGGTGTTGCCATTGGCTGGAACCTTAACGAATGCACAACTCAAGGCTTAGACGGCTCTCTGAGAGGTGTG
 V D K G V V P L A G T L N E C T T Q G L D G L S E R C
 CTGAATACAAAAAGGAGGGTGTGGATTGCTAAATGGCGATGTGTGCTGAAAATTTAGAAATTTACACCATCTACCAAGCT
 A E Y K K G G C G F A K W **R** C V L K I S E F T P S Y Q A
 ATGTTGAAAATGCTAATGTGCTTGCCCGTTACGCCAGCATTTGCCAACAGAAATGGCATAGTGCCAATCGTTGAACCAAGAGT
 M L E N A N V L A R Y A S I C Q Q N G I V P I V E P E V
 ACTCCCTGATGGTGATGACTTGGAACTGCACAAAGAGTAACCTGAACAGGTTTGTAGCTTTACCTACAAAGCTCTTGACG
 L P D G L D H D L E T A Q R **V T E Q V L A F T Y K A L A**
 ACCATAATGTCTCTTGAGGGTACTCTACTAAAACCAACATGGTGACAGCTGGTCAGGCTTGACCAAGACTTACAAGCCA
D H N V F L E G T L L K P N M V T A G Q A C T K T Y K P
 GAAGACAATGCAAGGCAACAGTGACTGCTCTCAACAGGACTGTACCTGCTGCAGTTGCTGGTGTACTTTCTCTCTGGTGG
 E D N A R A T V T A L N R T V P A A V A G V T F L S G G
 ACAGTCTGAAGAGGATGCTACCTTAATCTTAATGCCATCAACAGTTCCAGGACGCAACCTTGGCCACTGACCTTCTCCT
 Q S E E D A T L N L N A I N Q F P G R **K P W P L T F S**
 ATGGCGTGCCCTTCAAGCCAGTGTACTGAAAGCTTGGGAGGTAAAGATGAAAACATCAAGGCTGCCAGGACGAATTGGTC
Y G R A L Q A S V L K A W G G K D E N I K A A Q D E L V
 AAGCGTGCTAGAGCTAATGGTGAAGCTGCAGTTGGATTATACAAAGGATCCGGTTCCTCAGCAGCGGGCGGAGAATCTCTGTT
K R A R A N G E A A V G L Y K G S G S S A A G G E S L F
 TGTGCCAACCATGCTTATTAACAAC**CCACAAGGAACACCTCAAA**ATTTACGTCTTAAAAATATTTTGGCTTTCATAGTTA
 V A N H A Y
 AAAGTATAAAATTTTAAACGATGATTTTAAACTTAAAAAGTATTTATTTTATCTTTATCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAA

Fig. 2. cDNA corresponding to the protein 670 (aldolase). The deduced amino acid sequence is shown in widely spaced upper case letters. Fragments of the protein identified by analysis of mass spectrometry data are highlighted in pale grey (mass fingerprint and tags obtained by MALDI-ToF and MS-MS). The charged amino acids known to mediate actin binding to the rabbit aldolase protein (Wang et al., 1996) are boxed. Positions of primers designed for Q-PCR and CDS characterization are in italic and in bold respectively.

number: DQ117975). This protein is probably cytoplasmic as predicted by the PSORT II prediction program and contains the four charged amino acids known to mediate actin binding to the rabbit aldolase protein (Wang et al., 1996).

The cDNA corresponding to spot 1040 is shown in Fig. 3. The deduced sequence corresponds to a protein of 582 amino acids. This protein has a calculated monoisotopic mass of 65237.61 Da and a theoretical *pI* of 5.48, which are not in agreement with the position of the protein in the gel. Comparison of the deduced amino acid sequence and the peptides tags and fingerprint obtained by mass spectrometry revealed that only the C-terminal part of the precursor is covered by experimental data (Fig. 3). These data strongly suggest that the spot 1040 could (i) be the result of cleavage of the N-terminal portion of the full-length protein and (ii) correspond to the C-terminal part of the precursor starting at G271. Indeed, this last part of the precursor has a calculated mass of 34538.68 Da which is in agreement with the position

of the protein in the gel. Comparison of this precursor to the databank revealed high similarities to proteins of the intermediate filament family from molluscs (*E*-value ≈ 0 ; *Aplysia californica* S24545, *Helix aspersa* S12277, *Lymnaea stagnalis* Q6QUW1). Consequently, the protein corresponding to spot 1040 was named Bg intermediate filament protein (GenBank accession number: DQ117976).

The cDNA corresponding to spot 1401 is shown in Fig. 4. The deduced sequence corresponds to a protein of 139 amino acids. This protein has a calculated monoisotopic mass of 15227.49 Da and a theoretical *pI* of 6.41, which are in good agreement with the position of the protein in the gel. Comparison of the deduced amino acid sequence to the databank revealed high similarities to cytidine deaminase from vertebrates (*E*-value $< 2e-39$ for cytidine deaminase from *Mus musculus*, P56389 or *Homo sapiens*, P32320). A protein motif database search (SCANPROSITE) revealed the presence of an active site for cytidine deaminases (PS00903), which is

TTATCCTAACTCACGGTAGTATATTGGGAAATCTATCACAGTAGACTACACTAGAAAACAAACATGTCTTCTAAGTCCAAGCA
 AGTTCCTTGATGAGGAACAGGGTCGCCAGAGCGGCATCCAGTCCAGGAACCTTCGTCATCACCCGTACCGACCCAGGAGGAGCA
 V L D E E Q G R Q S G I Q S R N F V I T R T D P R R S
 ATGCCTCCAGCGTTTTCTCCAGCAGCAGGAGCAGCTATGGCGTCCGTAGCTCCATCTCCCCAGGAGTCTACCAGCAGCTGTCC
 N A S S V F S S S R S S Y G V R S S I S P G V Y Q Q L S
 AGTCCGGAATCACAGACTTCAAGGAAACCGTGAGAAGGAAAAACGTGAGATGCAAAACCTGAACGAGCGTCTGGCCAGCTA
 S S G I T D F K G N R E K E K R E M Q N L N E R L A S Y
 CATCGAGAAGGTTCACTTCTGGACGCCAGGTGAAGAAGCTGGAAGCTGAAAACGAGGCTCTGAGAAAACAGGAAGGTGAAG
 I E K V H F L D A Q V K K L E A E N E A L R N R K V E
 ACCTCCAGCCCATCAGGGATGCTTATGAGAACGAGCTCCGTGAGGCCAGAAAAGTCATCGATGAGCTCCACAAGGGT
 D L Q P I R D A Y E N E L R Q A R K V I D E L S S T K G
 GTGGCTGAAGCCAACTTGACAGTCTCCTTGACGAGATTGCTTCCCTTCGTGCTCTCATTGTAACCTACGAAGGTGAGGGCAA
 V A E A K L A G L L D E I A S L R A L I V T Y E G Q G K
 AGATTACAGAAAAGATTGACACCCCTTACAAACCACTTGGAGAATTTGAAGGAGAACTCCAGAGCCTTAGACTCAGAGTTG
 D Y R K K I D T L T N Q L G E F E G E L Q S L R L R V
 GCTCCCTTGAGGATGAAAATGCCAACTTAGAGAGCTACTTGAGAAAGTCCAGGAGCAGAACAGCTCTCCGTTGACACCTT
 G S L E D E N A K L R E L L E K V Q E Q N R R L R S D L
 GATGCTGAGACAGCTGCCACATTGAGGCTGACTGCCTTGACAGACCAAGACTGAGGAGGCTGAA**TTCTACAAGGATCTCCT**
 D A E T A A H I E A D C L A Q T K T E E A E F Y K D L L
AGACCAGCTTGAAGTCTTAAACAGAGCCTATCCAGATCAAGGCATGGACTATGCTGACTTCTGGAAATCTGAAGTGGCTA
 D Q L E L L K P E P I Q I K **G M D Y A D F W K** S E L A
 AATGTGTACGTGAAATCAATTGGCATAACGATGAAAAGATTGACCTCATTCAACAGGACTGTGAAGCTAAATATGCTGCTCAA
 K C V R E I N L A Y D E K **I D L I Q Q D C E A K Y A A Q**
 ATCAACCAACT**CGTTCTGGTAATGTGAAGGATGGC**ATGCAATGCTCAGGAAGAGGTCAAGAAATTGAGAGGCCA
I N Q L R S G N V K **D G M Q L Q H A Q E E V K** K L R G Q
 GCTCAAGACAAGAACTGCCTATGCTGAAGTGGCTACCAGAATTGCATCATTACAAGCTGAACGTGATGAGCTTGCTAGAC
 L Q D K **N T A Y A E L A T R I A S L Q A E R D E L A R**
AGTTGTCAGAATTAGAGCGTGAAGTGGAGGAACAGAGAATCAAGTACAACCACGATGTTGGAGACTTGAATCCGAACCTCACC
Q L S E L E R E L E E Q R I K Y N H D V G D L E S E L T
 AGTGTCTGGCCCAATTACAACACCTCATGGATGCCAAGATGTCTTGAATTGGAGATTGCATGCTACAAGAAGCTGCTGGA
 S V L A Q L Q H L M D A K **M S L E L E I A C Y K K** L L E
 GGGTGAAGAATCCAGGGTGGTCTAAGATCTCTTGGAACAAGCCATTGGAACAGCTGGAAAAGGAGCCTCCAACLTGAAGG
 G E E S R V G L R **S L V E Q A I G T A G K** G A S N L K
 AAGTTATCCAATCATCTACTTTAAAAGAATCAACTGGCAGCTTGACAGTTCAAAGGTCCTCTAAAGGCACCATTTGGCTTGCA
 E V I Q S S T L K E S T G S L T V Q R S S K G T I G F A
 AGCATTGATCACAGTGGTGGTAATGTTGTTATTGAGAACACAACATCAGGTGCTCGTGCCAAGAATCAGAGCTTGAAAGATTG
 S I D H S G G N V V I E N T T S G A R A K N Q S L K D W
 GGTATTGCAAAATAGTGAACAACAAGGTATCATTTGAGATTAACTCAAGGATCTTGAAGTCCGACCGAGGCCGACATACA
 V L Q K K L V N N K **V S F E I K L K D L E L G P G R T Y**
 CAATCTGGGCAAGGGAGCCAGGACAGCTGACAATGAGCAAGTTGCTGACCACTTCTCATTGTTGGTGGTAACA
T I W A K G A K D K A T A D N E Q V A D Q F S F G V G T
 TGCACCTGGAACCTTCTGGATGAAAGTAGCAATGAAAAGGCCACTCTTGTGCAAGTTGAGCGGTTAAATGTCATCATCATT
 C T W K L L D E S S N E K A T L V A K F S G
 TTTACAACGCCTGACATGGAAGGGACACCACTCTTGTCTCTCCATTTCCGTTTCGGCAATTAGGTTCACTGGCAGCATTTA
 TATTTCTGTTGGCATGGAGATTGAGGGGGCATGATAGTTAAAGAGGGAATTATTATGTATAAACTAAGTATTTAAAACTGAAC
AAGTACAACTAGAGTAACATCAGTACACTGCAGGTTCATGGC

Fig. 3. cDNA corresponding to the protein 1040 (intermediate filament protein). The deduced amino acid sequence is shown in widely spaced upper case letters. Fragments of the protein identified by analysis of mass spectrometry data are highlighted in pale grey (mass fingerprint and tags obtained by MALDI-ToF and MS-MS). Positions of primers designed for Q-PCR and CDS characterization are in italic and in bold respectively.

conserved in the large cytosine deaminase family. The family can be classified into RNA-editing deaminases, cytidine deaminases and cytosine deaminases based on substrate specificity and the active-site sequence. The analysis of the precursor showed that our protein shares the structural features of the cytidine deaminase group (see Fig. 4). Consequently, this *B. glabrata* protein was named Bg cytidine deaminase (GenBank accession num-

ber: DQ117977). Note that this protein is also probably cytoplasmic as predicted by the PSORT II prediction program.

The cDNA corresponding to spot 1426 is shown in Fig. 5. The deduced sequence corresponds to a protein of 114 amino acids. This protein has a calculated monoisotopic mass of 11573.75 Da and a theoretical pI of 4.44, which are in good agreement with the

GGTAGTAACGAACGGGCGGTAACCTCTTGTGAGCCCTTCTATCAAGTCACAAGCGTTACAGGTGCTGACACGTGACATTCCGGTT
 TAAAAATGTGTGACGTGAGAGTTTGGTGAAGGCCAGCCATGAGGCAAACTCAAAGCGTACTGCCCCCTACAGTAAGTTTCAA
 M C D V E S L V K A S H E A K L K A Y C P Y S K F Q
 GTCGGCGCCGCGGTGTTGACAGAGGATGGCAAAGTATTACAGGATGCAATGTTGAAAATGTTTCTCTATTCTTTGACAATCTG
 V G A A V L T E D G K V F T G C N V E N V S Y S L T I C
 CGCAGAAAGGTGACGTCTCTGGTTAAAGCTGTGTCAGAAGGTACACACGGTTCAAGGCCATCGCTGTGCGCTCTAACATGCGCTG
 A E R S A L V K A V S E G H T R F K A I A V A S N M P
 ACAAGTACATTAGTCCATGTGGTGCTTGCCGACAATTTCTCTGGAGTTTGGGAAGGACTATGACGTGTACATGACCAACCT
 D K Y I S P C G A C R Q F L L E F G K D Y D V Y M T K P
 GACCACACGTTTATCAAGTCCAGCCCTGGAGAACTCTTGCCACATGGATTCACTCCCTTGGATCTTATGTCTTTGAAAAAC
 D H T F I K S S P G E L L P H G F T P L D L M S F E K P
 TGGAAATTAGTTGTTGAAATTTACATTTTTTAATATTTTAATTTTGCCGTTATTACATTCTCTCCCTGTTCTGTGTGTGTG
 G N
 TGTGAATAAGGAGAGAGTGGTGGGGAGTGAAAATACGAGAGAGAGAAAGAGAGAGGGAGGTAATTAAGGGAAAGAAATAGGA
 AGTAGAAAAGAGAGAGAGAAAGATGCAAGAATAGAAAAGAAAGAGTCGTGTATGGACAGATATAACTGTGAACCAATACCAG
 ATTAAGAAAAATATGTAAAAA

Fig. 4. cDNA corresponding to the protein 1401 (Cytidine deaminase). The deduced amino acid sequence is shown in widely spaced upper case letters. Fragments of the protein identified by analysis of mass spectrometry data are highlighted in pale grey (mass fingerprint and tags obtained by MALDI-ToF and MS-MS). Cytidine and deoxycytidylate deaminases zinc-binding region signature is underlined. Boxed regions indicate the active site domains and arrows denote the conserved cysteines involved in the Zn binding. Conserved residues found in all members of the protein family are underlined. Positions of primers designed for Q-PCR and CDS characterization are in italic and in bold respectively.

position of the protein in the gel. Comparison of the deduced amino acid sequence to the databank revealed high similarities to acidic ribosomal protein P1 (E -value = $5e-39$ and $4e-36$ for ribosomal protein P1 from *Drosophila melanogaster* P08570 and *Mus musculus*, P47955, respectively). This *B. glabrata* protein was named Bg ribosomal protein P1 (GenBank accession number: DQ117978).

The cDNA corresponding to spot 1686 is shown in Fig. 6. The deduced sequence corresponds to a protein of 103 amino acids. This protein has a calculated monoisotopic

mass of 11360.38 Da which is in good agreement with the molecular weight deduced from the molecular mass calibration. Nevertheless, the position in the gel ($4 < pI < 5$) is not in agreement with the theoretical pI of 11.36 calculated from the amino acid sequence deduced from the cDNA. Comparison of the deduced amino acid sequence to the databank revealed high similarities to numerous histone H4 (E -value = $2e-52$ for histone H4 from *Mus musculus*, Q6PDS7, for example). This *B. glabrata* protein was named Bg histone H4 (GenBank accession number: DQ117979).

GCTTCCTTTTCCAATCTACCAAGGAACAAAAGTGTATCGTTCTCTTTAGAGCTAAGGCCATCCGGCGACGTACACTATAATTT
 TTTATTAATCCATACAAAAAGCTAATAAAATGGCAGGAGAAGACGAGTTAGCATGCGTGTATGCCGATTGATCCTTGACAG
 M A G E D E L A C V Y A A L I L A
 ATGACCAAGTTGCAATTACCAAGTGACAAAATAGCAACTCTCTTAAAGCTGCTGGTGTATCTGTTGAACCATACTGGCCTGGT
 D D Q V A I T S D K I A T L L K A A G V S V E P Y W P G
 CTGTTTGCAAAGGCTCTTGATGGTATGAATGTTAAAGATCTGATACCAATGTTGGTAGTTGAGCTGGTTCTGCCCCCTGCTGC
 L F A K A L D G M N V K D L I T N V G S S A G S A P A A
 TGCTGTGCTGCTCCAGCCCCTGCTGCTGCAGCTGCAAGCAAGGCTCTGCGAGAAGAGAAAAAGGAAGCTAAGAAAGAGAGT
 A A A P A P A A A A S K A P A E E K K K E A K K E E
 CAGATCACTCAGATGAGGATATGGGCTTTGGGCTCTTTGACTAAAGATGTTATACATTCATGTAATAAGCCATTGATGTTG
 S D H S D E D M G F G L F D
 TAAAAA

Fig. 5. cDNA corresponding to the protein 1426 (Ribosomal Protein P1). The deduced amino acid sequence is shown in widely spaced upper case letters. Fragments of the protein identified by analysis of mass spectrometry data are highlighted in pale grey (mass fingerprint and tags obtained by MALDI-ToF and MS-MS). Positions of primers designed for Q-PCR and CDS characterization are in italic and in bold respectively.

AGTCGATTCCGGT**AAAAATCTTCTACATCAACATG**TCTGGACGTGGTAAAGGTGGAAAGGGCTTAGGCAAGGAGGCGCCAAGC
M S G R G K G G K G L G K G G A K
GTCACCGCAAAGTATTGCGTGATAACATCCAGGGTATCACTAAGCCTGCCATCCGTCGTCTTGCTCGCAGAGGTGGTGTCAAA
R H R K V L R **D N I Q G I T K P A I R** R L A R R G G V K
CGTATCTCTGGTCTGATCTATGAAGAAACCAGAGGTGTCTTAAAGGTTTTCCTTGAAAATGTCATCAGGGATGCCGTACCTA
R **I S G L I Y E E T R G V L K V F L E N V I R D A V T Y**
CACTGAGCATGCCAAGAGGAAGACTGTCACTGCTATGGATGTGGTCTACGCATTGAAACGCCAAGGACGTACCCTGTACGGCT
T E H A K R K T V T A M D V V Y A L K R Q G R **T L Y G**
TTGGTGGTTAA**CCATCTCGAACGCTGCAT**CTCACACCTCTCAAGAAAACACCGGCCCTTATCAGGGCCATCCCAAAAAA
F G G
AAAAAAAAAAAAA

Fig. 6. cDNA corresponding to the protein 1686 (Histone H4). The deduced amino acid sequence is shown in widely spaced upper case letters. Fragments of the protein identified by analysis of mass spectrometry data are highlighted in pale grey (mass fingerprint and tags obtained by MALDI-ToF and MS-MS). Positions of primers designed for Q-PCR and CDS characterization are in italic and in bold respectively.

3.2. Differential abundance of the proteins is neither correlated to a differential transcription level nor linked to differences in primary structures of the proteins between the two strains

In order to determine if the differences in abundance of the proteins could be linked to different transcript contents in hemocytes for the corresponding genes, we analysed the expression ratio of each gene to ribosomal protein (S19) by Q-PCR (Fig. 7). No significant difference in transcript content was evidenced for the gene encoding Bg aldolase, Bg cytidine deaminase, Bg ribosomal protein P1 and Bg histone H4. A significant difference was only observed for the gene encoding Bg intermediate

filament protein ($P < 0.05$). The corresponding transcript was 3.7 more represented in hemocytes of susceptible snails (Fig. 7), whereas the corresponding protein (cleavage product) was 3.41 more represented in hemocytes of resistant snails.

Therefore, differences in hemocyte content of our different proteins of interest do not appear correlated with differences in expression ratios of the corresponding genes.

In order to investigate if mutations between strains could be responsible for differential position of proteins in gels, we further characterize the CDS of these different genes in the two strains. No differences were observed.

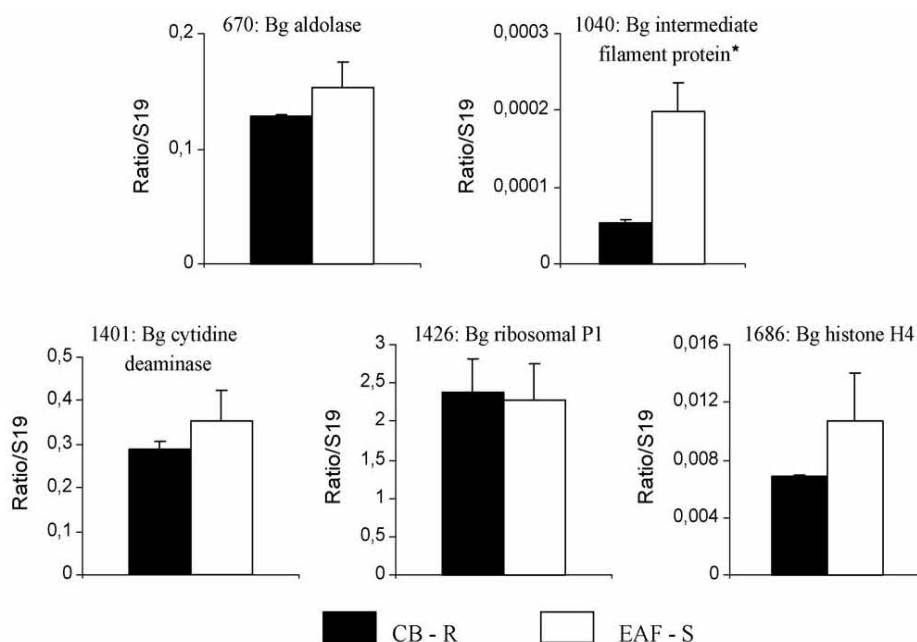


Fig. 7. Differential abundance of transcripts in hemocytes of the resistant CB-R (dark boxes) and the susceptible EAF-S (light boxes) uninfected strains. Transcript ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relatively to S19 expression levels. Each histogram is the average value ($\pm$ S.D.) of three independent experiments each performed in duplicates. *Bg intermediate filament protein corresponding gene showing difference in transcript level that was significant ($P < 0.05$).

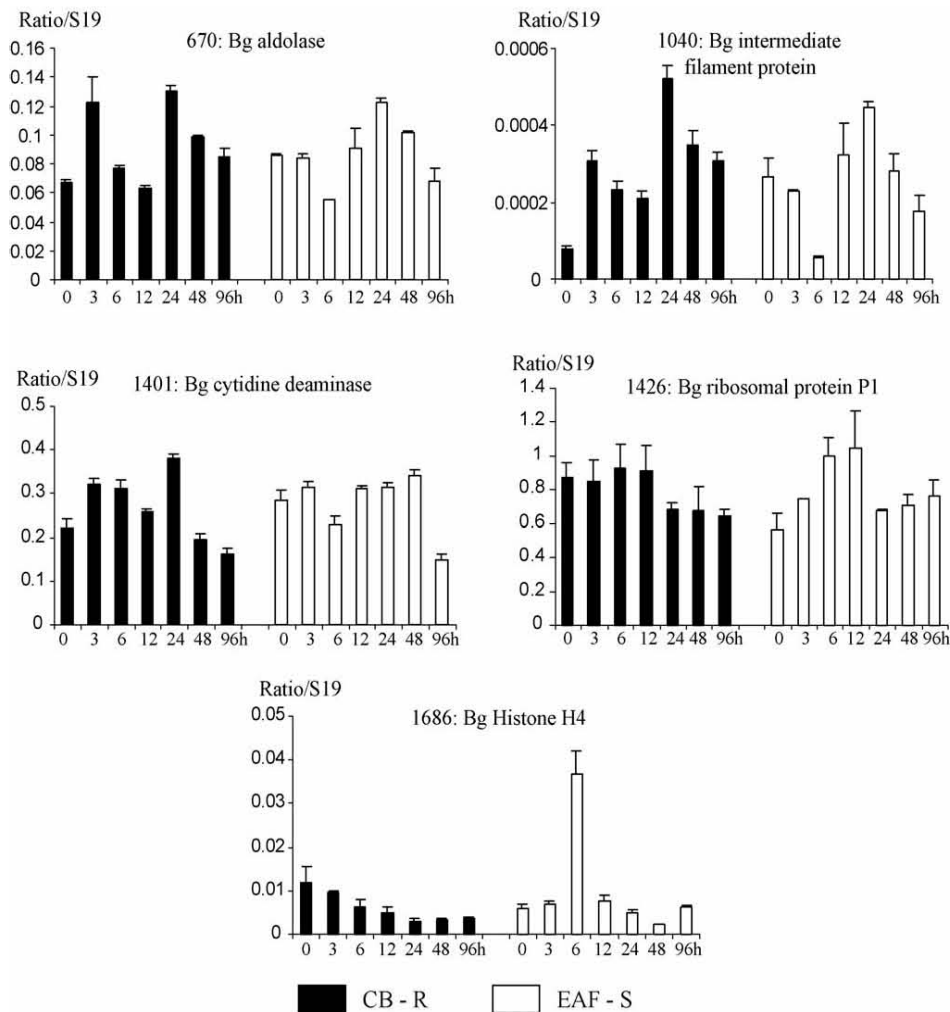


Fig. 8. Transcript ratios corresponding to the spots 670, 1040, 1401, 1426 and 1686 in the resistant CB-R (dark boxes) and susceptible EAF-S (light boxes) infected snails at different times post-exposure. Ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relatively to S19 expression levels (ratio/S19). Each histogram is the average value ($\pm$ S.D.) of three independent experiments each performed in duplicates.

3.3. Effect of infection on expression ratios

In order to further investigate the potential involvement of the candidate genes in the differential susceptibility of strains, we analyzed their transcript level at various times after exposure to *E. caproni* (Fig. 8). The kinetic rates of transcription of the genes of interest were analyzed on total RNA extracted from three independent pools of ten snails at 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 96h post infection.

No significant differences between the two strains were observed concerning the variations of Bg aldolase, Bg cytidine deaminase and Bg ribosomal protein P1 transcripts at different periods post-infection. On the other hand, significant variations ($P < 0.05$) were evidenced for the genes encoding Bg histone H4 and Bg

intermediate filament protein. Indeed, a peak of Bg histone H4 was evidenced following 6h of infection (6.25 fold the control value) in susceptible but not in resistant snails. Bg intermediate filament protein transcripts increase during the first hours post-infection with a peak reached at 24h (6.77 times more than in the control). On the contrary, Bg intermediate filament protein transcripts decrease during the first hours post-infection and drop drastically at 6h (4.63 times less than the control).

4. Discussion

The comparative proteomic approach we used to study hemocytes collected from susceptible and resistant snails revealed that 12 out of the 2552 proteins

from hemocytes exhibited significant differences in their apparent abundance.

Direct comparison of tags obtained by LC–MS–MS to databases allowed the identification of 5 of these 12 differentially represented proteins. The complete CDS of the different corresponding cDNAs were characterized using RACE-PCR. These five cDNAs displayed high similarities for proteins whose function is known in numerous biological models. These proteins were named Bg aldolase, Bg intermediate filament protein, Bg cytidine deaminase, Bg ribosomal protein P1 and Bg histone H4.

Bg aldolase is a protein detected only in hemocytes of the EAF-S strain. The corresponding transcript is highly and equally present in hemocytes of the 2 strains. No difference in the primary structure of the protein was evidenced by complete CDS sequencing of the 2 strains. This means that only translational or post-translational processes could explain the absence of this protein in hemocytes extracts from CB-R snails. Fructose-1,6-biphosphate aldolases are ubiquitous glycolytic enzymes that catalyze the reversible cleavage of D-fructose 1,6-biphosphate to D-glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate, by an ordered uni-bi mechanism (Rose et al., 1965). It has been known for many years that several glycolytic enzymes can interact with cytoskeletal proteins (Arnold and Pette, 1968) and it has been proposed that some of these enzymes could play structural and/or regulatory roles in cytoplasm, in addition to their catalytic role. In apicomplexan parasites, recent results have revealed a potential role for aldolase in connecting adhesion molecules from the parasite with the cytoskeleton, and have provided a model linking adhesion with motility (Buscaglia et al., 2003; Jewett and Sibley, 2003). Such an involvement of aldolase in our system could be crucial to explain the differences of compatibility between strains. This hypothesis is strengthened by the conservation in Bg aldolase of the 4 charged amino acids known to mediate actin binding (Wang et al., 1996). The differential abundance or post-translational processing of Bg aldolase between strains could explain differences in motility or adhesion of hemocytes from susceptible snails which failed to encapsulate the parasite (Ataev and Coustau, 1999).

Bg intermediate filament protein is a protein whose cleavage product is more represented in hemocytes of the CB-R strain. This could participate in a regulated proteolysis process of Bg intermediate filament protein, as it was already evidenced for an intermediate filament protein of another gasteropod (Perlson et al., 2004). We have shown that the transcript corresponding to this protein is more represented in hemocyte of the

EAF-S strain. In addition, the transcript concentration of this gene varies very differently after exposure to the parasite in the 2 strains: high increases are evidenced in resistant snails in the first 24 h following exposure, whereas high decreases are observed in susceptible ones at the same time. All these observations taken together reveal that the regulation of the expression of this gene is very different in hemocytes of the two strains. This kind of protein is involved in the structure of the intermediate filaments which are one of the three cytoplasmic filament systems participating in conjunction with microfilaments and microtubules to the cytoskeleton filament network. While these structures were considered to form static “space filling” cytoplasmic network in the cells, recent works showed that intermediate filament are dynamic, motile elements of the cytoskeletal repertoire of vertebrate cells (Helfand et al., 2004). Considering the major role probably played by differences in hemocyte mobility and adherence capabilities towards the parasite between strains, this gene that is differently regulated between strains could be a candidate to explain differences in susceptibility/resistance.

While no difference in transcript concentration of the gene encoding Bg histone H4 was evidenced, the corresponding protein was only detected in gels from the CB-R snails. In addition, the position in the gel of the protein in extracts from CB-R hemocytes ($4 < pI < 5$) is not in agreement with the theoretical pI of 11.36 calculated from the amino acid sequence deduced from the cDNA. This phenomenon was already observed for the same protein in other models (<http://www.expasy.org/cgi-bin/nice2dpage.pl?P02304>). This suggests that the protein could have been submitted to major post-translational modifications in hemocytes of the CB-R strain. Recently, it was shown that histone are subject to extensive post-translational modifications, such as acetylation, methylation, phosphorylation and other covalent marks (Jenuwein and Allis, 2001; Peterson and Laniel, 2004) linked to either activation or repression of transcription (Freitas-Junior et al., 2005; Nie et al., 2005). In our model this differential post-translational status of histone H4 could reflect a differential chromatin structure in hemocytes of CB-R and EAF-S snails responsible for different patterns of gene expression. In addition, following parasite exposure we evidenced a differential regulation of the corresponding gene between strains. While no variation was observed in resistant snail, a high increase of Bg histone H4 transcript was observed in susceptible ones. This could also trigger chromatin modifications in susceptible snails and result in different patterns of gene expression in EAF-S snails contributing to the success of infection.

The spot 1426 corresponds to the acidic ribosomal protein P1 from *B. glabrata*. While this protein was only detected in hemocytes of the EAF-S strain, no difference in the transcript content of the corresponding gene in hemocytes of the two strains was evidenced. This suggests that post-translational modifications could also be involved in the differences observed. Some post-translational modifications of acidic ribosomal protein were documented (Nusspaumer et al., 2000; Giorgianni et al., 2004) and these can affect the expression of specific proteins and the manifestation of particular phenotypes (Zambrano et al., 1997; Rodriguez-Gabriel et al., 1998). Nevertheless, it is difficult to speculate on the potential role of these modifications in our system.

Finally, we evidenced in this study a cytidine deaminase more represented in hemocytic extracts of the resistant snails. This enzyme is an evolutionarily conserved enzyme of the pyrimidine salvage pathway, which catalyzes the hydrolytic deamination of cytidine to form uridine (Camiener and Smith, 1965). This enzyme is intracellular, cytosolic and highly expressed in human mature granulocytes (Kuhn et al., 1993). This protein is released upon granulocyte activation (Mansson et al., 1990; Yu et al., 1992) and has a growth regulatory effect by depleting the pool of cytidine required for genome replication. The potential regulatory role of this molecule on hemocyte mitosis could participate to a better regulation of the cellular response in resistant snail. In addition, as this enzyme is released upon activation, it could trigger a cytidine depletion around the parasite encircled by the hemocytes leading to an inhibition of parasite mitosis and development in resistant molluscs.

In conclusion, this proteomic approach has been successful in identifying proteins that were differentially represented in hemocytes from *E. caproni*-susceptible and -resistant *B. glabrata*. Various assumptions can be made on their potential involvement in susceptibility/resistance processes. Future functional studies are needed to clarify the roles of these genes in our host–parasite model. Future studies would also need to concern the additional spots identified in Fig. 1 (but not analysed in this study) using an approach similar to that made by Vergote et al. (2005) for plasma proteins. Indeed, these unknown molecules are susceptible to represent interesting specific hemocyte factors which are not yet present in EST databases (due in part to their low representation in mollusc total RNA).

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS. The Proteomics facility used in this study was funded by the

European Community (FEDER) the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, the Génopole of Lille and the Université des Sciences et technologies de Lille. We are grateful to Pierre Tisseyre (FR2577 CNRS) for performing DNA sequencing. We are indebted to (i) Benjamin Gourbal and André Théron for critical reading of the manuscript and (ii) Fabien Morat for technical assistance.

References

- Arnold, H., Pette, D., 1968. Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *Eur. J. Biochem.* 6, 163–171.
- Ataev, G.L., Coustau, C., 1999. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 187–198.
- Brehm, K., Jensen, K., Frosch, M., 2000. mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. *J. Biol. Chem.* 275, 38311–38318.
- Buscaglia, C.A., Coppens, I., Hol, W.G., Nussenzweig, V., 2003. Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in plasmodium. *Mol. Biol. Cell.* 14, 4947–4957.
- Camiener, G.W., Smith, C.G., 1965. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I: Enzyme distribution and species specificity. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1405–1416.
- El-Dabaa, E., Mei, H., El-Sayed, A., Karim, A.M., Eldesoky, H.M., Fahim, F.A., LoVerde, P.T., Saber, M.A., 1998. Cloning and characterization of *Schistosoma mansoni* fructose-1,6-bisphosphate aldolase isoenzyme. *J. Parasitol.* 84, 954–960.
- Freitas-Junior, L.H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S.A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O.K., Rojas-Meza, A.P., Mancio-Silva, L., Leal-Silvestre, R.J., Gontijo, A.M., Shorte, S., Scherf, A., 2005. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell* 121, 25–36.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Inai, B.S., Mische, S.M., 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601–605.
- Giorgianni, F., Beranova-Giorgianni, S., Desiderio, D.M., 2004. Identification and characterization of phosphorylated proteins in the human pituitary. *Proteomics* 4, 587–598.
- 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.
- Helfand, B.T., Chang, L., Goldman, R.D., 2004. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J. Cell. Sci.* 117, 133–141.
- Humbert, E., Coustau, C., 2001. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata*–*Echinostoma caproni* system. *Parasitology* 122, 651–660.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jewett, T.J., Sibley, L.D., 2003. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol. Cell.* 11, 885–894.

- Jeyarasasingam, U., Heyneman, D., Lim, H.K., Mansour, N., 1972. Life cycle of a new echinostome from Egypt, *E. liei* sp. nov. (Trematoda; Echinostomatidae). *Parasitology* 65, 203–222.
- Kuhn, K., Bertling, W.M., Emmrich, F., 1993. Cloning of a functional cDNA for human cytidine deaminase (CDD) and its use as a marker of monocyte/macrophage differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 1–7.
- Langand, J., Jourdan, J., Coustau, C., Delay, B., Morand, S., 1998. Cost of resistance, expressed as a delayed maturity, detected in the host–parasite system *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni*. *Heredity* 80, 320–325.
- Langand, J., Morand, S., 1998. Heritable non-susceptibility in an allopatric host–parasite system: *Biomphalaria glabrata* (Mollusca)–*Echinostoma caproni* (platyhelminth Digenea). *J. Parasitol.* 84, 739–742.
- Lewis, F.A., Richards, C.S., Knight, M., Cooper, L.A., Clark, B., 1993. *Schistosoma mansoni*: analysis of an unusual infection phenotype in the intermediate host snail *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* 77, 349–361.
- Lockyer, A.E., Noble, L.R., Rollinson, D., Jones, C.S., 2004. *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Exp. Parasitol.* 107, 97–104.
- Mansson, B., Geborek, P., Saxne, T., Björnsson, S., 1990. Cytidine deaminase activity in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: relation to lactoferrin, acidosis, and cartilage proteoglycan release. *Ann. Rheum. Dis.* 49, 594–597.
- Miller, A.N., Raghavan, N., FitzGerald, P.C., Lewis, F.A., Knight, M., 2001. Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *Int. J. Parasitol.* 31, 687–696.
- Morrissey, J.H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117, 307–310.
- Nie, M., Knox, A.J., Pang, L., 2005. β 2-Adrenoceptor agonists, like glucocorticoids, repress eotaxin gene transcription by selective inhibition of histone H4 acetylation. *J. Immunol.* 175, 478–486.
- Nowak, T.S., Woodards, A.C., Jung, Y., Adema, C.M., Loker, E.S., 2004. Identification of transcripts generated during the response of resistant *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection using suppression subtractive hybridization. *J. Parasitol.* 90, 1034–1040.
- Nusspaumer, G., Remacha, M., Ballesta, J.P., 2000. Phosphorylation and N-terminal region of yeast ribosomal protein P1 mediate its degradation, which is prevented by protein P2. *EMBO J.* 19, 6075–6084.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Perlson, E., Medzihradsky, K.F., Darula, Z., Munno, D.W., Syed, N.I., Burlingame, A.L., Fainzilber, M., 2004. Differential proteomics reveals multiple components in retrogradely transported axoplasm after nerve injury. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 510–520.
- Peterson, C.L., Laniel, M.A., 2004. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14, R546–R551.
- Raghavan, N., Miller, A.N., Gardner, M., FitzGerald, P.C., Kerlavage, A.R., Johnston, D.A., Lewis, F.A., Knight, M., 2003. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 181–191.
- Richards, C.S., 1975. Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 70, 231–241.
- Richards, C.S., Shade, P.C., 1987. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 73, 1146–1151.
- Rodriguez-Gabriel, M.A., Remacha, M., Ballesta, J.P., 1998. Phosphorylation of ribosomal protein P0 is not essential for ribosome function but can affect translation. *Biochemistry* 37, 16620–16626.
- Rose, I.A., O'Connell, E.L., Mehler, A.H., 1965. Mechanism of the Aldolase Reaction. *J. Biol. Chem.* 240, 1758–1765.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Sminia, T., Barendsen, L., 1980. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails, *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncatus*. *J. Morphol.* 165, 31–39.
- Trouvé, S., Renaud, F., Durand, P., Jourdan, J., 1996. Selfing and outcrossing in a parasitic hermaphrodite helminth (Trematoda, Echinostomatidae). *Heredity* 77, 1–8.
- Vergote, D., Bouchut, A., Sautiere, P.E., Roger, E., Galinier, R., Rognon, A., Coustau, C., Salzet, M., Mitta, G., 2005. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Int. J. Parasitol.* 35, 215–224.
- Wang, J., Morris, A.J., Tolan, D.R., Pagliaro, L., 1996. The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* 271, 6861–6865.
- Yu, C.L., Tsai, C.Y., Sun, K.H., Chen, Y.S., Lin, W.M., Liao, T.S., Chen, K.H., Wang, S.R., 1992. Increased spontaneous release of cytidine deaminase by polymorphonuclear neutrophils of patients with active systemic lupus erythematosus. *Br. J. Rheumatol.* 31, 675–678.
- Zambrano, R., Briones, E., Remacha, M., Ballesta, J.P., 1997. Phosphorylation of the acidic ribosomal P proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: a reappraisal. *Biochemistry* 36, 14439–14446.

Chapitre 4

Chapitre 4

Recherche de candidats impliqués dans la compatibilité par une approche moléculaire, comparative et globale réalisée sur des mollusques susceptibles et résistants

Publication n°4

Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. (2006), *Parasitology*, 13: 1-14

Les résultats obtenus lors de l'analyse comparative des protéines plasmatiques en électrophorèse bidimensionnelle ont révélé l'implication potentielle de la glande de l'albumine de *B. glabrata* dans la synthèse de protéines potentiellement impliquées dans les mécanismes de la compatibilité. Ce travail a également soulevé la question de l'implication dans la compatibilité différentielle entre souches, de gènes exprimés dans d'autres organes et/ou tissus que les hémocytes. Nous avons donc choisi d'effectuer une analyse comparative globale des transcrits produits par l'ensemble des tissus des mollusques susceptibles et résistants à *E. caproni* en appliquant la technique d'hybridation soustractive et suppressive. L'expression différentielle qui a ainsi pu être mise en évidence pour certains gènes a été vérifiée par PCR-Quantitative.

Ce travail nous a permis, d'une part, de confirmer des résultats obtenus précédemment lors de l'analyse comparative protéomique réalisée sur le plasma. En effet, des candidats tels que des enzymes glycolytiques et plus particulièrement la Bg endo- β -1,4-mannanase 1 ont été identifiés dans les deux études. Il en est de même pour plusieurs protéines de liaison du calcium –CaBPs. Dans cette étude, ces deux catégories de protéines présentent des taux de transcrits supérieurs chez les mollusques susceptibles, résultat qui renforce les observations antérieures. D'autre part, cette approche par SSH a permis de révéler de nouveaux candidats qui ouvrent de nouvelles voies de recherche. Il s'agit de protéases, d'inhibiteurs de protéases, d'une lectine, d'une molécule similaire à l'aplysianine (protéine antimicrobienne de l'aplysie) et de protéines impliquées dans les processus d'adhérence.

Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach

A. BOUCHUT¹, C. COUSTAU², B. GOURBAL¹ and G. MITTA^{1*}

¹ Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5555, CNRS Université de Perpignan Perpignan, France

² U547, INSERM Institut Pasteur de Lille, Lille, France

(Received 31 August 2006; revised 27 September 2006; accepted 28 September 2006)

SUMMARY

In order to elucidate mechanisms underlying snail/echinostome compatibility, numerous molecular studies comparing transcripts and proteins of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni* were undertaken. These studies focused on plasma and haemocytes of the two strains and revealed that some transcripts and/or proteins were differentially expressed between strains. The aim of the present study was to develop a complementary transcriptomic approach by constructing subtractive libraries. This work revealed some candidate transcripts already identified in previous studies (calcium-binding proteins and glycolytic enzymes) as well as novel candidate transcripts that were differentially represented between strains of *B. glabrata*. Among these newly identified genes, we revealed several genes potentially involved in immune processes encoding proteases, protease inhibitors, a lectin, an aplysianin-like molecule, cell adhesion molecules.

Key words: *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma caproni*, host-parasite interactions, suppression subtractive hybridization, compatibility.

INTRODUCTION

Snail-trematode immunobiological interactions have been studied in the fresh-water snail *Biomphalaria glabrata* following infection by trematodes like the human blood fluke *Schistosoma mansoni* or echinostome species (*Echinostoma paraensei* or *Echinostoma caproni*). As compatibility polymorphism was evidenced in these different models (Richards, 1975; Richards and Shade, 1987; Lewis *et al.* 1993; Langand and Morand, 1998), numerous molecular studies comparing susceptible and resistant strains of molluscs were undertaken to elucidate the mechanisms underlying differences in compatibility. These studies revealed many transcripts or proteins that were differentially expressed between strains of *B. glabrata* susceptible or resistant to *S. mansoni* or *E. caproni* (Miller *et al.* 2001; Raghavan *et al.* 2003; Lockyer *et al.* 2004; Nowak *et al.* 2004; Vergote *et al.* 2005; Jung *et al.* 2005; Bouchut *et al.* 2006a,b).

In the *B. glabrata*/*E. caproni* system we are investigating, 2 snail strains have previously been selected for resistance or susceptibility to this parasite (Langand *et al.* 1998). *E. caproni* miracidia

are able to penetrate both susceptible and resistant snails. While the parasite undergoes normal development in susceptible snails, it is encapsulated and eliminated in resistant snails. Susceptibility/resistance of *B. glabrata* to *E. caproni* is inherited in a multigenic fashion (Langand and Morand, 1998) and has been shown to rely on both cellular and humoral factors (Ataev and Coustau, 1999). Regarding humoral factors, Calcium-binding proteins and glycolytic enzymes differentially represented in the plasma of susceptible and resistant snails were identified using a comparative proteomic approach (Vergote *et al.* 2005). This study also showed that the genes encoding these plasmatic proteins are mainly expressed in the albumen gland, raising the question of the potential involvement of this organ in mechanisms underlying susceptibility/resistance to *E. caproni*. Regarding cellular factors, previous studies showed that excretory-secretory (ES) products from *in vitro* transformed *E. caproni* sporocysts inhibited key defence functions of susceptible host hemocytes such as adhesion and phagocytosis (Lie, 1982; Humbert and Coustau, 2001). Interestingly, haemocytes from resistant snails remained unaffected by these parasite ES products, suggesting that they exhibit constitutive differences with susceptible snails hemocytes (Humbert and Coustau, 2001). In order to investigate the molecular basis of these differences, we developed comparative molecular approaches on haemocytes of the two strains. A global

* Corresponding author: Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5555, CNRS Université de Perpignan, 52 Ave Paul Alduy, 66 860 Perpignan cedex, France. Tel: +33 (0) 4 68 66 21 85. Fax: +33 (0) 4 68 66 22 81. E-mail: mitta@univ-perp.fr

proteomic approach on this cell type allowed the identification of several proteins that were differentially represented in haemocytes from the susceptible and resistant snails (Bouchut *et al.* 2006b). Another study, focusing on genes involved in adhesion processes confirmed the potential importance of several candidate genes like dermatopontins and matrilin-like molecules (Bouchut *et al.* 2006a). This transcriptomic approach also revealed several genes that were differentially expressed in whole bodies of *E. caproni*-susceptible and -resistant *B. glabrata*.

These different approaches taken together allowed identification of several candidate genes and suggested a potential involvement of tissues other than haemocytes in susceptibility/resistance processes. In order to investigate this latter point, we compared in the present work the transcripts of the two snail strains at the whole body level using a Suppression Subtractive Hybridization (SSH) approach. Herein, we describe 3 main categories of ESTs: those directly related to immune function, ESTs related to calcium homeostasis and ESTs encoding glycolytic enzymes. Quantitative analyses of transcript levels confirmed their differential expression and the validity of this SSH approach.

MATERIALS AND METHODS

Biomphalaria glabrata strains

Biomphalaria glabrata snails used in this study belonged to the EAF-S or CB-R strains selected, respectively, for their susceptibility or resistance to *E. caproni* (Langand *et al.* 1998; Humbert and Coustau, 2001). The selection was performed from the polymorphic Bg.Bra strain (Langand *et al.* 1998). At the time of the study, the percentages of adult snails susceptible to *E. caproni* were: Bg.Bra = 70%, EAF-S = 98% and CB-R = 1%.

RNA isolation and subtractive cDNA library construction

Total RNA from whole body of unexposed (to *E. caproni*) EAF-S and CB-R snails was extracted according to previously described procedures (Guillou *et al.* 2004). The total RNAs from 10 individuals were pooled for each strain. For subtractive library construction, poly(A)⁺ RNA were purified using NucleoTrap mRNA purification kit (Clontech). Two forward and reverse libraries were constructed by subtracting mRNA from EAF-S and CB-R strains (tester) with mRNA from CB-R and EAF-S strains (driver), respectively. SSH libraries were produced using the PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech). Tester and driver cDNA were prepared using 2 µg of poly(A)⁺ RNA. Enzyme digestion, adapter ligation, hybridization, and PCR

amplification were performed according to protocols provided by the manufacturer (Clontech). PCR products were cloned into pCR4-TOPO cloning vector using TOPO TA cloning kit (Invitrogen) and transformed into One Shot TOP10 chemically competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen). The 2 libraries obtained were named EAF-S and CB-R libraries and contained transcripts potentially over-represented in the 2 corresponding strains respectively.

A total of 256 EAF-S library clones and 257 CB-R library clones were randomly selected and single-pass sequenced using a dideoxy-dye-terminator method (CEQTM DTCS-Quick Start kit, Beckman Coulter) and a CEQTM 8000 apparatus (Beckman Coulter). Vector and adaptor sequences were trimmed from all sequences using SequencherTM software (Gene Codes Corporation). All sequences were then examined for possible sequencing errors. High quality ESTs, longer than 150 bp, in length, were assembled in clusters (SequencherTM software). Consensus sequences from clusters or unique sequences from singletons were submitted to database searches using BLASTX and BLASTN programs (<http://blast.genome.jp/> or <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Specific domain searches were performed using the RPS-BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). EST sequences have been submitted to the dbEST databases (GenBank Accession nos. from EE049524 to EE049639 for the EAF-S library and from EE049640 to EE049693 for the CB-R library).

Real-Time PCR (Q-PCR)

Considering their similarities and their putative interest in our system, genes encoding proteins like CaBP, carbohydrate hydrolytic enzyme genes belonging to immunity class, cytoskeleton structure, cell adhesion, transport, cholesterol homeostasis and transcription regulation were selected for quantitative analysis of their transcripts. Real-Time RT-PCR analysis was performed on total RNAs extracted from EAF-S and CB-R snails. Reverse transcription was performed according to previously described procedures (Guillou *et al.* 2004). Specific primers for Q-PCR were edited using the LightCycler Probe Design Software version 1.0 (Roche Diagnostics) (Table 1). PCR reactions were set up according to the LightCycler Manual (Roche Diagnostics). The following LightCycler run protocol was used: denaturation programme (95 °C, 10 min), amplification and quantification programmes repeated 40 times (95 °C for 15 s, 60 °C for 5 s, 72 °C for 16 s), melting curve programme (60–95 °C with a heating rate of 0.1 °C per second and continuous fluorescence measurement), and a cooling step to 40 °C. Amplification of single highly specific products was verified (melting curve analysis). For each reaction, the

Table 1. Primers sequence used for Q-PCR

Cluster name	Forward	Reverse
1 EAF-S	ATCGAGATGATGACAGGC	CTGTAGTCGTTATTGGTAGTG
2 EAF-S	CATCCTTACATCTGGGCA	TCAATAGGCGAACTTAAAGTC
3 EAF-S	AGAGAACGCCTATGCT	CCCGGTGGTTGAGAAA
5 EAF-S	GAAGAATTTGGCGGGAG	ATGGTCCAGTCATCGT
7 EAF-S	ACATAGAGCTGTTTCAAGACT	CGTGATGAAGCTCGGC
8 EAF-S	AGCATTTAGCACTAAGCAG	CGAAAGTTTTCTTGGAAGAG
9 EAF-S	CCTGCCTCACCCCTTAC	GGATAAATGCCGTCTGG
12 EAF-S	ATTCGCTGTTTCCTGAGA	GGTTTCATTGTTGCGTCC
13 EAF-S	ACACAGACTTCAGGAGC	CAAGTGATCTGCCAAGGA
14 EAF-S	TAGACACCCATCACGC	GAATGCCAGTCAGATCGTA
15 EAF-S	TTAGTGGACAAGGATCTCAAC	AGAATATGGTCGCCGT
16 EAF-S	GACGGTGATGTGACCA	AGCTTCCCAGTTGTATCT
17 EAF-S	AAGGTGTGATGCCAGA	CCCAAGAGCCGTGTTT
18 EAF-S	CACCAGTGTGTGGTTAT	CCCCTATTTCACAGAGGTT
19 EAF-S	TAGGGCCAAACATGCAAG	GTAGACGTATAGGCAGACT
21 EAF-S	GCACTCAGCAGGAGACTAT	GACCATTCCAATTGTAATTTTG
23 EAF-S	CTGACCAGGTATGTCCG	GTCATCCAGCTCTAGGTT
24 EAF-S	ACAGAGGCTCATGTGG	CATAGCCGTGAGAGTTG
28 EAF-S	CACATCTCTGGGCAAC	ATGCAAACCAGCCAGA
29 EAF-S	GTCTACTACTACGGTGATAAG	GTGAGGCTGTTGAAGTC
30 EAF-S	ATGACCTCTCCAAATGTG	GGGTGAAGGGTAGGAC
31 EAF-S	ACATTTGAAGGACGCTG	TTGGGAGGTAAACAAGGAA
32 EAF-S	CAATTTTCACGAATACATCTTGC	CTCTGTGAACACGTTGC
42 EAF-S	TGGTGTCCGTCAGTCT	GGTGACCGTCTATGCT
43 EAF-S	CATGGAGAGAGGGCTG	CTTGAAGTATCCGCTATT
1 CB-R	AATCGGGAGAATACGTGA	CAATGATGGTGTCCAGTAAT
2 CB-R	ACAAGAGAAGTTGATAACGC	CGTGATCTAATGTTTCTGGC
3 CB-R	ATATCCTCCCTCAAGTCAC	TGAATGACGAGCAGAGTTA
4 CB-R	CATCGTTGACCATCCTTTT	ACATCATTTTCATCATGTCAAGA
5 CB-R	TTACATCGCTGGCACC	GCACTGTCAGCTTATCAC
6 CB-R	TTGCTATGACACCGGC	TTAGGATGAAATGGAGGACT
10 CB-R	ATGGAAGACGCCATTG	ACCGAAGCAGTTGAAGA

crossing point (CP) was determined using the 'Fit Point Method' of the LightCycler Software 3.3 (Roche Diagnostics). Three independent PCR reactions were performed in duplicate and the mean values of the CPs were calculated. For each mRNA to be analysed, the absence of contaminating genomic DNA was verified by running a no-RT control using primers for the ribosomal protein S19 (S19, Accession number CK988928).

Amplification efficiencies (E) of each PCR product were determined according to previously described procedures (Guillou *et al.* 2004). For each sample, the level of transcription of the target gene (Tg) was compared to the transcription of the ribosomal protein S19. The transcription ratio (R) was calculated according to the formula:

$$R = (E_{Tg})^{CPTg} / (E_{S19})^{CPS19}$$

Statistical significance was assessed using the Mann-Whitney U-test for non-paired series and the Wilcoxon test for paired series. *P* values < 0.05 were considered as significant. All tests were performed using STATVIEW v. 4.5 statistic software package.

RESULTS

EST Sequencing and general characteristics of EAF-S and CB-R libraries

In total 256 EAF-S library clones and 257 CB-R library clones were sequenced. Using the CEQTM 8000 sequence analysis software, 227 and 235 cDNA high quality sequences were obtained as one-path reads from the 2 libraries respectively (Table 2). ESTs were aligned and assembled in clusters using the SequencherTM software. For the EAF-S library, ESTs coalesced into 41 contigs and 84 singletons, suggesting that the overall redundancy of the library was 63.4%. For the CB-R library, ESTs coalesced into 20 contigs and 47 singletons for an overall redundancy of 80% (Table 2).

All clusters, consensus sequences from contigs or unique sequences from singletons, were submitted to database searches using BLASTX and BLASTN programs (<http://blast.genome.jp/> or <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Clusters corresponding to contaminant sequences – vector, repeated DNA, rRNA, xenocontaminants (sequences from foreign genome) – were removed from the analysis. In order to minimize redundancy in the EST database,

Table 2. General characteristics of *Biomphalaria glabrata* EAF-S and CB-R SSH libraries

	EAF-S Lib	CB-R Lib
Total number of cDNA sequenced	256	257
Total number of cDNA analysed	227	235
Average insert size ^a	650 bp	560 bp
Average EST length ^b	370 bp	450 bp
EST contigs	41	20
Singletons	84	47
Redundancy ^c	63.4%	80%

^a The average insert size was calculated from 36 randomly selected cDNA clones after insert digestion.

^b The average EST length was calculated from 100 randomly selected cDNA ESTs.

^c Redundancy = number of ESTs assembled in clusters/total EST.

sequences displaying 100% identity were submitted as a single sequence. ESTs aligning in a same contig but displaying differences in their nucleotidic sequence were submitted individually in the database. A total of 116 and 54 ESTs were submitted to the dbEST section of the NCBI/GenBank database for the EAF-S and CB-R libraries, respectively (Accession numbers from EE049524 to EE049639 and from EE049640 to EE049693).

Exclusion of false-positive and functional groups of ESTs from the two libraries

As a first approach to exclude false-positives, previously selected clusters of the 2 libraries were aligned and compared using the Sequencher™ software. All sequences common to the 2 libraries were eliminated from the analysis.

Selected ESTs were subjected to BLASTN and BLASTX search. Sequence similarities were considered to be significant when the expected value was less than 10^{-2} . Comparison of the ESTs against non-redundant protein and nucleic databases revealed that 38.8% of EAF-S and 26.3% of CB-R clusters did not align significantly with known genes, 16.5% of EAF-S and 29% of CB-R significantly aligned with genes of unknown function, and the remaining 44.7% clusters (for both strains) were significantly similar to genes of known function (Fig. 1). All clusters corresponding to this last category were assigned functions as predicted from sequence similarity and subsequently classified into distinct functional classes. ESTs from EAF-S library were assigned to six major classes (Fig. 2A): (1) immunity, (2) calcium homeostasis, (3) cell structure, shape and mobility, (4) energy metabolism and hydrolytic enzymes, (5) protein biosynthesis, (6) nucleic acid biosynthesis and metabolism. ESTs

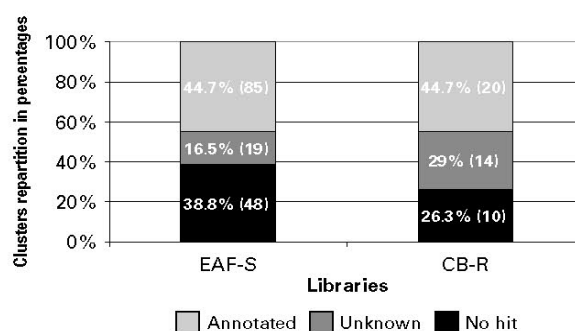


Fig. 1. Cluster distribution of the EAF-S and CB-R libraries after BLASTN and BLASTX analysis. 'Annotated' clusters are clusters displaying similarities for genes of known function. 'Unknown' clusters display similarities for sequences present in the dbEST database of Genbank showing no similarities for genes of known function. The last group 'No hit' corresponds to clusters displaying no homology for any sequences present in any non-redundant databases. The percentage represents the number of clusters for each category. The number given in parentheses is the total number of sequences for each category.

from CB-R library were grouped into 4 classes (Fig. 2B): (1) immunity, (2) energy metabolism and hydrolytic enzymes, (3) protein biosynthesis and (4) nucleic acid biosynthesis and metabolism.

ESTs of interest and selection of ESTs which transcripts are differentially represented between strains

Among the genes identified, several functional groups are of particular interest. Some of these genes encoding proteins like CaBP or carbohydrate hydrolytic enzymes (Table 3) were identified in a previous proteomic study (Vergote *et al.* 2005), therefore supporting the potential importance of their corresponding functional groups. Indeed, the same genes (cluster number 21 and 22, Table 3) and novel genes of the same families (cluster 14, 15, 16 and 23, 24, 25, 26, Table 3) were identified in the present transcriptomic study. In addition, we identified here novel genes belonging to other functional groups of potential interest in our system (genes belonging to immunity class, cytoskeleton structure, cell adhesion, transport, cholesterol homeostasis and transcription regulation). All the genes corresponding to these different functional groups were selected for further analysis. Genes involved in protein and nucleic acid biosynthesis were arbitrarily excluded from the analyses.

In order to assess the relative expression of selected genes and to confirm their differential expression between strains, quantitative RT-PCR experiments were carried out on total RNA extracted from EAF-S and CB-R snails (Figs 3 and 4). The transcripts

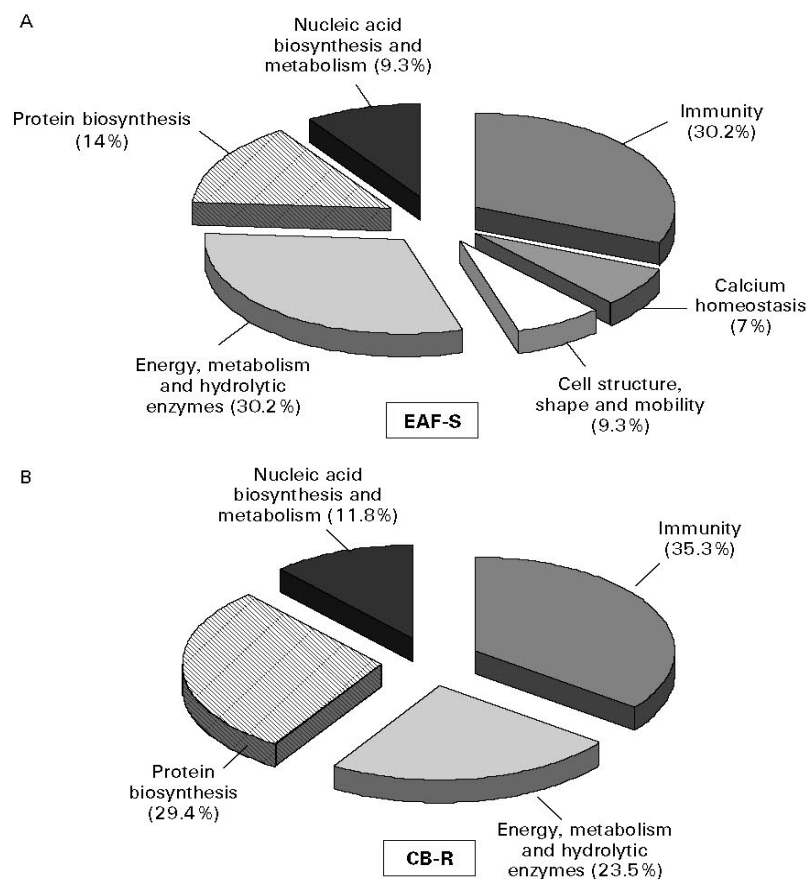


Fig. 2. Distribution of the annotated clusters from the EAF-S (A) and CB-R (B) libraries into functional classes. The percentages of clusters for each class are given in parentheses.

corresponding to cluster numbers 4, 6, 10, 11, 20, 22, 25–27, 33, 40 and 41 of the EAF-S library were not detected, nor the cluster numbers 7–9 of the CB-R library. These results show that the SSH approach was successful. Indeed, 80% of the transcripts corresponding to EAF-S clusters display a higher concentration in EAF-S strain as compared to the CB-R strain and the relative expression ratio is greater than 2.5-fold for 60% of them (Fig. 3). For the CB-R library, 100% of the clusters are over-expressed in the CB-R strain and 70% of them displayed a relative expression ratio greater than 2.5 fold (Fig. 4). All these differences are statistically significant ($P < 0.05$).

The EAF-S clusters displaying the more significant differences (transcript concentration 2.5-fold higher in EAF-S snail, Fig. 3) correspond to (i) proteases (cluster 3 and 5) and cell adhesion molecules (cluster 9 and 12), both included in the immunity class, (ii) CaBPs (cluster 14–16), (iii) carbohydrate hydrolytic enzymes like mannanases (cluster 21 and 23) and a glucanase (cluster 24), (iv) transport proteins (cluster 28 and 29) and (v) proteins involved in cholesterol homeostasis (cluster 30–32).

Regarding the CB-R library, the clusters displaying the most significant differences (transcript concentration 2.5 fold higher in CB-R snail, Fig. 4) correspond to putative proteins all belonging to the immunity class: an antimicrobial protein (Bg Aplysianin-A like, cluster 1), a protease (Bg coagulation factor V like, cluster 2), protease inhibitors (Bg serpin like 3 and Bg serpin like 3, cluster 3 and 4, respectively) and a pattern recognition receptor (Bg C-type lectin like, cluster 5).

In order to further investigate the putative function of these different clusters of interest, similarities were analysed in conjunction with conserved deduced domains in the corresponding proteins (Tables 3 and 4 for EAF-S and CB-R, respectively). For example, cluster 3 (Table 3) displays similarities for the cathepsin L of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* and the domain corresponding to this class of protease (peptidase C1A subfamily) was detected in the deduced amino acid sequence of this cluster. Consequently, the cluster 3 was named Bg cathepsin L-like. Another example of interest, cluster 5 (Table 4) displays similarities for the lectin 1 of the planaria *Girardia tigrina* (Shagin *et al.* 2002).

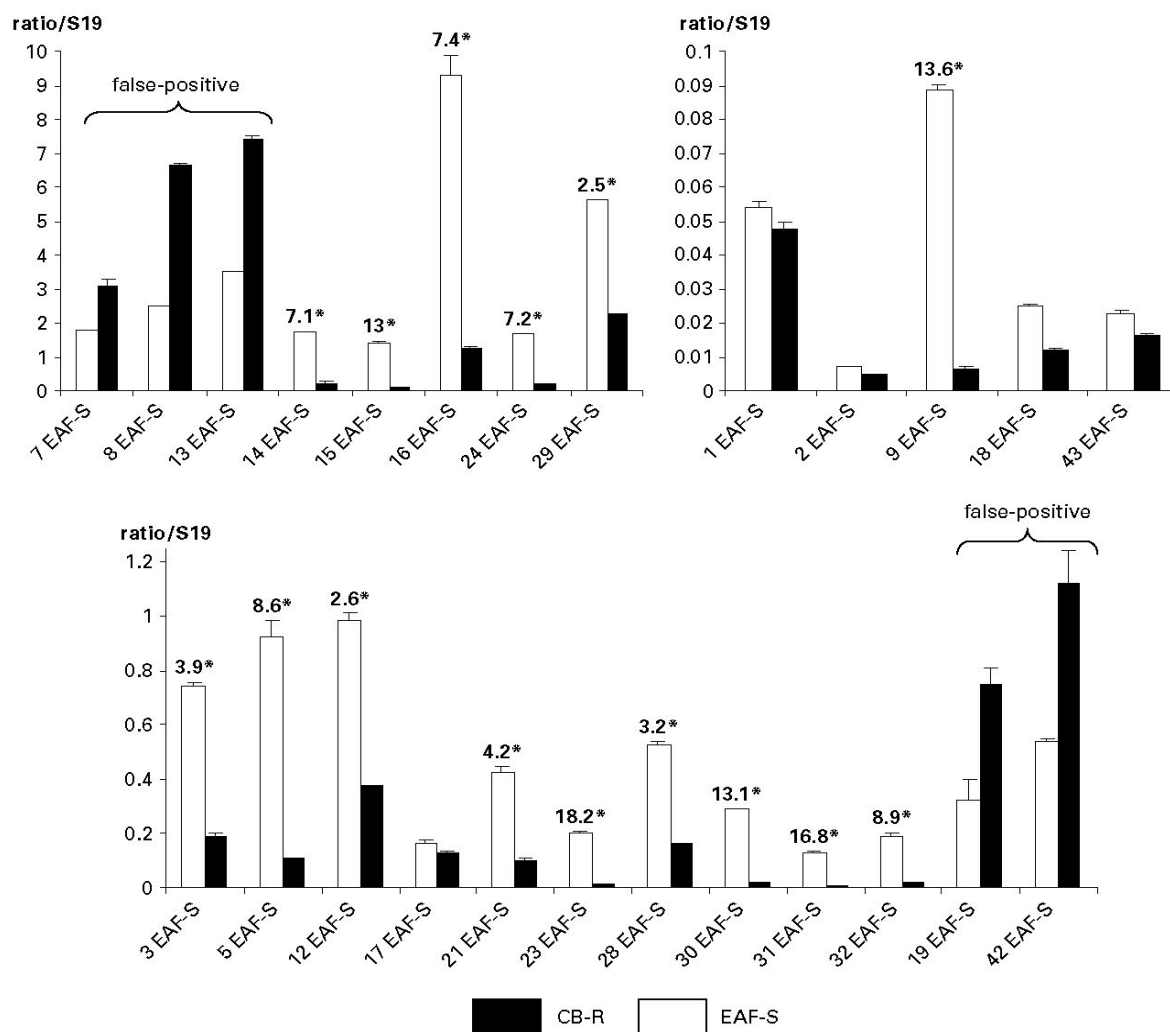
Table 3. Genes identified from the EAF-S library

Class	Functional group	Cluster #	Accession no. in dbEST	Name	Annotated BLASTX similarity (accession #, E-value) ^a	RPS-BLAST detected domain (E-value) ^b
Immunity	Cellular defence effector	1	EE049557	Bg g-type lysozyme like	g-type lysozyme (AAX09979, <i>A. irradians</i> , 4e-20)	GEWL, Goose Egg White Lysozyme domain, gnl CDD 29563 (6e-22)
		2	EE049531	Bg serine proteinase like	serine proteinase (CAA89967, <i>A. gambiae</i> , 6e-13)	Trypsin-like serine protease, gnl CDD 29152 (1e-18)
	Protease	3	EE049537	Bg cathepsin L like	similar to Cathepsin L precursor (XP_780713, <i>S. purpuratus</i> , 9e-63)	Peptidase C1A subfamily, gnl CDD 30292 (7e-29)
		4	EE049626	Bg serine protease alpha like	serine protease alpha (AAG40233, <i>B. glabrata</i> , 5e-16)	ND
		5	EE049544	Bg serine protease beta like 1	serine protease beta (AAG40234, <i>B. glabrata</i> , 6e-48)	Trypsin-like serine protease, gnl CDD 29152 (6e-13)
		6	EE049545	Bg serine protease beta like 2	serine protease beta (AAG40234, <i>B. glabrata</i> , 2e-30)	Trypsin-like serine protease, gnl CDD 29152 (5e-20)
		7	EE049561	Bg serpin like 1	serine proteinase inhibitor (AAM05994, <i>M. acetivorans</i> , 5e-08)	SERPIN, SERine Proteinase INhibitors (serpins), gnl CDD 29117 (3e-13)
		8	EE049549	Bg serpin like 2	probable serine protease inhibitor (NP_924916, <i>G. violaceus</i> PCC7421, 4e-08)	SERPIN, SERine Proteinase INhibitors (serpins), gnl CDD 29117 (1e-13)
	Cell adhesion	9	EE049526	Bg DEC-1 like	DEC-1 (BAD16597, <i>L. stagnalis</i> , 3e-13)	Chitin-binding domain type 2, gnl CDD 24293 (3e-05)
		10	EE049566	Bg dermatopontin like 1	Dermatopontin 2 (BAD97854, <i>B. glabrata</i> , 2e-12)	ND
		11	EE049554	Bg salivary proline rich protein like	salivary proline-rich protein precursor (AAA60189, <i>H. sapiens</i> , 2e-07)	ND
		12	EE049565	Bg ependymin like protein	ependymin related protein 2 (NP_001007626, <i>R. norvegicus</i> , 2e-05)	ND
	Superoxide metabolism	13	EE049528	Bg Cu/Zn SOD like	Superoxide dismutase (XP_996209, <i>M. Musculus</i> , 3e-24)	Copper/zinc superoxide dismutase (SODC), gnl CDD 40181 (4e-32)
Calcium homeostasis	Ca ²⁺ binding protein	14	EE049534	Bg calcium binding protein 3	calcium binding protein 1 (AV91525, <i>B. glabrata</i> , 1e-16)	ND
		15	EE049535	Bg calcium binding protein 4	calcium binding protein 2 (AV91522, <i>B. glabrata</i> , 1e-03)	ND
		16	EE049539	Bg DEC-3 like	DEC-3 protein (BAD16599, <i>L. stagnalis</i> , 7e-36)	EF-hand, calcium binding motif, gnl CDD 28933 (4e-04)
Cell structure, shape and mobility	Cytoskeleton	17	EE049533	Bg actin like	cytoskeletal actin 2 (AAC28359, <i>M. occulta</i> , 4e-75)	Actin, gnl CDD 28896 (1e-61)
		18	EE049555	Bg actin-interacting protein 1 like	actin-interacting protein 1 (Q11176, <i>C. elegans</i> , 1e-11)	WD40 domain, gnl CDD 29257 (4e-04)
		19	EE049548	Bg alpha 2-tubulin like	alpha 2-tubulin (AAS55708, <i>L. striatellus</i> , 3e-50)	alpha_tubulin, gnl CDD 30217 (2e-55)
	Cell adhesion	20	EE049553	Bg collagen like	COL11A2 (BAD93256, <i>O. latipes</i> , 6e-05)	ND
Energy, metabolism and hydrolytic enzymes	Carbohydrate metabolism	21	EE049529	Bg endo-1,4-beta-mannanase 1	endo-1,4-beta-mannanase 1 (AAV91523, <i>B. glabrata</i> , 7e-70)	ND
		22	EE049530	Bg endo-1,4-beta-mannanase 1	endo-1,4-beta-mannanase 1 (AAV91523, <i>B. glabrata</i> , 1e-61)	ND

Protein biosynthesis	Transport	23	EE049558	Bg endo-1,4-beta-mannanase 3	endo-1,4-beta-mannanase 2 (AAV91524, <i>B. glabrata</i> , 5e-28)	ND
		24	EE049550	Bg endo-1,4-beta-D-glucanase like 1	endo-1,4-beta-D-glucanase (CAC59695, <i>M. edulis</i> , 1e-43)	ND
		25	EE049552	Bg endo-beta-1,4-glucanase like	putative endo-beta-1,4-glucanase (BAD12006, <i>N. koshunensis</i> , 1e-09)	Glycosyl hydrolase family 9, gnl CDD 40839 (1e-09)
		26	EE049551	Bg cellulase like	cellulase (BAC67186, <i>H. discus</i> , 1e-08)	ND
		27	EE049547	Bg hemoglobin like	hemoglobin (CAI26300, <i>B. glabrata</i> , 5e-06)	ND
		28	EE049546	Bg hemoglobin	hemoglobin (CAH23232, <i>B. glabrata</i> , 8e-45)	Globins gnl CDD 29979 (3e-10)
		29	EE049542	Bg Fatty acid binding protein like	Fatty acid-binding protein, liver (P81653, <i>H. bivius</i> , 9e-06)	ND
	Cholesterol homeostasis	30	EE049540	Bg phosphoribosyl-formylglycinamide synthase like	similar to phosphoribosyl-formylglycinamide synthase (XP_966891, <i>T. castaneum</i> , 8e-19)	Low Density Lipoprotein Receptor Class A domain, gnl CDD 29012 (2e-05)
		31	EE049541	Bg Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B precursor like	similar to Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B precursor (XP_422146, <i>G. gallus</i> , 9e-23)	Low Density Lipoprotein Receptor Class A domain, gnl CDD 29012 (9e-06)
		32	EE049559	Bg proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 like	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, (Q80W65, AAH38085, <i>M. musculus</i> , 1e-03)	ND
	Mitochondrial protein	33	EE049527	Bg mitochondrial protein 18 kDa like	mitochondrial protein 18 kDa isoform a (XP_781554, <i>S. purpuratus</i> , 1e-03)	ND
	Ribosomal protein	34	EE049556	Bg ribosomal protein L21 like	ribosomal protein L21 (AAN05604, <i>A. irradians</i> , 3e-53)	Ribosomal protein L21e, gnl CDD 1707 (3e-26)
		35	EE049595	Bg 40S ribosomal protein S2 like	similar to ribosomal protein S2, partial (XP_795432, <i>S. Purpuratus</i> , 8e-51)	Ribosomal protein S5, gnl CDD 9973 (2e-23)
		36	EE049584	Bg ribosomal protein L7 like	Ribosomal protein L7a (AAH59533, <i>D. rerio</i> , 1e-57)	ND
		37	EE049617	Bg ribosomal protein S2 like	ribosomal protein S20 (AAM28852, <i>B. belcheri tsingtaunese</i> , 8e-32)	Ribosomal protein S10p/S20e, gnl CDD 40433 (3e-17)
		38	EE049623	Bg ribosomal protein L11 like 1	ribosomal protein L11 (CAD91442, <i>C. gigas</i> , 6e-08)	ND
		39	EE049625	Bg ribosomal protein L37A like 1	60S ribosomal protein L37A (AAK52799, <i>B. belcheri</i> , 2e-05)	Ribosomal L37ae protein family, gnl CDD 41808 (1e-03)
		40	EE049562	Bg deoxyribonuclease like	deoxyribonuclease I (BAD83646, <i>P. major</i> , 5e-06)	DNaseIc, deoxyribonuclease I, gnl CDD 47782 (3e-09)
Nucleic acid biosynthesis and metabolism	Endonuclease	40	EE049562	Bg deoxyribonuclease like	deoxyribonuclease I (BAD83646, <i>P. major</i> , 5e-06)	DNaseIc, deoxyribonuclease I, gnl CDD 47782 (3e-09)
	Reverse transcriptase	41	EE049564	Bg reverse transcriptase like	similar to reverse transcriptase family member (XS300) (XP_799214, <i>S. purpuratus</i> , 44e-02)	ND
	Transcription factor	42	EE049524	Bg Myc homolog like 1	Myc homolog (AAB34577, <i>C. virginica</i> , 4e-03)	ND
		43	EE049525	Bg Myc homolog like 2	Myc homolog (AAB34577, <i>C. virginica</i> , 5e-06)	ND

^a = The E-value is the probability due to chance, that there is another alignment with a similarity greater than the given one, obtained with BLASTX.

^b = The E-value is the probability due to chance, that there is another alignment with a similarity greater than the given one, obtained with RPS-BLAST.

**Candidate Genes:**

- | | |
|---|---|
| 1 EAF-S: Bg g-type lysozyme like | 18 EAF-S: Bg actin-interacting protein 1 like |
| 2 EAF-S: Bg serine proteinase like | 19 EAF-S: Bg alpha 2-tubulin like |
| 3 EAF-S: Bg cathepsin L like | 21 EAF-S: Bg endo-1,4-beta-mannanase 1 |
| 5 EAF-S: Bg serine protease beta like 1 | 23 EAF-S: Bg endo-1,4-beta-mannanase 3 |
| 7 EAF-S: Bg serpin like 1 | 24 EAF-S: Bg endo-1,4-beta-D-glucanase like 1 |
| 8 EAF-S: Bg serpin like 2 | 28 EAF-S: Bg hemoglobin |
| 9 EAF-S: Bg DEC-1 like | 29 EAF-S: Bg Fatty acid binding protein like |
| 12 EAF-S: Bg ependymin like protein | 30 EAF-S: Bg phosphoribosylformylglycinamide synthase like |
| 13 EAF-S: Bg Cu/Zn SOD like | 31 EAF-S: Bg Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B precursor like |
| 14 EAF-S: Bg calcium binding protein 3 | 32 EAF-S: Bg proprotein convertase/kexin type 9 like |
| 15 EAF-S: Bg calcium binding protein 4 | 42 EAF-S: Bg Myc homolog like 1 |
| 16 EAF-S: Bg DEC-3 like | 43 EAF-S: Bg Myc homolog like 2 |
| 17 EAF-S: Bg actin like | |

Fig. 3. Transcript ratios corresponding to selected clusters of the EAF-S library in whole body susceptible EAF-S snails (light boxes) and resistant CB-R snails (dark boxes). Ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relatively to S19 expression levels (ratio/S19). Each histogram is the average value ($\pm$ s.d.) of 3 independent experiments each performed in duplicate. Differential transcription levels between strains are indicated above the histograms. Since transcription levels can differ by up to 2 orders of magnitude, 3 different graphs were used for sake of clarity. *Genes showing differences in transcript levels that were significant ($P < 0.05$) and higher than 2.5-fold.

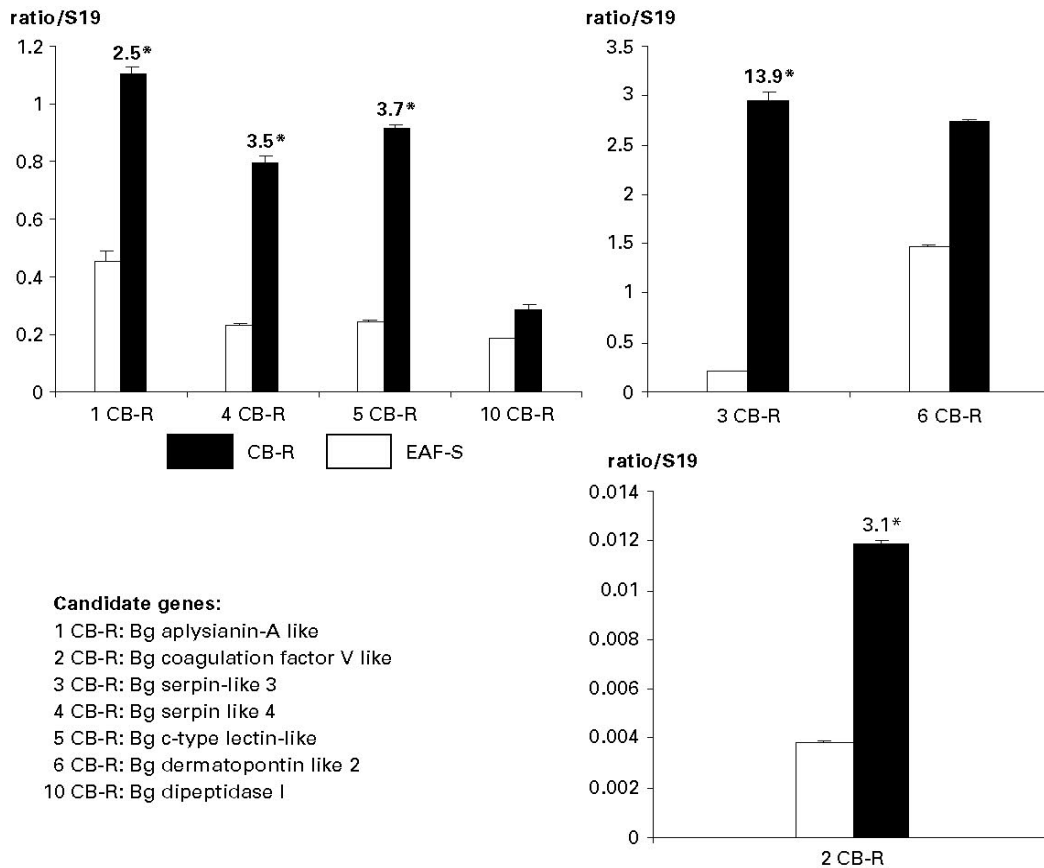


Fig. 4. Transcript ratios corresponding to selected clusters of the CB-R library in whole body susceptible EAF-S snails (light boxes) and resistant CB-R snails (dark boxes). Ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relatively to S19 expression levels (ratio/S19). Each histogram is the average value ($\pm$ s.d.) of 3 independent experiments each performed in duplicate. Differential levels of the transcripts between strains are indicated above the histograms. Since transcription levels can differ by up to 2 orders of magnitude, 3 different graphs were used for sake of clarity. *Genes showing differences in transcript levels that were significant ($P < 0.05$) and higher than 2.5-fold.

The deduced amino acid sequence from this cluster presents a C-type lectin domain. This protein was called Bg C-type lectin like. An extensive analysis of the deduced amino acid sequence also revealed 2 groups of 3 residues which are known to be involved in calcium binding and carbohydrate binding. One of these groups of residues (EPN) suggests that the molecule identified in this study could be a mannose-binding lectin. The same procedure was applied to all the clusters.

DISCUSSION

In order to investigate the molecular basis of susceptibility/resistance in the *B. glabrata*/*E. caproni* model, several molecular approaches were undertaken to compare susceptible and resistant snail strains (Vergote *et al.* 2005; Bouchut *et al.* 2006a,b). These studies focused principally on haemocytes and humoral factors which have been shown to

play key roles in the susceptibility/resistance process (Ataev and Coustau, 1999). Regarding humoral factors, the proteomic approach revealed several proteins differentially represented in the plasma of susceptible and resistant snails (Vergote *et al.* 2005). They corresponded to 2 isoforms of a glycolytic enzyme (endo-1,4- β -mannanase 1 and -2), 2 isoforms of a calcium-binding protein (Bg CaBP-1 and -2) and an inhibitor of cysteine protease (Bg type-2 cystatin). All these proteins are expressed in the albumen gland (Vergote *et al.* 2005). Regarding haemocytes, we developed 2 molecular approaches based on the comparison of transcript and protein expression in haemocytes of both strains. The first transcriptomic approach focused on genes involved in adhesion processes and revealed 4 transcripts which were differentially represented between haemocytes from resistant and susceptible snails (Bouchut *et al.* 2006a). These genes encode 2 dermatopontin-like proteins, a matrilin-like and a cadherin-like protein.

Table 4. Genes identified from the CB-R library

Class	Functional group	Cluster no.	Accession no. in dbEST	Name	Annotated BLASTX similarity (accession #, E-value) ^a	RPS-BLAST detected domain (E-value) ^b
Immunity	Cellular defence effector	1	EE049642	Bg aplysianin-A like	Aplysianin-A precursor (Q17043, <i>A. kurodai</i> , 4e-07)	ND
	Protease	2	EE049646	Bg coagulation factor V like	similar to coagulation factor V (XP_224967, <i>R. norvegicus</i> , 4e-18)	ND
	Protease inhibitor	3	EE049644	Bg serpin-like 3	Serpin (serine protease inhibitor) (AAX95869, <i>O. sativa</i> (japonica cultivar-group), 5e-04)	SERPIN, SERine Proteinase INhibitors (serpins), gnl CDD 29117 (3e-06)
		4	EE049641	Bg serpin like 4	serpin-2 (BAD11156, <i>H. longicornis</i> , 0-12)	SERPIN, SERine Proteinase INhibitors (serpins), gnl CDD 29117 (1e-05)
	Pattern Recognition Receptor	5	EE049640	Bg c-type lectin-like	lectin 1 (AAL29940, <i>G. tigrina</i> , 6e-05)	C-type lectin (CTL) and CTL-like domains, gnl CDD 28919 (6e-04)
	Cell Adhesion	6	EE049651	Bg dermatopontin like 2	dermatopontin 2 (AAZ80786, <i>B. glabrata</i> , 5e-20)	ND
Energy, metabolism and hydrolytic enzymes	ATP biosynthesis	7	EE049643	Bg F1-ATP synthase subunit B like	F1-ATP synthase, beta subunit (CAI07821, <i>Azoarcus sp.</i> , 8e-14)	AtpD, F0F1-type ATP synthase, beta subunit [Energy production and conversion] gnl CDD 30404 (2e-17)
		8	EE049692	Bg cytochrome b	cytochrome b (AAQ74246, <i>B. glabrata</i> , 5e-48)	Cytochrome b, gnl CDD 29371 (7e-11)
		9	EE049687	Bg cytochrome c oxidase subunit III	cytochrome c oxidase subunit III (AAQ74252, <i>B. glabrata</i> , 2e-20)	Cyt_c_Oxidase_III, Cytochrome c oxidase subunit III, gnl CDD 29485 (3e-14)
	Protease	10	EE049650	Bg dipeptidase I	Renal dipeptidase (RDP) isoform 1 (XP_780043, <i>S. Purpuratus</i> , 2e-41)	Renal dipeptidase (rDP), gnl CDD 30044 (3e-47)
Protein biosynthesis	Ribosomal protein	11	EE049684	Bg ribosomal proteine S30 like	ribosomal protein S30 (BAE16016, <i>C. gigas</i> , 5e-16)	Ribosomal protein S30, gnl CDD 44665 (4e-05)
		12	EE049686	Bg 40S ribosomal proteine S6 like 1	ribosomal protein S6 (AAG60623, <i>A. californica</i> , 6e-26)	ND
		13	EE049688	Bg 40S ribosomal proteine S6 like 2	40S ribosomal protein S6 (AAK95188, <i>I. punctatus</i> , 4e-35)	Ribosomal protein S6e, gnl CDD 41158 (5e-30)
		14	EE049690	Bg ribosomal proteine L11 like	similar to ribosomal protein L11 (XP_797802, <i>S. purpuratus</i> , 2e-21)	Ribosomal L5P family, gnl CDD 40755 (3e-09)
		15	EE049693	Bg ribosomal proteine L37A	Ribosomal protein L37A CG5827-PB, isoform B (NP_723060, <i>D. melanogaster</i> , 3e-33)	Ribosomal L37ae protein family, gnl CDD 41808 (2e-23)
Nucleic acid biosynthesis and metabolism	Endonuclease	16	EE049648	Bg endonuclease G like	endonuclease G (NP_787017, <i>B. taurus</i> , 8e-19)	NUC, DNA/RNA non-specific endonuclease, gnl CDD 28975 (2e-17)
		17	EE049647	Bg endonuclease G2-like	Endonuclease G (NP_787017, <i>B. Taurus</i> , 1e-11)	NUC, DNA/ RNA non-specific endonuclease, gnl CDD 28975 (1e-03)

^a = The E-value is the probability due to chance, that there is another alignment with a similarity greater than the given one, obtained with BLASTX.^b = The E-value is the probability due to chance, that there is another alignment with a similarity greater than the given one, obtained with RPS-BLAST.

The same study (Bouchut *et al.* 2006a) also revealed different expression levels in whole snails of different genes potentially involved in extracellular matrix (ECM) structuring or coagulation. A second approach we developed aimed at identifying proteins differentially represented in haemocytes of the 2 strains. This study (Bouchut *et al.* 2006b) revealed an aldolase, an intermediate filament protein, a cytidine deaminase.

In the present work, we used another molecular comparative method termed SSH to identify transcripts differentially expressed between the 2 mollusc strains of interest. This approach was performed on entire snails in order to investigate the potential involvement of genes expressed in other snail tissues. This approach revealed several genes identified in the above mentioned studies but also new candidates belonging to novel functional groups of interest.

The functional groups of α -glycolytic enzymes and calcium-binding proteins (CaBP) – were identified in the present work but also in plasma of *B. glabrata* as previously shown (Vergote *et al.* 2005). Bg endo-1,4- β -mannanase 1 was found in both cases. In addition, a novel isoform of the same family of proteins, the Bg endo-1,4- β -mannanase 3 was identified in the present study. In both works, the transcripts corresponding to these enzymes were over-represented in susceptible snails. This type of glycosidase randomly cleaves within the β -1,4-mannan main chain of galactomannan, glucomannan, galactoglucomannan and mannan. In the present work another glycolytic enzyme, named Bg endo-1,4- β -D-glucanase like 1, was revealed. Bg endo-1,4- β -D-glucanase like 1 transcripts were also over-represented in susceptible snails. These data taken together reinforce the previously presented hypothesis that glycolytic enzymes could be involved in the *B. glabrata*/*E. caproni* interactions (Vergote *et al.* 2005).

For the functional group corresponding to CaBP, a similar situation is observed. Indeed, the comparative proteomic approach developed on plasma revealed an over-representation of transcripts and proteins of plasmatic CaBP (Bg CaBP-1 and Bg CaBP-2). In the present study, 3 novel members of this protein family were identified (Bg CaBP-3, -4 and Bg DEC-3) and their transcripts are also over-expressed in susceptible snails. Regarding links between differential representation of these molecules and susceptibility/resistance, a possibility is that these proteins could be involved in regulation of adhesion processes as described in a previous study (Vergote *et al.* 2005).

Regarding novel functional group of interest, the most promising candidates identified in the present study belong to immunity class. Some of them were characterized from the EAF-S library. The first functional group of interest identified in this library

contains several proteases showing a higher expression in EAF-S snails: Bg cathepsin L like and Bg serine protease beta like 1. One attractive hypothesis is that a higher content in proteases could facilitate the parasite settlement in EAF-S snails. Indeed, as an alternative to produce their own proteases, some parasites (like pathogenic bacteria) can use proteases produced by host and turn them to their own advantage to facilitate invasion and dissemination (Armstrong, 2006). In addition, clusters corresponding to cell adhesion proteins were characterized from the EAF-S library. Two of them presented higher transcript levels in EAF-S snails. The first molecule, named Bg DEC-1 like, displays high similarities for a gene DEC-1 (dextral enriched clone-1) identified from the snail *Lymnaea stagnalis* (Harada *et al.* 2004). This molecule possesses chitin binding and von Willebrand type A (vWA) domains, suggesting a putative involvement in adhesion processes. The higher representation of this kind of molecule in susceptible snails can be linked to results obtained in a previous study (Bouchut *et al.* 2006a). In this last work, a series of genes encoding proteins containing vW domains potentially involved in coagulation processes have been shown to be more expressed (higher transcript level) in EAF-S snails. This led to the hypothesis that susceptible snails could possess a more potent collagen-independent filamentous network which could prevent haemocyte migration towards the parasite larvae and therefore facilitate parasite settlement in susceptible snails (Bouchut *et al.* 2006a). The second adhesion molecule, named Bg ependymin like, displays similarities for mammalian ependymin related proteins (MERPs). Ependymin was originally identified in the ependymal zone of goldfish brain and is a constituent of the extracellular matrix. Ependymins may be involved in cell contact mechanisms through anti-adhesive properties (Hoffmann and Schwarz, 1996). These anti-adhesive molecules could play a key role in establishing specific cell contacts during neural regeneration, differentiation and cell migration (Nimmrich *et al.* 2001). MERPs genes have been shown to be expressed at high levels in several haematopoietic cell lines as well as in non-haematopoietic tissues such as brain, heart, and skeletal tissues and by malignant tissues and malignant cell lines. This broad tissue distribution suggests a role for this MERP protein in processes that are important in many other types of cells and tissues (Apostolopoulos *et al.* 2001). The Bg ependymin-like transcript we identified in this study is over-represented in EAF-S snails. This candidate gene could be of potential interest in our system considering its putative involvement in anti-adhesive processes. The higher expression of these molecules and their associated anti-adhesive properties could prevent parasite encapsulation in EAF-S snails. Further studies investigating the tissue expression

of the Bg ependymin-like should be developed in order to test this hypothesis.

Several other novel clusters identified from EAF-S library and belonging to another class (energy, metabolism and hydrolytic enzymes) also display a transcript content that are superior in EAF-S snails. These clusters correspond to functional groups like transport (Bg haemoglobin and Bg fatty acid binding protein) and cholesterol homeostasis (cluster 30–32). Considering their putative function, it is difficult to speculate on the potential role of these genes in our system.

Regarding genes identified from the CB-R library, several genes potentially involved in immune processes were also identified. Among them, we identified a cluster displaying similarities for a defence factor Aplysianin A purified from the albumen gland of *Aplysia kurodai* (Takamatsu *et al.* 1995). This glycoprotein inhibited the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Another study developed in *Aplysia punctata* has evidenced a molecule called APIT (*A. punctata* ink toxin) displaying about 60% identity with Aplysianin A (Butzke *et al.* 2005). APIT is an L-amino acid oxidase, produce hydrogen peroxide and was shown to lead to a necrosis-like oxidative damage of Jurkat-T eukaryotic cells. The Bg Aplysianin A-like we identify in this study could be a defence factor involved in the anti-parasitic response of *B. glabrata*. Its higher abundance in CB-R snails could explain the efficiency of resistant snail response against *E. caproni*. Further studies investigating its biological activity and tissue localization could help to strengthen this hypothesis.

The second gene of interest identified from the CB-R library is a transcript encoding a C-type lectin, we called Bg C-type lectin-like. This molecule displays an amino acid motif which suggests mannose-binding capabilities. The majority of C-type lectins characterized in invertebrates are humoral sugar-binding proteins with a demonstrated or suggested involvement in pathogen-associated molecular pattern recognition (e.g. from mollusc (Yuasa *et al.* 1998), crustaceans (Luo *et al.* 2003), flat worm

AQ1 (Duclermortier *et al.* 1999) and nematode (Loukas *et al.* 1999)). The putative function of this protein of *B. glabrata* and the over-abundance of the corresponding transcripts in CB-R snails suggest a potential involvement of this gene in resistance. Future functional studies should be developed to evaluate this putative role.

Finally, several clusters corresponding to protease inhibitors were characterized from the CB-R library. This kind of molecule often plays a crucial role in anti-parasitic defence. Two serpin-like molecules were identified from CB-R library. Serpins (serine protease inhibitors) are protease inhibitors that are capable of inactivating and clearing the proteases involved in parasitic invasion and thus, that are an

important component of the armamentarium of the immune system to counter parasitic invasion (see Armstrong (2006) for review). Because proteases constitute one of the important classes of virulence and survival factors, the host has developed inhibitors proteases which have evolved as important elements in the system of host defences against pathogens and as regulators of endogenous proteases. Inactivation of the secreted proteases of pathogens has the potential to restrict the steps of invasion and dispersal in the internal milieu, and parasite-mediated inactivation of other elements of host immunity. In invertebrates such as arthropod (see Kanost (1999) for review), serpins are likely to function in protecting their hosts from pathogens or parasites and thus play several roles in immunity: protection against microbial proteases, regulation of endogenous proteases involved in cascade responses against pathogens, haemolymph coagulation, phenoloxidase activation and proteolytic cytokines activation. Recently, a mosquito serpin, *Anopheles stephensi* SRPN6, has been found to be strongly implicated in the innate immune response against *Plasmodium* by RNA interference (Abraham *et al.* 2005). *AsSRPN6* knockdown significantly increased the number of developing parasites, which suggests that *AsSRPN6* could be involved in the parasite killing process. Higher abundance of 2 serpin-like molecules in CB-R snails and the putative function of these molecules make them very attractive candidates in our system. Future functional studies have to be applied to verify their potential interest.

In conclusion, this SSH approach has been successful in identifying new transcripts that were differentially represented in *E. caproni*-susceptible and resistant *B. glabrata*. Similarities of the corresponding genes provided informative data on the potential functions of these proteins. According to these predicted functions, various assumptions can be made on their potential involvement in susceptibility/resistance processes. Future functional studies are needed to clarify the role of these genes in the host-parasite interaction.

This work was supported by the CNRS. We are grateful to Pierre Tisseyre (FR2577 CNRS) for performing DNA sequencing. We are indebted to Frédéric Chevalier and Lidwine Ambengat for technical assistance.

REFERENCES

- Abraham, E. G., Pinto, S. B., Ghosh, A., Vanlandingham, D. L., Budd, A., Higgs, S., Kafatos, F. C., Jacobs-Lorena, M. and Michel, K. (2005). An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 16327–16332. doi: 10.1073/pnas.0508335102.
- Apostolopoulos, J., Sparrow, R. L., McLeod, J. L., Collier, F. M., Darcy, P. K., Slater, H. R., Ngu, C.,

- Gregorio-King, C. C. and Kirkland, M. A.** (2001). Identification and characterization of a novel family of mammalian endymin-related proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic, and malignant tissues. *DNA and Cell Biology* **20**, 625–635.
- Armstrong, P. B.** (2006). Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology* **211**, 263–281. doi: 10.1016/j.imbio.2006.01.002.
- Ataev, G. L. and Coustau, C.** (1999). Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 187–198. doi: 10.1016/S0145-305X(99)00023-3.
- Bouchut, A., Roger, E., Coustau, C., Gourbal, B. and Mitta, G.** (2006a). Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of adhesion genes. *International Journal for Parasitology* **36**, 175–184. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.09.009.
- Bouchut, A., Sautiere, P. E., Coustau, C. and Mitta, G.** (2006b). Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. *Acta Tropica* **98**, 234–246. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.05.007.
- Butzke, D., Hurwitz, R., Thiede, B., Goedert, S. and Rudel, T.** (2005). Cloning and biochemical characterization of APIT, a new l-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. *Toxicon* **46**, 479–489. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.06.005.
- Guillou, F., Mitta, G., Dissous, C., Pierce, R. and 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **138**, 175–181. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.03.010.
- Harada, Y., Hosoiri, Y. and Kuroda, R.** (2004). Isolation and evaluation of dextral-specific and dextral-enriched cDNA clones as candidates for the handedness-determining gene in a freshwater gastropod, *Lymnaea stagnalis*. *Development Genes and Evolution* **214**, 159–169. doi: 10.1007/s00427-004-0392-6.
- Hoffmann, W. and Schwarz, H.** (1996). Ependymins: meningeal-derived extracellular matrix proteins at the blood-brain barrier. *International Review of Cytology* **165**, 121–158.
- Humbert, E. and Coustau, C.** (2001). Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata*-*Echinostoma caproni* system. *Parasitology* **122**, 651–660.
- Jung, Y., Nowak, T. S., Zhang, S. M., Hertel, L. A., Loker, E. S. and Adema, C. M.** (2005). Manganese superoxide dismutase from *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology* **90**, 59–63.
- Kanost, M. R.** (1999). Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 291–301. doi: 10.1016/S0145-305(99)00012-9.
- Langand, J. and Morand, S.** (1998). Heritable non-susceptibility in an allopatric host-parasite system: *Biomphalaria glabrata* (Mollusca)-*Echinostoma caproni* (platyhelminth Digenea). *Journal of Parasitology* **84**, 739–742.
- Langand, J., Jourdan, J., Coustau, C., Delay, B. and Morand, S.** (1998). Cost of resistance, expressed as a delayed maturity, detected in the host-parasite system *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni*. *Heredity* **80**, 320–325.
- Lewis, F. A., Richards, C. S., Knight, M., Cooper, L. A. and Clark, B.** (1993). *Schistosoma mansoni*: analysis of an unusual infection phenotype in the intermediate host snail *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* **77**, 349–361. doi: 10.1006/expr.1993.1092.
- Lie, K. J.** (1982). Swellengrebel lecture: survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. A discussion of the interference theory. *Tropical and Geographical Medicine* **34**, 111–122.
- Lockyer, A. E., Noble, L. R., Rollinson, D. and Jones, C. S.** (2004). *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Experimental Parasitology* **107**, 97–104. doi: 10.1016/j.exppara.2004.04.004.
- Loukas, A., Mullin, N. P., Tetteh, K. K., Moens, L. and Maizels, R. M.** (1999). A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Current Biology* **9**, 825–828. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80366-2.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z. and Xu, X.** (2003). PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters* **551**, 53–57. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00891-3.
- Miller, A. N., Raghavan, N., FitzGerald, P. C., Lewis, F. A. and Knight, M.** (2001). Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *International Journal for Parasitology* **31**, 687–696. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00133-3.
- Nimmrich, I., Erdmann, S., Melchers, U., Chtarbova, S., Finke, U., Hentsch, S., Hoffmann, I., Oertel, M., Hoffmann, W. and Muller, O.** (2001). The novel endymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells. *Cancer Letters* **165**, 71–79. doi: 10.1016/S0304-3835(01)00390-1.
- Nowak, T. S., Woodards, A. C., Jung, Y., Adema, C. M. and Loker, E. S.** (2004). Identification of transcripts generated during the response of resistant *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection using suppression subtractive hybridization. *Journal of Parasitology* **90**, 1034–1040.
- Raghavan, N., Miller, A. N., Gardner, M., FitzGerald, P. C., Kerlavage, A. R., Johnston, D. A., Lewis, F. A. and Knight, M.** (2003). Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**, 181–191. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00272-4.
- Richards, C. S.** (1975). Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **70**, 231–241.
- Richards, C. S. and Shade, P. C.** (1987). The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and

AQ2

- Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* **73**, 1146–1151.
- AQ3 **Shagin, D. A., Barsova, E. V., Bogdanova, E., Britanova, O. V., Gurskaya, N., Lukyanov, K. A., Matz, M. V., Punkova, N. I., Usman, N. Y., Kopantzev, E. P.** (2002). Identification and characterization of a new family of C-type lectin-like genes from planaria *Girardia tigrina*. *Glycobiology* **12**, 463–472.
- Takamatsu, N., Shiba, T., Muramoto, K. and Kamiya, H.** (1995). Molecular cloning of the defense factor in the albumen gland of the sea hare *Aplysia kurodai*. *FEBS Letters* **377**, 373–376. doi: 10.1016/0014-5793(95)01375-X.
- Vergote, D., Bouchut, A., Sautiere, P. E., Roger, E., Galinier, R., Rognon, A., Coustau, C., Salzet, M. and Mitta, G.** (2005). Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *International Journal for Parasitology* **35**, 215–224. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.11.006.
- Yuasa, H. J., Furuta, E., Nakamura, A. and Takagi, T.** (1998). Cloning and sequencing of three C-type lectins from body surface mucus of the land slug, *Incilaria fruhstorferi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **119**, 479–484. doi: 10.1016/S0305-0491(98)00008-X.

Discussion et Perspectives

Cette thèse, pionnière dans le domaine, avait pour objectif la mise en évidence de candidats potentiels susceptibles d'expliquer le polymorphisme de compatibilité dans le modèle *B. glabrata-E caproni*, ceci en multipliant les approches méthodologiques disponibles depuis peu et appliquées pour la plupart d'entre elles pour la première fois dans ces modèles. Ces approches ont permis de révéler plusieurs catégories de candidats qui pourraient être impliquées dans les mécanismes de susceptibilité-résistance et pourraient expliquer, à différents niveaux suivant le candidat, la compatibilité différentielle que présentent les deux souches du mollusque gastéropode *B. glabrata* pour le trématode parasite *E. caproni*. Les voies de recherche qui ont été choisies et suivies tout au long de cette thèse, ont été orientées par les résultats obtenus précédemment sur ce même modèle concernant les différents compartiments qui pourraient participer et fournir des éléments de réponse. En effet, compte tenu de l'observation de la dégénérescence des sporocystes d'*E. caproni* avant que ceux-ci ne soient encapsulés par les cellules de défense, les hémocytes, (Ataev & Coustau, 1999), nous nous sommes tout d'abord intéressés au contenu protéique du plasma des mollusques naïfs (non-infestés) susceptibles et résistants. Les travaux antérieurs, (Humbert & Coustau, 2001), avaient également révélé le comportement différentiel *in vitro* des hémocytes susceptibles et résistants en présence des produits d'excrétion-sécrétion d'*E. caproni* qui possèdent une action remarquable et extrêmement rapide sur les hémocytes susceptibles. Ces derniers perdent leur fonction d'adhérence (rétraction des pseudopodes, les cellules adoptent une forme arrondie), alors que les hémocytes issus des mollusques résistants ne semblent pas affectés par les mêmes produits parasitaires. De plus, les hémocytes forment une capsule nécessitant la participation de molécules d'adhérence afin d'éliminer le parasite, nous avons donc décidé d'une part d'étudier les profils d'expression de plusieurs candidats produits par les hémocytes qui pourraient être plus particulièrement impliqués dans ces processus d'adhérence et d'autre part, de comparer le contenu protéique global des hémocytes issus de mollusques susceptibles et résistants par une approche protéomique. Finalement, l'approche en banques soustractives (SSH) effectuée sur mollusques naïfs, entiers, susceptibles et résistants nous a permis d'englober la totalité des tissus et organes qui pourraient aussi participer à la production de molécules impliquées dans la compatibilité.

Dans cette partie, nous nous sommes focalisés sur les candidats qui représentent un intérêt majeur dans notre système, c'est-à-dire les candidats qui pourraient expliquer la

compatibilité différentielle des deux souches de *B. glabrata* vis à vis d'*E. caproni*. Nous avons tenté de regrouper l'ensemble des informations fournies par les différentes approches moléculaires comparatives afin de resituer ces candidats et leurs fonctions hypothétiques dans un schéma global des processus qui pourraient déterminer la compatibilité-incompatibilité. Cette discussion a pour objectif de développer (i) les éléments qui nous ont permis de sélectionner les candidats prioritaires et (ii) les perspectives de travail pour chacun d'entre eux. La poursuite de ce travail de thèse nécessitera, le choix des candidats les plus prometteurs étant fait, l'utilisation de techniques en cours de mise au point sur nos espèces d'intérêt lesquelles permettront d'approcher la fonction de ces gènes et de démontrer leur participation suspectée dans le polymorphisme de compatibilité.

I. Les candidats sur-exprimés chez les mollusques susceptibles

A. Les Calcium Binding Proteins

Les Calcium Binding Proteins (CaBPs) représentent un groupe de candidats dont l'expression a pu être révélée chez les mollusques susceptibles par deux approches différentes. Deux isoformes, CaBP1 et CaBP2, ont pu être révélées par une première approche en protéomique. Ces protéines sont sur-représentées dans le plasma des individus naïfs susceptibles (Vergote et al., 2005). L'approche en SSH, quant à elle, a révélé la présence de transcrits correspondant à deux autres CaBPs chez les individus susceptibles, CaBP3 et CaBP4, ainsi qu'un transcrit correspondant à DEC-3, protéine qui présente les mêmes domaines EF-Hand que CaBP1 et 2 (Bouchut et al., 2006a). Ce domaine est caractéristique de la famille des protéines liant le calcium comme la famille S100 ou les calmodulines. La concordance de ces résultats permet de valider les deux approches méthodologiques utilisées.

Les ions calcium représentent un second messenger ubiquitaire et universel impliqué dans les processus de transduction des signaux participant à la régulation de différentes fonctions cellulaires majeures telles que la migration cellulaire, la transcription de gènes, la prolifération, la différenciation, la contraction... (Berridge et al., 2000). Les ions calcium sont aussi impliqués dans les voies de réponses des plantes aux attaques par des pathogènes (Lecourieux et al., 2006). La famille des CaBPs joue un rôle clé dans la régulation de cette signalisation cellulaire et dans l'homéostasie du calcium (Berridge et al., 2000 ; Lewit-

Bentley & Rety, 2000). CaBP1 et CaBP2 ont été identifiées dans le plasma des mollusques. Il semble donc plus probable que celles-ci soient impliquées dans la fonction d'homéostasie du calcium. Par contre, nous ne disposons d'aucune donnée concernant la localisation des trois autres molécules (CaBPs 3 et 4 et DEC-3). L'ensemble de ces protéines pourrait être impliqué dans la régulation de la fonction d'adhérence, fonction pour laquelle des propriétés différentielles ont été observées pour les hémocytes issus des deux souches de mollusques mis en présence des produits d'excrétion-sécrétion du parasite *E. caproni* (Humbert & Coustau, 2001). En effet, des travaux ont mis en évidence l'intervention des ions calcium extracellulaires dans l'agrégation des hémocytes du mollusque gastéropode *Pomacea canaliculata* par l'intermédiaire de molécules telles les lectines de type C –molécule également caractérisée chez *B. glabrata* (Duclermortier et al., 1999). En effet, les expérimentations menées chez *P. canaliculata* ont permis d'observer la dispersion des hémocytes suite à l'ajout d'EDTA (Shozawa & Suto, 1990). D'autres travaux réalisés chez *B. glabrata* ont également mis en évidence l'importance de la présence de ces ions calcium en tant que facteur prépondérant lors des processus d'adhérence hémocytaire (Zelck & Becker, 1992). Quelle que soit la fonction dans laquelle interviennent les ions calcium, l'effet produit par ces ions dépend très fortement de leur concentration qui est très finement régulée. De façon générale, ces CaBPs pourraient modifier les concentrations en ions calcium libres chez les mollusques susceptibles, ces modifications pouvant avoir différentes répercussions sur les différentes voies de signalisation auxquelles ils participent. Ces protéines pourraient donc être envisagées comme des molécules de régulation de la concentration plasmatique du calcium, et plus particulièrement comme molécules de séquestration chez les mollusques susceptibles, les transcrits étant sur-représentés de façon très significative (différentiel du taux des transcrits des mollusques susceptibles par rapport aux résistants : CaBP1 : 9.7x, CaBP2 : 5x, CaBP3 : 7.1x, CaBP4 : 13x et DEC-3 : 7.6x). Toutes ces protéines pourraient agir en synergie de sorte que les concentrations optimales nécessaires au processus d'adhérence ne soient plus atteintes chez les mollusques susceptibles au moment de l'infestation. Cette séquestration pourrait également empêcher toute reconnaissance du parasite par des molécules de reconnaissance comme les lectines de type C (qui sont dépendantes du calcium) par exemple ou encore la formation de la capsule hémocytaire autour du parasite. Les ions calcium pouvant également intervenir dans le contrôle des voies de signalisation intracellulaire (Berridge et al., 2000), cette séquestration pourrait inhiber l'activation par ces ions de différentes voies impliquées (i) dans l'expression de molécules indispensables aux processus de reconnaissance ou

d'élimination du parasite et/ou (ii) dans la structuration cytosquelettique liée aux phénomènes de mobilité hémocytaire nécessaire à l'encapsulation (Figure 6).

Nous avons également envisagé une seconde hypothèse concernant les CaBPs suite à l'analyse en cinétique des taux de transcrits de CaBP1 en réponse à une infestation par *E. caproni*. En effet, 12h post-infestation, une induction des transcrits a pu être observée uniquement chez les mollusques résistants (2,9x). Une action anti-parasitaire de cette molécule pourrait donc être envisagée. En effet, plusieurs molécules liant le calcium ont été rapportées comme possédant une activité anti-helminthique. C'est le cas de la calgranuline C, protéine plasmatique impliquée dans les processus inflammatoires déclenchés par *Onchocerca volvulus* (Marti et al., 1996), et pour laquelle une activité filariostatique et filaricide a été démontrée sur le parasite *Brugia malayi* (Gottsch et al., 1999). De même, les calgranulines A et B ont été identifiées parmi les facteurs d'initiation des granulomes développés en réponse à *S. mansoni* dans l'interaction avec le vertébré (Yang et al., 1997).

Des expériences complémentaires devront être réalisées afin d'infirmer ou confirmer ces différentes hypothèses. Je propose d'utiliser ces différentes CaBPs dans un certain nombre de tests *in vitro*. Ces molécules, produites de façon recombinante, pourront être mises au contact des sporocystes du parasite *E. caproni* obtenus et maintenus en culture *in vitro*. De cette façon, nous pourrions juger de l'activité anti-parasitaire de ces molécules et appréhender une des multiples fonctions qu'elles pourraient avoir. Ces molécules recombinantes pourraient également être testées *in vitro* sur des hémocytes ou sur la lignée cellulaire Bge de manière à tester l'influence de leur concentration sur les capacités d'adhérence de ces cellules.

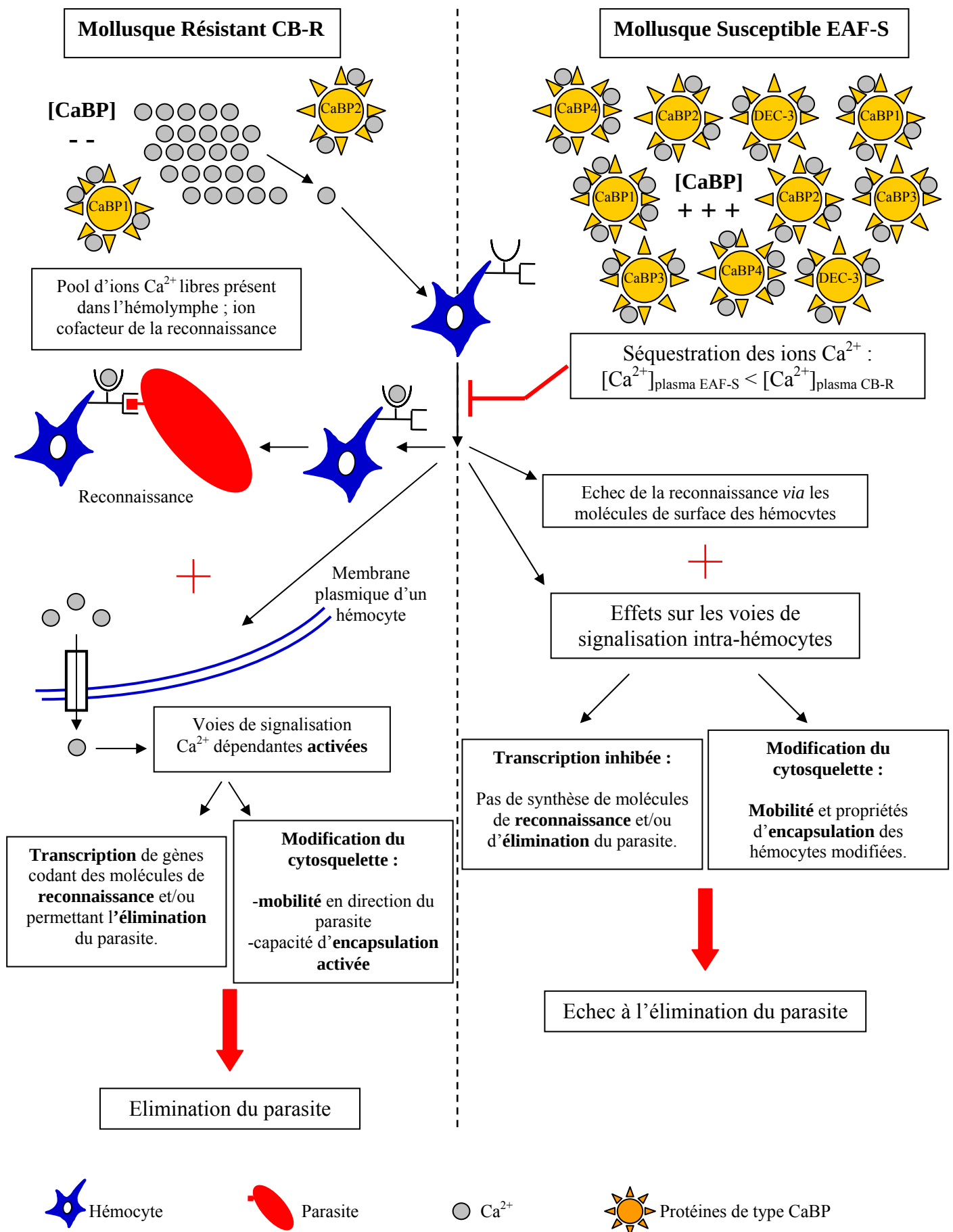


Figure 6 : Séquestration du Ca^{2+} par la présence abondante de CaBPs dans l'hémolymphe. Interférence avec le bon fonctionnement des mécanismes du système de défense du mollusque.

B. Les glycosidases

Le groupe des glycosidases correspond au second groupe de molécules qui a été révélé à la fois par l'approche protéomique réalisée sur le plasma des mollusques et par l'étude différentielle des transcrits en SSH. Ce groupe contient des glycosidases de type mannanase, glucanase et cellulase. Ces molécules sont toutes sur-exprimées chez les mollusques susceptibles. Trois Bg endo-1,4- β -mannanase ont été identifiées, deux par l'approche protéomique (Vergote et al., 2005) et une par l'approche en SSH (Bouchut et al., 2006a), la Bg endo-1,4- β -mannanase 1 ayant été retrouvée dans les deux études. Trois autres transcrits correspondant à des glycosidases ont aussi été identifiés dans la banque des mollusques susceptibles : deux glucanases et une cellulase. Le différentiel des taux de transcrits en faveur des mollusques susceptibles a été vérifié pour les trois mannanases et pour une glucanase (Vergote et al., 2005 ; Bouchut et al., 2006a).

L'endo-1,4- β -mannanase intervient dans la digestion des mannanes en catalysant l'hydrolyse des liaisons glycosidiques β -1,4 des mannanes, galactomannanes, glucomannanes et galactoglucomannanes (McCleary & Matheson, 1986). Elle a été purifiée et caractérisée à partir de différents organismes tels que les plantes, les champignons et les bactéries (Xu et al., 2002) et a été décrite chez les gastéropodes *Pomacea insularis*, *Littorina brevicula* et *Haliotis discus hannai* (Yamaura & Matsumoto, 1993 ; Yamaura et al., 1996 ; Ootsuka et al., 2006). L'endo-1,4- β -D-glucanase a également été purifiée et caractérisée chez le mollusque *Helix pomatia* et *Mytilus edulis* (Marshall, 1973 ; Xu et al., 2000). Ces enzymes glycolytiques pourraient être impliquées dans les interactions *B. glabrata*-*E. caproni* dans la mesure où les carbohydrates sont connus pour participer aux processus d'évitement du système de défense dans d'autres systèmes hôte-parasite (Dissous et al., 1986 ; Harnett & Harnett, 2001 ; Johnston & Yoshino, 2001 ; Castillo & Yoshino, 2002). Les carbohydrates principalement exposés à la surface du sporocyste de *S. mansoni* sont des résidus mannoses et galactoses (Yoshino et al., 1977 ; Zelck & Becker, 1990). Par ailleurs, une étude menée sur les produits d'excrétion-sécrétion d'*E. caproni* (Humbert & Coustau, 2001) suggère que ces derniers comprennent des polypeptides glycosylés, responsables d'une inhibition d'adhérence des hémocytes de *B. glabrata*. Il est difficile de spéculer sur le rôle éventuel de l'expression différentielle de certaines glycosidases néanmoins, de telles enzymes pourraient jouer un rôle important en modifiant la configuration moléculaire de la surface du pathogène ou de molécules sécrétées par le parasite ce qui pourrait donc avoir des répercussions sur l'interaction

de ses molécules avec les molécules de reconnaissance de l'hôte (Figure 7). Ces modifications pourraient alors faciliter l'installation du parasite chez les mollusques susceptibles. Le parasite effectuerait un détournement de ces molécules présentes en plus grande quantité chez les individus susceptibles. Ce phénomène de détournement a déjà été observé pour des protéases de l'hôte au profit de certains pathogènes (Armstrong, 2006). Cette idée est corroborée par une observation faite par U. Zelck (Zelck, 1999) dans un autre modèle impliquant des souches du même hôte et le trématode *S. mansoni*. En effet, dans cette étude, une activité β -D-mannosidase supérieure est observée dans les souches susceptibles de *B. glabrata*, ce qui rejoint le taux supérieur de β -D-mannosidase que nous mettons en évidence dans le plasma de nos souches susceptibles à *E. caproni*. D'autre part, des études menées sur les produits d'excrétion-sécrétion des vers adultes de *F. hepatica*, stade infestant les mammifères, ont montré la présence de différentes glycosidases (Irwin et al., 2004). Ces molécules qui participeraient à la dégradation des mucines permettent la migration du parasite chez l'hôte. Le même type de molécules pourrait être retrouvées dans les produits d'excrétion-sécrétion d'*E. caproni* libérés chez le mollusque, dont les effets seraient renforcés par la présence massive des glycosidases de l'hôte.

Une hypothèse complètement différente pourrait être envisagée concernant les glycosidases. Dans le cas où la fonction majeure de ces protéines serait une fonction de dégradation des polysaccharides nécessaires à la nutrition du mollusque, les taux de transcrits beaucoup plus faibles observés pour ces enzymes chez les mollusques résistants pourraient correspondre à une réallocation des ressources de la fonction nutrition vers d'autres fonctions leur permettant d'éliminer le parasite. Cette hypothèse pourrait être un élément susceptible d'expliquer un coût lié à la résistance mais aucune donnée bibliographique ne peut venir étayer cette hypothèse.

La technique des ARN interférents pourrait nous permettre de tester le rôle de ces glycosidases dans la facilitation de l'installation du parasite chez les mollusques susceptibles. Cette technique est en cours de mise au point à l'U547 (Inserm - Université de Lille 2 - Institut Pasteur de Lille) et pourra être testée prochainement en collaboration avec C. Coustau. Par ailleurs, une approche biochimique complémentaire réalisée actuellement au laboratoire se focalise sur l'étude des produits d'excrétion-sécrétion du parasite. La purification et la caractérisation de ces éléments devraient nous permettre (i) de déterminer si ce type d'enzymes est sécrété par *E. caproni* comme c'est le cas chez *F. hepatica* et (ii) de connaître la nature des glycosylations portées par les molécules présentes et donc de nous orienter sur les enzymes-hôtes susceptibles de les hydrolyser.

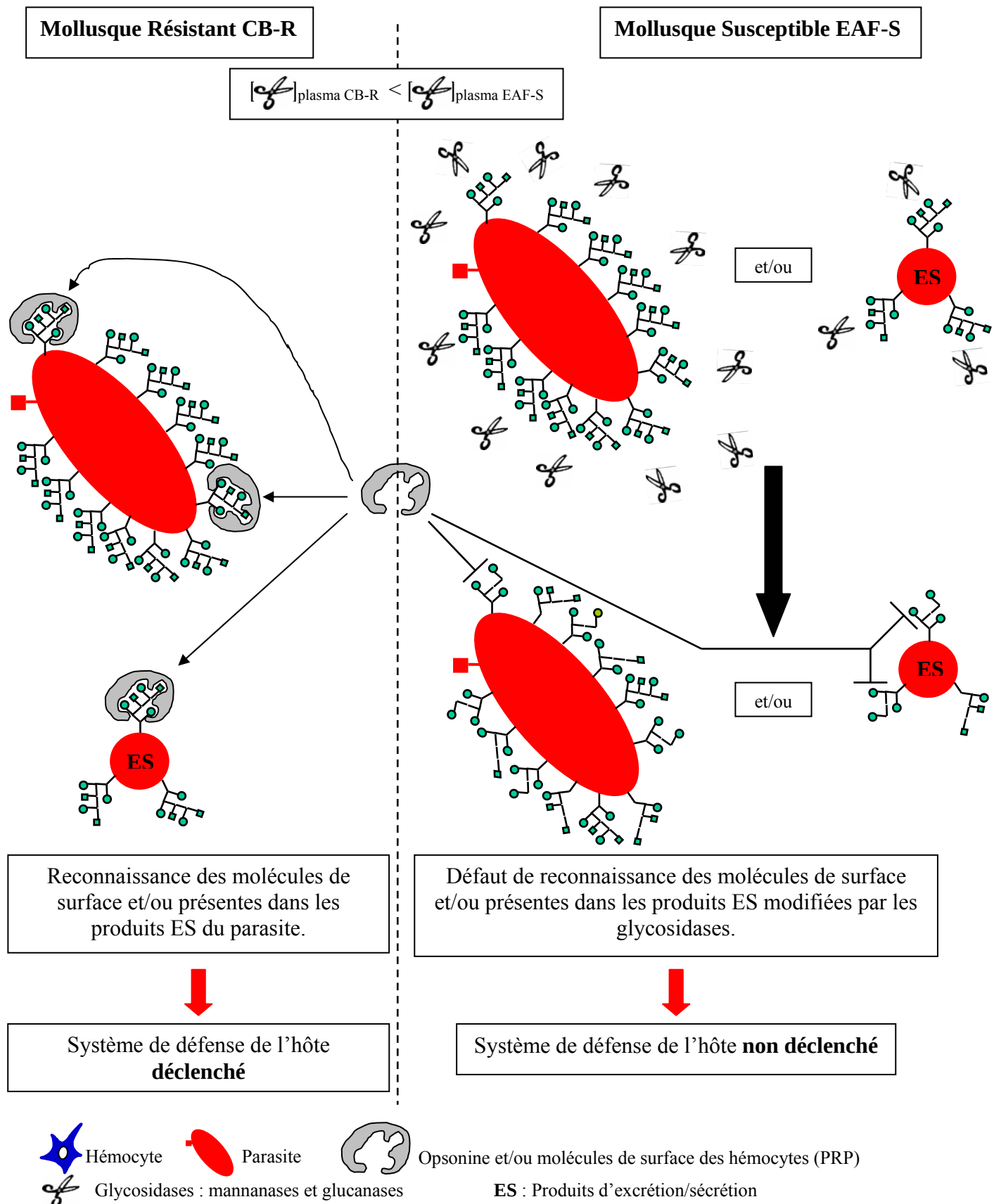


Figure 7 : Détournement des glycosidases de l'hôte par le parasite qui modifie ses molécules de surface et/ou celles présentes dans les produits d'excrétion-sécrétion afin de faciliter son installation par un défaut de reconnaissance par exemple.

C. Protéases et inhibiteurs de protéases

L'approche protéomique réalisée sur le plasma a permis d'identifier une cystatine de type 2 sur-représentée chez les individus susceptibles (Vergote et al., 2005). Les cystatines sont des protéines inhibitrices et régulatrices des processus protéolytiques engagés par les cystéines protéases comme les cathepsines (Anastasi et al., 1983). Plus précisément, les cystatines de type 2 sont des protéines sécrétées (Turk & Bode, 1991). Or, une cathepsine L a également été mise en évidence chez les mollusques susceptibles par l'approche en SSH. Par ailleurs, une autre protéase appartenant à la famille des sérines protéases présente également un taux de transcrits supérieurs chez les individus susceptibles. Les fonctions précises de cet inhibiteur de cystéine protéase et de ces protéases demeurent encore indéterminées. Chez les plantes, les cystatines pourraient intervenir dans les processus de protection contre les insectes et certains pathogènes (Turk & Bode, 1991). Par contre, certains parasites comme les nématodes *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Acanthocheilonema vitea* ou encore *Nippostrongylus brasiliensis* sécrètent des cystatines capables de bloquer la réponse immunitaire de leur hôte (Schonemeyer et al., 2001 ; Hartmann & Lucius, 2003 ; Schierack et al., 2003). De façon générale, les protéases sont envisagées comme des facteurs de virulence des parasites (McKerrow, 1989 ; Tort et al., 1999 ; Armstrong, 2006). Les cathepsines L caractérisées chez le trématode *F. hepatica* ou encore chez *Taenia solium* participent aux processus de pénétration, de migration chez l'hôte et d'évasion du système immunitaire (Dalton et al., 2003 ; Baig et al., 2005). En ce qui concerne les sérines protéases, une telle activité enzymatique a été identifiée dans les produits d'excrétion-sécrétion du parasite *Linguatula serrata* sans que sa fonction précise ne soit élucidée (Alcala-Canto et al., 2006) mais aussi dans ceux du parasite protozoaire de l'huître, *Perkinsus marinus* (Xue et al., 2006). Dans ce dernier cas, la sérine protéase serait impliquée dans le contournement du système de défense de l'hôte (Garreis et al., 1996). Ce type de protéases a également été identifié chez des hôtes. Récemment, une autre sérine protéase nommée HtrA2 a été identifiée chez les hémocytes de la souche de *B. glabrata* BS-90 non exposée et résistante à *S. mansoni*. HtrA2 serait impliquée dans la réponse au stress (Lockyer et al., 2006). Chez le moustique *A. gambiae* résistant à *Plasmodium*, des sérines protéases des sous-familles CLIPA et CLIPB participent au processus de mélanisation du parasite (Volz et al., 2006).

Dans notre modèle, nous pourrions envisager que ces molécules soient impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire. Le fait que les mollusques susceptibles présentent un contenu en protéases et en inhibiteurs de ces protéases (concernant la cathepsine L et la

cystatine) beaucoup plus important que chez les mollusques résistants au moment de l'infestation pourrait faciliter l'installation du parasite chez les mollusques susceptibles. En effet, au lieu de synthétiser leurs propres molécules, certains parasites et pathogènes détournent et utilisent les protéases produites par leur hôte à leur avantage afin de faciliter leur invasion et leur installation (Armstrong, 2006). Ainsi, la sur-représentativité de cette cystatine chez les mollusques susceptibles, pourrait être responsable d'une régulation excessive du système de défense consistant en une répression constitutive de molécules participant à la réponse dirigée contre le parasite dans les premières heures suivant l'infestation, ce qui faciliterait l'installation du parasite. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si *E. caproni* exprime un analogue fonctionnel de cette cystatine qui viendrait renforcer ces effets modulateurs jusqu'à inhiber le système de défense des individus susceptibles. De la même façon, si *E. caproni* libère des protéases, leur effet peut également être renforcé par la présence des protéases de l'hôte, les deux types de molécules, protéases et inhibiteurs de protéases agissant alors en synergie afin de permettre l'installation du parasite (Figure 8).

La localisation de l'expression de ces candidats en hybridation *in situ* et en immunocytochimie (par l'étude de la localisation et de l'éventuelle co-localisation des molécules du mollusque et de celles libérées par le parasite) ainsi que la réalisation d'expériences d'ARN interférence visant à éteindre l'expression de ces gènes chez des mollusques susceptibles dont les effets seraient observés durant les tous premiers temps de l'infestation devraient nous permettre d'évaluer plus précisément leur implication dans la compatibilité différentielle des deux souches.

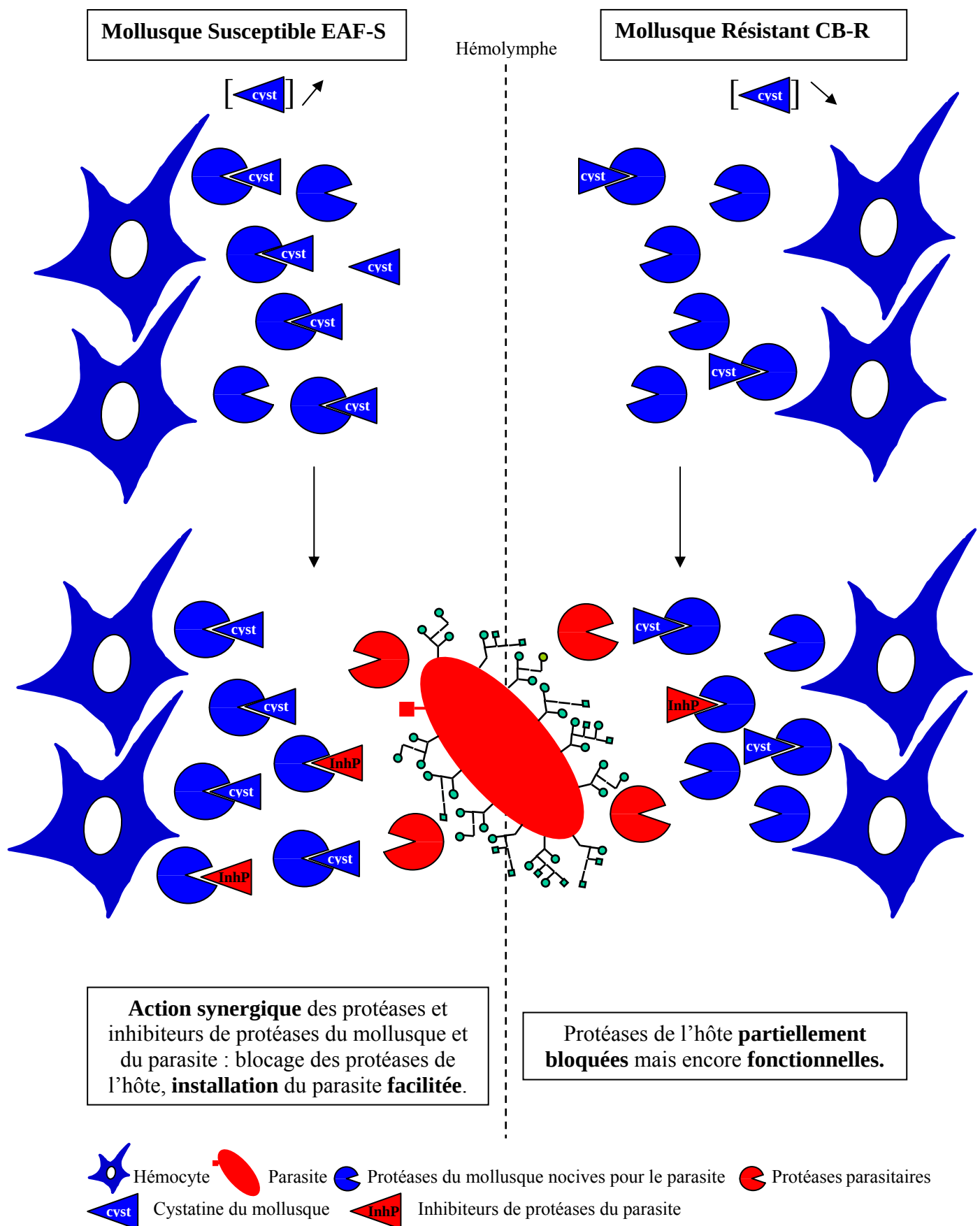


Figure 8 : Détournement des protéases et inhibiteurs de protéases, molécules de défense présumées du mollusque, par le parasite afin de faciliter son installation chez la souche de mollusques susceptibles.

D. Les molécules d'adhérence et de la matrice extracellulaire

Compte tenu des différences constitutives que présentent les hémocytes des deux souches concernant leurs propriétés d'adhérence (Humbert & Coustau, 2001), nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes hémocytaires potentiellement impliqués dans les processus d'adhérence. Ce travail nous a permis de révéler et de caractériser deux candidats présentant des taux de transcrits supérieurs dans les hémocytes des individus susceptibles : la Bg cadhérine like 1 et la Bg matriline (Bouchut et al., 2006b). L'approche en SSH nous a également permis de mettre en évidence la sur-expression de deux autres molécules potentiellement impliquées dans les processus d'adhérence : DEC-1 (dextral enriched clone 1) et l'épendymine (Bouchut et al., 2006a).

Les cadhérines sont des glycoprotéines formant une grande famille de molécules d'adhérence qui participent de façon structurelle et fonctionnelle à la morphogénèse des organismes multicellulaires et au maintien des tissus. Les cadhérines sont responsables de la formation d'interactions cellule-cellule de type homophile et dépendantes des ions calcium, c'est-à-dire des interactions qui se produisent entre deux cellules de même type par leurs domaines extracellulaires. Les cadhérines sont également reliées au cytosquelette par l'intermédiaire des caténines et participent ainsi à la transduction des signaux. Les interactions qui se produisent *via* les domaines extracellulaires de deux cadhérines identiques sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la migration cellulaire (Takeichi, 1987 ; Takeichi, 1990 ; Wheelock & Johnson, 2003). Des travaux ont montré que des E-cadhérines (épithéliales) étaient exprimées à la surface des cellules précurseurs des érythrocytes (érythroblastes et normoblastes) mais pas sur celle des érythrocytes (Armeanu et al., 1995 ; Armeanu et al., 2000). Le rôle que pourraient avoir ces molécules reste encore indéfini. Par contre, l'expression de telles molécules à la surface d'hémocytes n'avait pas encore été rapportée. L'expression de telles molécules à la surface de cellules circulantes peut paraître assez inattendue. Un niveau d'expression constitutif supérieur chez les hémocytes des mollusques susceptibles pourrait limiter leur disponibilité et leur recrutement sur le site de l'infestation et permettre l'installation du parasite (Figure 9). Cependant, on aurait pu s'attendre à ce que d'autres molécules, partenaires éventuelles des cadhérines, soient également sur-exprimées chez les hémocytes susceptibles, comme par exemple les caténines. La caractérisation complète de ces cadhérines qui présentent peut-être des spécificités et des

expériences d'immunocytochimie pourraient éventuellement nous permettre de localiser les hémocytes immobilisés *via* ces molécules.

La Bg matriline serait une protéine sécrétée par les hémocytes, comme l'indique la présence d'un peptide signal sur la molécule précurseur, possédant des domaines d'interaction protéine-protéine Von Willebrand de type A (VWA) (Bouchut et al., 2006b). En effet, la majeure partie des protéines contenant des domaines de type VWA est extracellulaire (Colombatti et al., 1993). Chez les vertébrés, ce type de domaines a été retrouvé dans des protéines présentes dans le plasma sanguin et participant aux processus de coagulation. De plus, les domaines de type VWA sont également impliqués dans les processus d'adhérence cellulaire, de structuration de la matrice extracellulaire (MEC), de migration, de transduction des signaux et plus généralement dans la formation de complexes protéiques (Colombatti et al., 1993 ; Chen et al., 1999). La famille de protéines pour laquelle la Bg matriline présente des similarités correspond à des matriline de vertébrés contenant également deux domaines VWA. Cette famille de protéines est impliquée dans la structuration des cartilages en participant à la formation d'un réseau filamenteux indépendant du collagène (Chen et al., 1995). Les fonctions précises que pourraient avoir cette famille de molécules chez les vertébrés n'ont pas encore été élucidées. Ces matriline pourraient avoir un rôle structurel tout en participant aux interactions qui peuvent s'établir entre la MEC et les cellules (Makihira et al., 1999). En effet, des travaux menés sur la matrilin-1 suggèrent que cette molécule pourrait fonctionner en tant que facteur d'adhérence pour les chondrocytes et les fibroblastes de vertébrés et pourrait également promouvoir l'étalement de ces cellules (Makihira et al., 1999). Il semblerait que les intégrines de type $\alpha 1 \beta 1$ auraient un rôle crucial à jouer dans ces processus d'adhérence et d'étalement qui nécessitent la présence de cations divalents et qui sont médiés par les matriline. Les autres matriline appartenant à la même famille de protéines que la matrilin-1 pourraient également fonctionner en tant que facteurs d'adhérence étant donné qu'elles présentent des structures et des domaines similaires (Makihira et al., 1999). De la même façon, la fonction biologique de la Bg matriline reste encore à déterminer. Cependant, ces différents éléments nous permettent d'envisager que la Bg matriline, produite et sécrétée par les hémocytes, pourrait participer à la formation d'un réseau filamenteux dans l'hémolymph du mollusque. Ce type de réseau a déjà été décrit chez *B. glabrata* suite à des travaux réalisés en ultrastructure par Matricon-Gondran (Matricon-Gondran & Letocart, 1999). Ces expériences ont montré que l'infestation par *E. caproni* ou l'injection de particules étrangères telles que des billes de latex, du zymosan ou encore des bactéries, induisaient la polymérisation de filaments tubulaires et hélicoïdaux à double brin dans l'hémolymph de *B.*

glabrata. Cette polymérisation correspondrait à une réaction de défense humorale non spécifique, immédiate et extrêmement forte du mollusque. Ces filaments qui forment des faisceaux constitués de quelques unités parallèles associées par de fines fibrilles appartiennent à la MEC. Il en résulte un réseau complexe qui peut être lâche ou bien très dense dans un même mollusque et dans lequel les particules peuvent être retenues. De plus, ces mêmes travaux ont également montré que les hémocytes pouvaient adhérer à ces filaments via l'extrémité de leurs filopodes ou une petite partie de leur surface. Par conséquent, suite à une interaction avec les filaments, les hémocytes pourraient devenir temporairement sédentaires. Le taux de transcrits correspondant au gène de la Bg matriline étant nettement supérieur chez les mollusques susceptibles naïfs (comparés aux résistants), le réseau filamenteux indépendant du collagène que pourraient former les mollusques susceptibles pourrait être beaucoup plus dense et compact, créant une sorte de système coagulogène très performant, emprisonnant les hémocytes et les empêchant ainsi de migrer en direction du parasite (Figure 9). Ce phénomène faciliterait ainsi l'établissement du parasite. D'autre part, l'étude de l'expression, chez les mollusques entiers, de gènes potentiellement impliqués dans les processus de structuration de la MEC et dont les protéines présentaient majoritairement des domaines Von Willebrand vient étayer cette hypothèse. En effet, la majeure partie de ce type de gènes est beaucoup plus exprimée chez les mollusques susceptibles (Bouchut et al., 2006b). De plus, l'approche en SSH a révélé un candidat sur-exprimé chez les individus susceptibles présentant des similarités pour DEC-1 (Dextral Enriched Clone 1), dont le produit fonctionnel possède un domaine Von Willebrand de type A. L'ensemble de ces éléments vient appuyer l'hypothèse d'un réseau filamenteux beaucoup plus dense chez les individus susceptibles. Par ailleurs, des observations ont montré que l'adhérence, la formation d'agrégats cellulaires en contact avec la MEC et l'étalement des hémocytes pouvaient être inhibés par la présence du térapeptide RGDS (arg-gly-asp-ser) suggérant l'implication d'un récepteur de type intégrine (Davids & Yoshino, 1998). Or, une sous-unité de type $\beta 1$ a été clonée et séquencée à partir des hémocytes de *B. glabrata* (Yoshino et al., 1999 ; Yoshino et al., 2001). Par contre, encore aucune sous-unité de type α n'a été identifiée chez le mollusque. Cette sous-unité de récepteur de type intégrine pourrait donc permettre aux hémocytes d'interagir avec les faisceaux du réseau filamenteux.

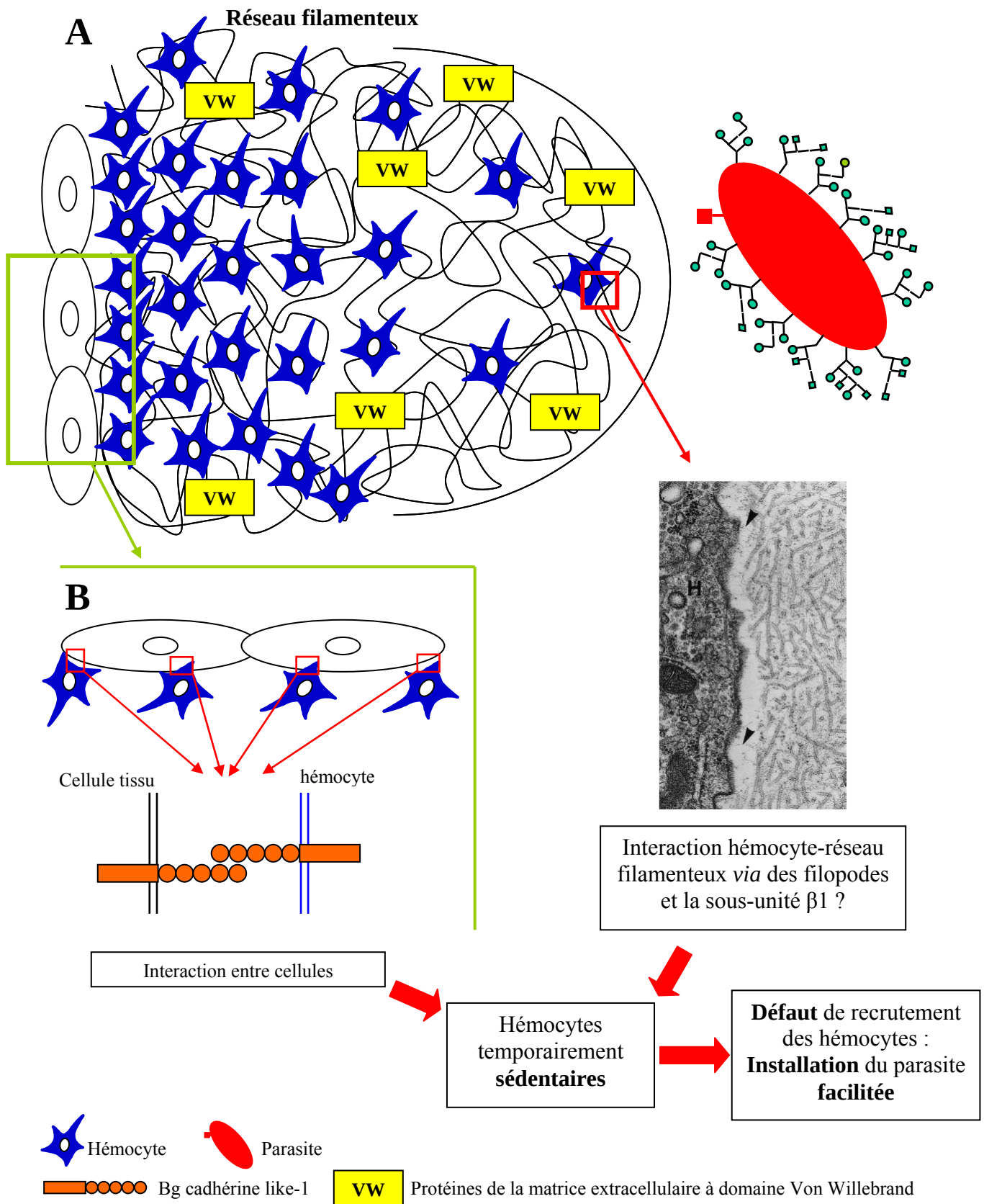


Figure 9 : Processus d'immobilisation des hémocytes, défaut de recrutement : (A) Formation d'un réseau filamenteux *via* les protéines à domaines VW de la MEC. (B) Interactions cellule-cellule *via* les cadhérines. (Photo d'après Matricon-Gondran & Letocart, 1999).

De futures expériences devront se focaliser sur l'étude de la localisation de l'expression de ces molécules par des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie. Des expériences réalisées *in vitro* pourraient permettre l'étude de la formation de ce réseau en présence des différentes protéines recombinantes de la MEC identifiées par ce travail et dont le taux de transcrits est supérieur chez les mollusques susceptibles. Ce système *in vitro* pourrait aussi permettre de tester l'adhérence et l'étalement des hémocytes sur cette structure. Des tests d'inhibition d'adhérence seraient réalisés afin de tester l'implication de la sous-unité $\beta 1$ du récepteur de type intégrine.

La dernière molécule potentiellement impliquée dans les processus d'adhérence identifiée par l'approche en SSH est la Bg endymin-like. L'endymine est une molécule de la MEC caractérisée chez les poissons (Shashoua, 1977 ; Rother et al., 1995), puis chez les mammifères (Apostolopoulos et al., 2001 ; Nimmrich et al., 2001) et plus récemment chez les invertébrés tels *Holothuria glaberrima*, *H. mexicana* et *Lytechinus variegatus* (Suarez-Castillo et al., 2004). En tant que molécule de la MEC, cette protéine serait impliquée dans des mécanismes intervenant lors de contacts cellulaires par l'intermédiaire de propriétés anti-adhésives (Hoffmann & Schwarz, 1996). La fonction précise des endymines n'a pas encore été élucidée, mais de telles molécules auraient un rôle majeur dans l'établissement de contacts cellulaires spécifiques nécessaires lors de la régénération neurale, la différenciation cellulaire ou encore la migration cellulaire (Nimmrich et al., 2001). D'autre part, l'endymine serait impliquée dans l'homéostasie du calcium, la liaison du calcium se faisant *via* des résidus acides sialiques N-liés (Shashoua, 1991 ; Hoffmann & Schwarz, 1996). L'expression de ce type de molécule a pu être observée dans différents types de tissus tels que le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les lignées cellulaires hématopoïétiques et les tissus et lignées cellulaires malignes ce qui suggère qu'elles interviendraient dans différents processus clés (Apostolopoulos et al., 2001). Le fait que cette protéine soit sur-exprimée chez les mollusques susceptibles naïfs semble particulièrement intéressant compte tenu de ses propriétés anti-adhésives. En effet, la Bg endymin-like pourrait bloquer l'encapsulation du parasite en empêchant les hémocytes d'adhérer entre eux et/ou localement à la MEC. Des expériences se focalisant sur la localisation de l'expression du gène correspondant par hybridation *in situ* et par immunohistochimie devraient nous permettre d'évaluer l'implication de la Bg endymin-like dans l'inhibition de la formation de la capsule hémocytaire.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, un fait prépondérant et qui peut paraître assez troublant est mis en exergue : la susceptibilité et donc la compatibilité des mollusques susceptibles avec le parasite *E. caproni* pourraient résulter de « l'accumulation » d'une sur-expression constitutive de différentes molécules qui favoriseraient l'installation du parasite.

II. Les candidats sur-exprimés chez les mollusques résistants

De façon générale, les candidats que nous retrouvons sur-exprimés chez les mollusques résistants peuvent être associés directement ou indirectement aux mécanismes impliqués dans la fonction immunitaire.

A. Les dermatopontines

L'approche transcriptomique effectuée sur les gènes hémocytaires potentiellement impliqués dans les processus d'adhérence ainsi que l'approche en SSH menée sur les individus entiers nous ont permis de révéler trois dermatopontines : Bg dermatopontin 2, Bg dermatopontin 3 et Bg dermatopontin like 2.

Cette famille de protéines est un des constituants non collagèneux de la MEC décrite chez les vertébrés (Choi et al., 1989 ; Neame et al., 1989 ; Cronshaw et al., 1993 ; Superti-Furga et al., 1993 ; Takemoto et al., 2002 ; Tzen & Huang, 2004) ainsi que chez les invertébrés (Fujii et al., 1992 ; Schutze et al., 2001 ; Marxen et al., 2003 ; Sarashina et al., 2006). Nous avons réalisé la caractérisation complète des ADNc correspondants à la Bg dermatopontin 2 et 3. Comme le suggère la présence d'un peptide signal, ces deux molécules pourraient être sécrétées ou stockées de façon constitutive dans des granules de sécrétion hémocytaires. Les séquences protéiques des molécules précurseurs suggèrent que Bg dermatopontin 2 et 3 présentent les mêmes caractéristiques structurales communes aux dermatopontines identifiées chez les vertébrés et les invertébrés mais aussi des caractéristiques particulières aux invertébrés. Ces dernières correspondent (i) à une disposition des cystéines caractéristique de celle retrouvée dans la séquence de la dermatopontine identifiée chez *Suberites domuncula* (Schutze et al., 2001) et (ii) à la présence d'un court motif de cinq acides aminés (V-N-D/S-W/F-D) répété trois fois dans la séquence, que l'on retrouve également sur le fragment de Bg dermatopontin like 2, ce motif étant

identique à celui retrouvé dans la séquence de la limule *Limulus polyphemus* (Fujii et al., 1992). Ni la fonction de ces motifs particuliers, ni celle que pourraient avoir les dermatopontines n'ont encore été élucidées. Cependant, des pistes existent concernant les dermatopontines de *S. domuncula* et *L. polyphemus*. Toutes deux seraient capables d'agréger des cellules : les cellules dissociées de *S. domuncula* pour la première (Schutze et al., 2001) et les hémocytes de *L. polyphemus* pour la seconde (Fujii et al., 1992). De plus, il a été démontré que la dermatopontine de limule était produite par les hémocytes et stockée dans des granules de sécrétion (Fujii et al., 1992). L'ensemble de ces résultats porte à croire que les dermatopontines identifiées chez *B. glabrata* pourraient posséder les mêmes propriétés d'agrégation des hémocytes. Ces dermatopontines présentent une représentativité relative des transcrits supérieure chez les hémocytes des mollusques résistants. De plus, l'analyse en cinétique, suite à une infestation par *E. caproni*, montre une très forte augmentation des taux de transcrits des individus résistants 48 heures post-infestation. Or, ce temps correspond au début de la phase de migration hémocytaire en direction du parasite, ce processus conduisant à la formation de la capsule hémocytaire 72 heures post-infestation (Ataev & Coustau, 1999). Ces observations pourraient suggérer que les dermatopontines, potentiellement impliquées dans des processus d'agrégation cellulaire, pourraient participer à la structuration de la capsule hémocytaire (Figure 10). Un taux minimal des transcrits pourrait être requis à ce temps particulier des 48 heures, expliquant en partie la formation de la capsule uniquement chez les mollusques résistants.

Afin d'évaluer les différentes hypothèses qui viennent d'être évoquées au sujet des dermatopontines, la technique de l'hybridation *in situ* devrait nous permettre de vérifier tout d'abord la localisation de l'expression des gènes correspondants dans les hémocytes et plus particulièrement dans ceux participant à la formation de la capsule. D'autre part, afin d'aborder la fonction de ces dermatopontines, nous envisageons d'appliquer la technique de l'ARN interférence à la fois sur les mollusques et sur la lignée cellulaire Bge, sachant que les gènes codant les dermatopontines sont exprimés par ce dernier type cellulaire (C. Coustau, communication personnelle).

L'approche en SSH a permis d'identifier trois gènes candidats présentant un intérêt non négligeable dans leur éventuelle implication dans la susceptibilité-résistance différentielle de nos deux souches de mollusques. Ces gènes semblent directement impliqués dans les processus immunitaires.

B. La C-type lectin

Parmi ces candidats, une lectine de type C a été identifiée. La séquence en acides aminés correspondant à la Bg C-type lectin-like présente deux groupes de trois résidus spécifiques de la liaison du calcium et des carbohydrates. Plus particulièrement, le groupe de résidus constitué des acides aminés EPN (Glu-Pro-Asn) correspond à un motif caractéristique de la liaison du mannose (Drickamer, 1992). De façon générale, les lectines de type C représentent un groupe de PRPs (Pattern Recognition Proteins) capable de reconnaître les structures carbohydrates présentent à la surface (i) des cellules, (ii) des protéines circulantes du sérum ou de la MEC ainsi que (iii) celles présentent à la surface des pathogènes (nommées PAMPs, pathogen-associated molecular pattern) (Drickamer, 1988). Ces molécules se retrouvent donc impliquées dans plusieurs processus tels que l'adhérence des cellules, le renouvellement des glycoprotéines plasmatiques et la reconnaissance innée du pathogène (Drickamer & Taylor, 1993 ; McGreal et al., 2004). Les C-type lectins jouent un rôle crucial dans différents mécanismes immunitaires innés des invertébrés (Weis et al., 1998). En effet, plusieurs travaux ont montré que ces lectines de type C étaient impliquées dans diverses réponses biologiques liées à la réponse immunitaire comme la reconnaissance, la neutralisation et l'élimination des pathogènes, l'activation du système prophénoloxydase (Yu et al., 1999 ; Yu & Kanost, 2000 ; Yu et al., 2005), une activité antibactérienne (Suzuki et al., 1990 ; Wang et al., 2007), l'activation de la phagocytose par opsonisation, l'agglutination des bactéries et des érythrocytes (Luo et al., 2003 ; Luo et al., 2006), et la formation de nodules hémocytaires (Koizumi et al., 1999 ; Watanabe et al., 2006). De plus, suite à une infestation par le parasite protozoaire *Perkinsus olseni*, il a été montré que certaines lectines dont des lectines de type C, spécifiques de cette réponse immunitaire, étaient synthétisées chez les hémocytes du bivalve *Ruditapes philippinarum* alors qu'elles n'étaient pas détectées chez les mollusques non infestés (Kang et al., 2006). D'autre part, les lectines identifiées étaient différentes de celles produites lors de l'infection par des bactéries du genre *Vibrio*, suggérant que cette réponse pourrait être spécifique (Kang et al., 2006). Les sucres appartiennent à la catégorie des PAMPs et sont généralement localisés à la surface du pathogène et/ou peuvent

être relargués dans les produits d'excrétion-sécrétion sous forme de peptides glycosylés (Yoshino et al., 1977 ; Zelck & Becker, 1990 ; Humbert & Coustau, 2001). Etant donné la fonction prédite par la présence du domaine C-type lectin et le fait que cette molécule soit sur-exprimée chez les mollusques résistants, la Bg C-type lectin-like pourrait être impliquée dans la résistance. Sa plus forte représentativité chez les individus résistants pourrait permettre une reconnaissance rapide et efficace du parasite. Cette reconnaissance déclencherait alors toute une cascade de signaux à laquelle pourraient participer certains de nos candidats, cascade qui serait indispensable à la mise en place du processus de défense interne du mollusque conduisant à l'encapsulation du parasite (Figure 10).

La localisation de la synthèse des ARN messagers et de la protéine correspondants par les techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie devrait nous permettre de nous rapprocher de la fonction de cette molécule. Bien que l'approche protéomique n'ait pas mis en évidence ce candidat dans les extraits protéiques hémocytaires des mollusques résistants, on pourrait s'attendre à une localisation dans ce type cellulaire, cette molécule pouvant être sécrétée ou membranaire.

C. L'aplysianin

La Bg aplysianin A-like présente des similarités pour une molécule effectrice impliquée dans la défense chez *Aplysia kurodai* (Takamatsu et al., 1995). Cette glycoprotéine a été caractérisée à partir de la glande de l'albumine de ce mollusque. Il a été démontré qu'elle avait la capacité d'inhiber la croissance des bactéries gram-positive et gram-négative. D'autre part, une autre molécule APIT (*Aplysia punctata* Ink Toxin) a été identifiée chez une espèce du même genre et présente environ 60% d'identité avec l'aplysianin A de *A. kurodai* (Butzke et al., 2005). Cette dernière molécule est une oxydase des acides aminés L (L-amino acide oxidase, LAAO) qui produit du peroxyde d'hydrogène, molécule participant également à l'élimination d'organismes étrangers tels les trématodes chez les mollusques d'eau douce (Dikkeboom et al., 1987 ; Dikkeboom et al., 1988a ; Dikkeboom et al., 1988b ; Shozawa et al., 1989 ; Adema et al., 1991 ; Adema et al., 1994 ; Bender et al., 2005). Il a également été démontré qu'elle conduisait *in vitro* à une nécrose oxydante des cellules eucaryotes telles que les cellules de Jurkat-T (Butzke et al., 2005). De plus, des études menées chez la glossine ont montré que certaines molécules responsables de l'élimination des bactéries comme l'attacine qui est un peptide antimicrobien pouvaient aussi participer à la réponse antiparasitaire (Hu & Aksoy, 2005). La Bg aplysianin A-like pourrait donc être un effecteur de la défense du

mollusque en réponse au parasite. Un taux de transcrits supérieur chez les mollusques résistants pourrait avoir des propriétés helminthocides permettant de contrer l'installation du parasite (Figure 10). Cette hypothèse devrait pouvoir être étayée à la fois par la localisation de son expression (hybridation *in situ* et immunohistochimie) et par la réalisation de tests biologiques en présence de la protéine recombinante tels que ceux envisagés pour les CaBPs, afin de tester l'activité parasiticide de cette molécule.

D. Les serpins

Les deux autres molécules révélées par l'approche en SSH présentent des similarités pour des serpins (inhibiteurs de protéases à sérine). Ce type de molécules joue un rôle crucial dans la défense mise en place contre les parasites. En effet, les serpins, présentes dans les granules hématocytaires et sécrétées dans l'hémolymphe, sont capables d'inactiver et/ou d'éliminer les protéases du parasite impliquées dans l'invasion et donc font partie intégrante des composants du système immunitaire inné permettant de contrer l'invasion parasitaire (pour revue, cf (Armstrong, 2006)). Les protéases constituent une classe importante de facteurs de virulence permettant la survie du pathogène. Face à ces molécules, les hôtes ont développé des inhibiteurs de ces molécules qui sont devenus des éléments importants du système de défense des hôtes dirigés contre le pathogène mais également des éléments régulateurs des protéases endogènes. L'inactivation des protéases sécrétées par les pathogènes permet de limiter les étapes d'invasion et de dispersion du parasite dans le milieu interne de l'hôte. Cette inactivation permet aussi de contrer l'action inhibitrice que pourraient avoir les protéases pathogènes sur les autres éléments impliqués dans la défense de l'hôte. Chez les invertébrés, tels que les arthropodes, les serpins semblent protéger l'hôte des pathogènes (et des parasites) en intervenant dans différentes voies : protection contre les protéases microbiennes, régulation des protéases endogènes associées aux réponses dirigées contre les pathogènes, coagulation de l'hémolymphe, activation de la voie phénoloxydase et des cytokines protéolytiques. Des études ont montré que des inhibiteurs de protéases à sérine pouvaient bloquer l'entrée du stade mérozoïte de *Plasmodium* dans les érythrocytes (Breton et al., 1992). Plus récemment, il a été démontré par la technique de l'ARN interférence qu'une serpin caractérisée chez le moustique *Anopheles stephensi* était impliquée dans la réponse immunitaire dirigée contre *Plasmodium berghei* (Abraham et al., 2005). Suite à l'extinction de l'expression de cette serpin, le nombre d'oocinètes augmente de façon significative ce qui suggère que cette molécule pourrait être impliquée directement ou indirectement dans le

processus d'élimination du parasite. De la même façon, les Bg serpin-like 3 et 4 qui présentent un taux de transcrits supérieur chez les individus résistants naïfs devraient pouvoir participer à une réponse qui n'aurait pas le temps de se mettre en place chez les individus susceptibles. Ces serpins pourraient limiter les effets des protéases à sérine qui pourraient être contenues dans les produits d'excrétion-sécrétion libérés par le parasite chez l'hôte (Figure 10). Eteindre l'expression des gènes correspondants par la technique de l'ARN interférence pourrait éventuellement nous permettre d'atteindre leurs fonctions. Cependant, une trop forte homologie des séquences pourrait rendre difficile l'analyse des résultats.

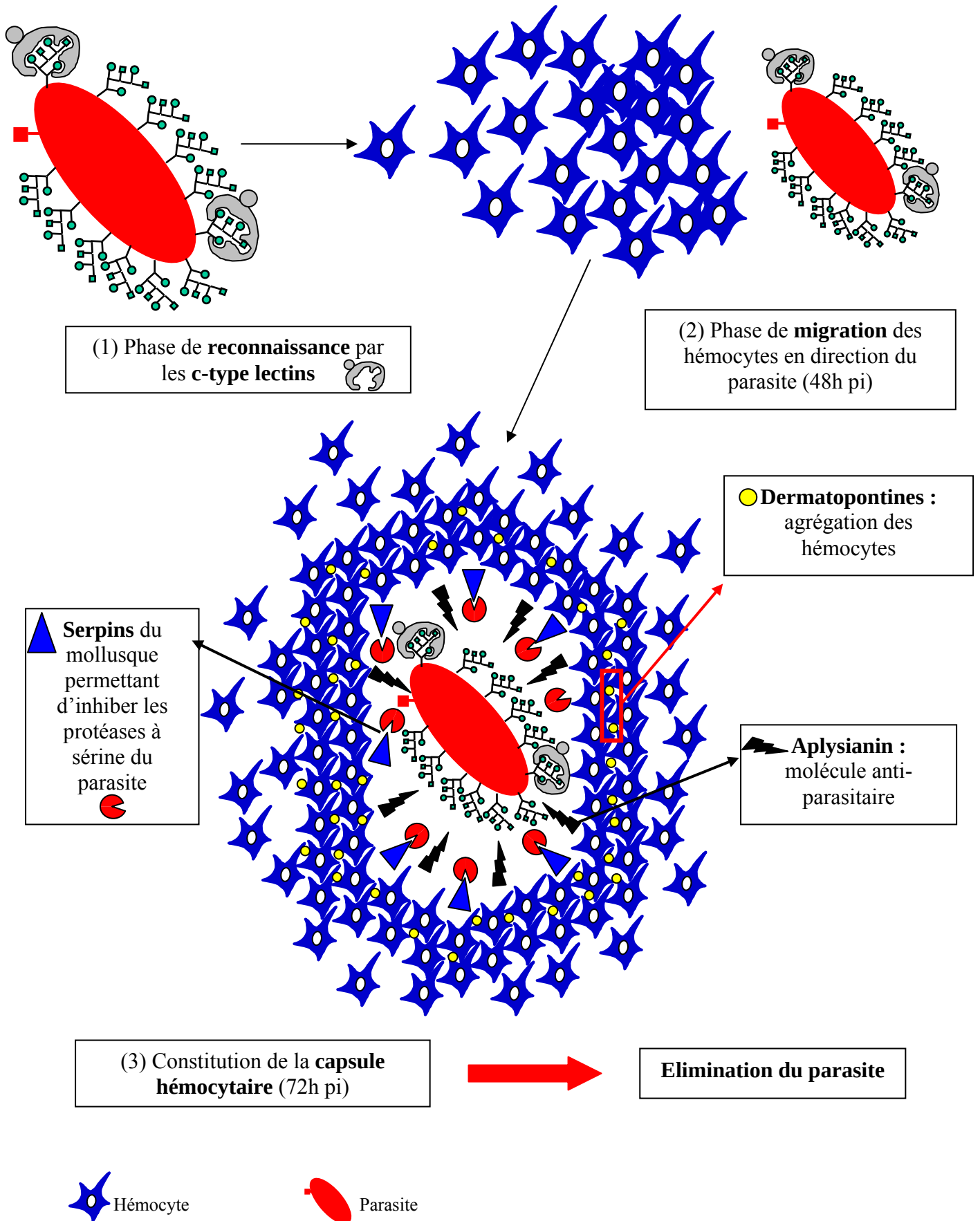


Figure 10 : Mise en situation des candidats identifiés chez les mollusques résistants participant à l'élimination du parasite.

Deux candidats qui présentaient des taux protéiques supérieurs chez les mollusques résistants ont été identifiés à partir des extraits protéiques des hémocytes. Il s'agit d'une protéine de filament intermédiaire et de l'histone H4, chacune présentant des particularités quant à la régulation de l'expression des gènes correspondants à la fois au niveau transcriptionnel et post-traductionnel, que ce soit dans la souche susceptible ou résistante (Bouchut et al., 2006c).

E. La protéine de filament intermédiaire

En ce qui concerne la protéine de filament intermédiaire, un différentiel du taux de protéines et de transcrits a été observé chez les hémocytes issus de mollusques non infestés. Alors que le taux de protéines, qui correspond au produit fonctionnel du gène, est sur-représenté chez les individus résistants, le taux de transcrits est quant à lui supérieur chez les individus susceptibles. Par ailleurs, le différentiel protéique a été mis en évidence sur un produit de clivage correspondant à la partie C-terminale de la protéine de filament intermédiaire. Ce phénomène de clivage d'une protéine de filament intermédiaire a déjà été mis en évidence chez un autre mollusque gastéropode (Perlson et al., 2004). Ce processus pourrait correspondre à une régulation post-traductionnelle par protéolyse de cette protéine, comme c'était le cas dans ce modèle. Un clivage de la protéine de filament intermédiaire beaucoup plus important chez les individus résistants pourrait expliquer le résultat observé. Par conséquent, la protéine de filament intermédiaire complète devrait être sur-représentée chez les mollusques susceptibles. Les protéines de filament intermédiaire correspondent à une des trois familles de protéines (microfilaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires) qui participent à la structuration du cytosquelette. Les filaments intermédiaires sont connectés à la surface des cellules, à l'enveloppe nucléaire ainsi qu'à d'autres structures du cytosquelette tels les microfilaments et les microtubules (Chou et al., 1997). Ils permettent donc le maintien de la forme des cellules, sont responsables en partie des propriétés mécaniques du cytoplasme et de ce fait, peuvent être reliés aux processus d'adhérence. Donc, une régulation différentielle de cette protéine pourrait engendrer une structuration cytosquelettique différente des hémocytes qui pourraient influencer leur mobilité en direction du parasite. D'autre part, l'analyse de la cinétique des transcrits correspondants suite à une infestation par *E. caproni*, a montré que le taux de transcrits augmentait dans les premiers temps chez les mollusques résistants alors qu'à des temps identiques, celui-ci diminuait fortement chez les individus susceptibles. Cette différence très significative pourrait être le

reflet de l'activité immunosuppressive du parasite *via* ses produits d'excrétion-sécrétion qui s'exercerait uniquement chez les individus susceptibles. Ainsi ce phénomène pourrait illustrer une déstructuration induite du cytosquelette chez les mollusques susceptibles qui inhiberait la mobilité hémocytaire en direction du parasite. L'observation concernant la cinétique d'expression des transcrits suggère probablement que le gène codant cette protéine de filament intermédiaire pourrait correspondre à un gène marqueur de l'effet des produits d'excrétion-sécrétion parasites sur les hémocytes. Ce gène pourrait donc servir à la caractérisation des molécules parasites indispensables au dialogue hôte-pathogène.

F. L'histone H4

L'histone H4 appartient à la famille des histones, protéines en interaction constante avec la molécule d'ADN. Les résultats concernant cette protéine sont assez déroutants. En effet, cette protéine présente une localisation aberrante sur les gels réalisés à partir des extraits protéiques provenant des hémocytes issus uniquement des mollusques résistants. Elle se trouve à une position relativement acide (point isoélectrique, $pI < 4$) alors que ce type de protéines présente généralement un pI très basique (pI théorique calculé à partir de sa séquence primaire en acides aminés : 11,36). Ce phénomène a déjà été observé pour la même protéine dans d'autres modèles (<http://www.expasy.org/cgi-bin/nice2dpape.pl?P02304>). Il se pourrait que dans ces différents systèmes, ces protéines subissent des modifications post-traductionnelles majeures. Des travaux récents ont montré que des modifications telles que des acétylations, des méthylations, des phosphorylations pouvaient modifier les histones (Jenuwein & Allis, 2001 ; Peterson & Laniel, 2004) et conduire à de fortes modifications des profils d'expression dans certains types cellulaires (répression ou activation de la transcription) (Freitas-Junior et al., 2005 ; Nie et al., 2005). Chez les eucaryotes, l'assemblage des différentes histones (H2A, H2B, H3 et H4) constitue une structure nommée nucléosome autour duquel le brin d'ADN s'enroule (Worcel et al., 1978). Les histones interagissent avec la molécule d'ADN *via* leurs charges. En effet, leurs résidus lysines leur confèrent une charge globale positive qui leur permettent d'interagir avec le brin d'ADN chargé négativement. Cette interaction pourrait donc être modifiée par les différentes modifications post-traductionnelles qui pourraient avoir lieu sur la protéine. Ces modifications pourraient conduire à un état différent de la chromatine entre hémocytes susceptibles et résistants (compaction/décompaction de la molécule d'ADN liée à la répression/activation de la transcription). Ce phénomène pourrait donc avoir un impact sur les profils d'expression des

hémocytes des deux souches et plus particulièrement sur les gènes impliqués dans la compatibilité. La démonstration de cette hypothèse semble pour le moins ardue dans notre système, à l'heure actuelle.

III. Expression tissulaire : importance de la glande de l'albumine dans la compatibilité ?

L'analyse des transcrits au niveau des différents tissus du mollusque (tête-pied, hépatopancréas, glande de l'albumine et hémocytes) de l'ensemble des candidats identifiés par l'approche protéomique comparative sur le plasma (les CaBP, les mannanases, la cystatine, toutes sur-représentées chez les mollusques susceptibles) a montré qu'ils étaient tous majoritairement exprimés dans la glande de l'albumine (Vergote et al., 2005). Chez les mollusques, cette glande est considérée comme une glande sexuelle accessoire impliquée dans la synthèse du galactogène et des protéines nécessaires au développement de l'œuf (Wijdenes et al., 1983). Néanmoins, cet organe produit également des facteurs importants dans les mécanismes de défense générale des mollusques. En effet, la synthèse d'agglutinine dans la glande de l'albumine des planorbidés (Michelson & Dubois, 1977 ; Stein & Basch, 1979 ; Boswell & Bayne, 1984) ainsi que la synthèse de protéines antibactériennes comme l'aplysianin A (évoquée précédemment) chez les gastéropodes opisthobranches comme *Aplysia kurodai* (Takamatsu et al., 1995) ou *Dolabella auricularia* (Iijima et al., 1994) ont été rapportées. De plus, une étude menée chez *B. glabrata* a mis en évidence des différences dans la composition protéique de cet organe entre souches présentant une susceptibilité différentielle pour *S. mansoni* (Herberts et al., 1989). Dernièrement, l'analyse de la localisation de transcrits correspondant aux gènes BgSSHCLC (C-type lectin) et BgSSHBPI (LBP/BPI), supposés impliqués dans les processus de défense du mollusque, a montré qu'ils étaient tous deux situés dans la glande de l'albumine (Guillou et al., 2006). Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, la glande de l'albumine pourrait jouer un rôle déterminant dans la fonction de défense de *B. glabrata*. Cette hypothèse reste à confirmer notamment en analysant la localisation de l'expression des gènes identifiés lors de cette thèse par la technique de l'hybridation *in situ*. De la même façon que la banque d'ADNc hémocytaires a fourni de nombreuses informations quant aux gènes exprimés dans ces cellules, la réalisation d'une banque d'ADNc à partir de la glande de l'albumine est également envisageable (d'autant plus

qu'une telle banque n'a encore jamais été réalisée), celle-ci serait une nouvelle mine d'informations qui nous permettrait d'analyser de façon plus globale les gènes exprimés dans les cellules de cet organe.

Conclusion

Jusqu'à présent, les travaux qui ont été réalisés sur le modèle *B. glabrata-E. caproni* nous avaient fourni des éléments sur des compartiments ou types cellulaires qui semblaient impliqués dans les processus et mécanismes de la compatibilité. Les résultats obtenus par la combinaison d'approches moléculaires comparatives, lors de ce travail de thèse que l'on peut comparer à un défrichage, fournissent de nombreux candidats pour lesquels de multiples voies de recherche sont à approfondir (Figure 11). En effet, déterminer parmi eux les gènes réellement reliés à la susceptibilité-résistance différentielle des deux souches de mollusques vis à vis de *E. caproni* demeure l'étape indispensable qui doit faire suite à ces travaux. Il ne faut pas perdre de vue que certains des candidats ne pourraient être que des marqueurs de souches sélectionnés en même temps que le caractère compatible ou incompatible lors de la sélection des deux souches. Sans la démonstration de la fonction que nous avons choisie d'attribuer à un gène ou une protéine, nous ne pouvons rien affirmer. Face à ces résultats, nous sommes tout à fait conscients de ne pas pouvoir apporter de réponse définitive quant au problème de la compatibilité et des différents protagonistes participant à ce processus. Dans la perspective de répondre à cette interrogation, une approche biochimique complémentaire est actuellement menée au laboratoire. Elle consiste en la purification et en la caractérisation des facteurs immunosuppresseurs contenus dans les produits d'excrétion-sécrétion d'*E. caproni*. Cette identification (qui pourrait être aiguillée via l'observation du profil d'expression de la protéine de filament intermédiaire de *B. glabrata* en présence de chaque candidat potentiel) devrait nous permettre de nous orienter sur les voies moléculaires ciblées par le parasite chez l'hôte et donc sur les gènes réellement impliqués dans la compatibilité. A un autre niveau, la mise à disposition d'informations de séquence toujours croissantes (environ 12 300 ESTs à ce jour, 10/01/07), l'utilisation de techniques de localisation des ARN messagers et des protéines, la production de protéines recombinantes, la comparaison de nos résultats avec des approches transcriptomiques (puces ADN) en cours, l'existence de la lignée cellulaire Bge ainsi que la mise au point de la technique d'ARN interférence devraient contribuer à l'identification des gènes clés.

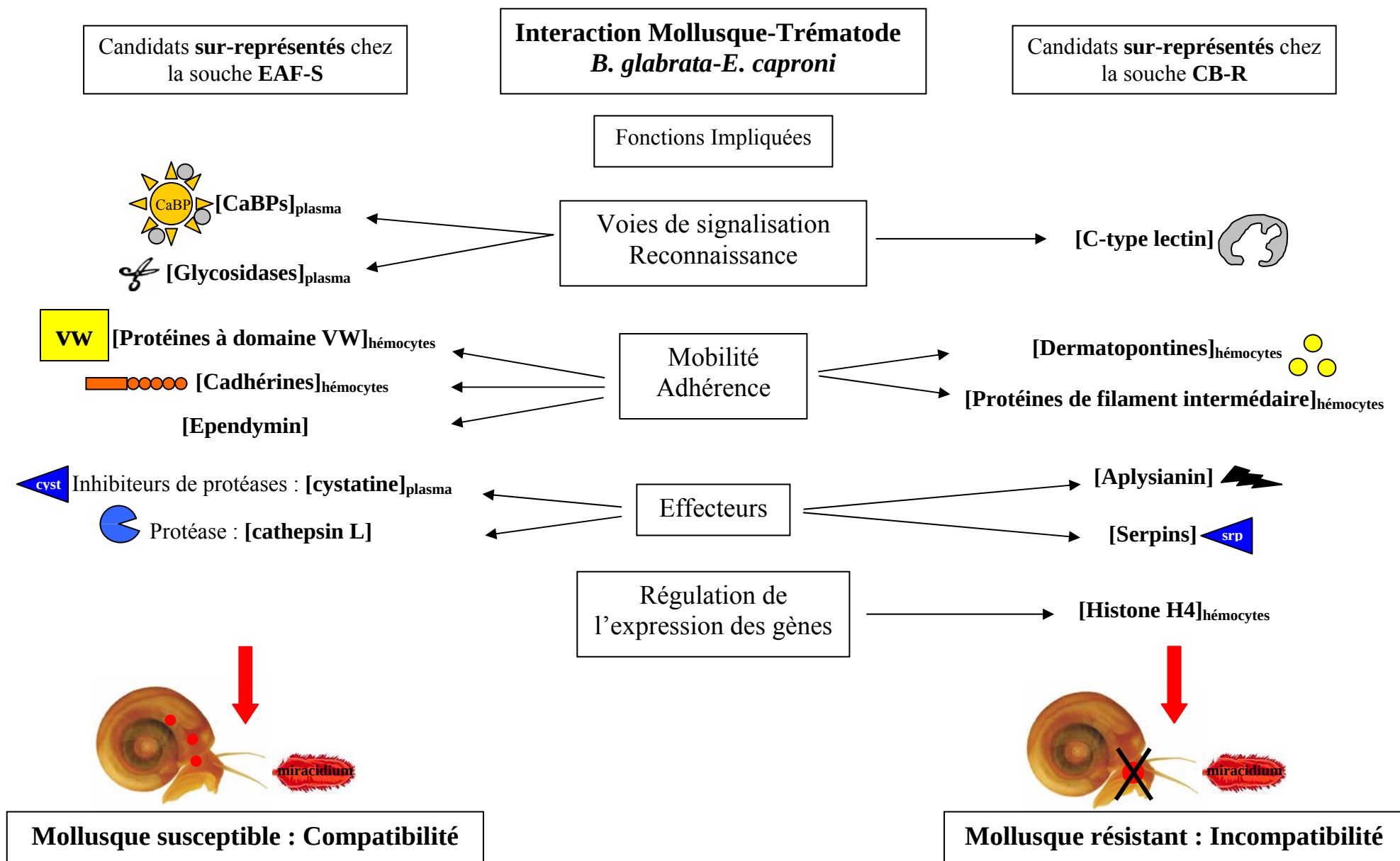


Figure 11 : Schéma récapitulatif des candidats mis en évidence chez les mollusques susceptibles et résistants potentiellement impliqués dans les mécanismes de susceptibilité-résistance.

Références Bibliographiques

A

- Abdel-Hamid, A.H., de Molfetta, J.B., Fernandez, V. and Rodrigues, V. (1999). Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma* infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41(5): 291-295.
- Abraham, E.G., Pinto, S.B., Ghosh, A., Vanlandingham, D.L., Budd, A., Higgs, S., Kafatos, F.C., Jacobs-Lorena, M. and Michel, K. (2005). An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(45): 16327-16332.
- Abraham, L.J. and Kroeger, K.M. (1999). Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 66(4): 562-566.
- Ackerman, H., Usen, S., Jallow, M., Sisay-Joof, F., Pinder, M. and Kwiatkowski, D.P. (2005). A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria. *Ann Hum Genet* 69(Pt 5): 559-565.
- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F. and et al. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252(5013): 1651-1656.
- Adema, C.M., van Deutekom-Mulder, E.C., van der Knaap, W.P., Meuleman, E.A. and Sminia, T. (1991). Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Dev Comp Immunol* 15(1-2): 17-26.
- Adema, C.M., van Deutekom-Mulder, E.C., van der Knaap, W.P. and Sminia, T. (1994). Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology* 109 (Pt 4): 479-485.
- Agarwal, A., Guindo, A., Cissoko, Y., Taylor, J.G., Coulibaly, D., Kone, A., Kayentao, K., Djimde, A., Plowe, C.V., Doumbo, O., Wellems, T.E. and Diallo, D. (2000). Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood* 96(7): 2358-2363.
- Aitman, T.J., Cooper, L.D., Norsworthy, P.J., Wahid, F.N., Gray, J.K., Curtis, B.R., McKeigue, P.M., Kwiatkowski, D., Greenwood, B.M., Snow, R.W., Hill, A.V. and Scott, J. (2000). Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature* 405(6790): 1015-1016.
- Aksoy, S. (2003). Control of tsetse flies and trypanosomes using molecular genetics. *Vet Parasitol* 115(2): 125-145.

- Aksoy, S., Gibson, W.C. and Lehane, M.J. (2003). Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 53: 1-83.
- Alcala-Canto, Y., Alberti-Navarro, A. and Ibarra-Velarde, F. (2006). Serine protease activity demonstrated in the larval stage of the pentastomid *Linguatula serrata*. *Parasitol Res*.
- Allen, S.J., O'Donnell, A., Alexander, N.D., Alpers, M.P., Peto, T.E., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. (1997). alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26): 14736-14741.
- Allen, S.J., O'Donnell, A., Alexander, N.D., Mgone, C.S., Peto, T.E., Clegg, J.B., Alpers, M.P. and Weatherall, D.J. (1999). Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by southeast Asian ovalocytosis band 3. *Am J Trop Med Hyg* 60(6): 1056-1060.
- Allison, A.C. (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* 4857: 290-294.
- Amen, R.I., Baggen, J.M., Bezemer, P.D. and De Jong-Brink, M. (1992). Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology* 104 Pt 1: 33-40.
- Anastasi, A., Brown, M.A., Kembhavi, A.A., Nicklin, M.J., Sayers, C.A., Sunter, D.C. and Barrett, A.J. (1983). Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochem J* 211(1): 129-138.
- Antonovics, J. and Thrall, P. (1994). The Cost of Resistance and the Maintenance of Genetic Polymorphism in Host-Pathogen Systems. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 257(1349): 105-110.
- Apostolopoulos, J., Sparrow, R.L., McLeod, J.L., Collier, F.M., Darcy, P.K., Slater, H.R., Ngu, C., Gregorio-King, C.C. and Kirkland, M.A. (2001). Identification and characterization of a novel family of mammalian endoplasmic reticulum proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic, and malignant tissues. *DNA Cell Biol* 20(10): 625-635.
- Arie, T., Fairhurst, R.M., Brittain, N.J., Wellems, T.E. and Dvorak, J.A. (2005). Hemoglobin C modulates the surface topography of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Struct Biol* 150(2): 163-169.
- Armeanu, S., Buhring, H.J., Reuss-Borst, M., Muller, C.A. and Klein, G. (1995). E-cadherin is functionally involved in the maturation of the erythroid lineage. *J Cell Biol* 131(1): 243-249.
- Armeanu, S., CA, M.U. and Klein, G. (2000). Involvement of E-cadherin in the Development of Erythroid Cells; Subject Heading. *Hematol* 5(4): 307-316.
- Armstrong, P.B. (2006). Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology* 211(4): 263-281.

- Ataev, G.L. and Coustau, C. (1999). Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. *Dev Comp Immunol* 23(3): 187-198.
- Ataev, G.L., Fournier, A. and Coustau, C. (1998). Comparison of *Echinostoma caproni* mother sporocyst development in vivo and in vitro using *Biomphalaria glabrata* snails and a *B. glabrata* embryonic cell line. *J Parasitol* 84(2): 227-235.
- Aucan, C., Walley, A.J., Hennig, B.J., Fitness, J., Frodsham, A., Zhang, L., Kwiatkowski, D. and Hill, A.V. (2003). Interferon-alpha receptor-1 (IFNAR1) variants are associated with protection against cerebral malaria in the Gambia. *Genes Immun* 4(4): 275-282.

B

- Baig, S., Damian, R.T., Molinari, J.L., Tato, P., Morales-Montor, J., Welch, M., Talhouk, J., Hashmeys, R. and White, A.C., Jr. (2005). Purification and characterization of a metacestode cysteine proteinase from *Taenia solium* involved in the breakdown of human IgG. *Parasitology* 131(Pt 3): 411-416.
- Ballweber, L.R. (2006). Endoparasite control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 22(2): 451-461.
- Barnwell, J.W., Asch, A.S., Nachman, R.L., Yamaya, M., Aikawa, M. and Ingravallo, P. (1989). A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Clin Invest* 84(3): 765-772.
- Basch, P.F. (1975). An interpretation of snail-trematode infection rates: Specificity based on concordance of compatible phenotypes. *International Journal for Parasitology* 5(4): 449-452.
- Basch, P.F. (1976). Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 39(1): 150-169.
- Beerntsen, B.T., James, A.A. and Christensen, B.M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1): 115-137.
- Bellamy, R., Kwiatkowski, D. and Hill, A.V. (1998). Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92(3): 312-316.
- Benassi, V., Frey, F. and Carton, Y. (1998). A new specific gene for wasp cellular immune resistance in *Drosophila*. *Heredity* 80 (Pt 3): 347-352.
- Bender, R.C., Broderick, E.J., Goodall, C.P. and Bayne, C.J. (2005). Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H₂O₂ than susceptible snails. *J Parasitol* 91(2): 275-279.

- Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansey, J., Newbold, C.I. and Marsh, K. (1989). Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 341(6237): 57-59.
- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Billingsley, P.F., Medley, G.F., Charlwood, D. and Sinden, R.E. (1994). Relationship between prevalence and intensity of *Plasmodium falciparum* infection in natural populations of *Anopheles* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 51(3): 260-270.
- Blandin, S., Moita, L.F., Kocher, T., Wilm, M., Kafatos, F.C. and Levashina, E.A. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep* 3(9): 852-856.
- Blandin, S., Shiao, S.H., Moita, L.F., Janse, C.J., Waters, A.P., Kafatos, F.C. and Levashina, E.A. (2004). Complement-like protein TEPI is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* 116(5): 661-670.
- Borovsky, D. and Schlein, Y. (1987). Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol* 1(3): 235-242.
- Boswell, C.A. and Bayne, C.J. (1984). Isolation, characterization and functional assessment of a hemagglutinin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Dev Comp Immunol* 8(3): 559-568.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32(3): 314-331.
- Bouchut, A., Coustau, C., Gourbal, B. and Mitta, G. (2006a). Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. *Parasitology*: 1-14.
- Bouchut, A., Roger, E., Coustau, C., Gourbal, B. and Mitta, G. (2006b). Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of adhesion genes. *Int J Parasitol* 36(2): 175-184.
- Bouchut, A., Sautiere, P.E., Coustau, C. and Mitta, G. (2006c). Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. *Acta Trop* 98(3): 234-246.
- Boulanger, N., Brun, R., Ehret-Sabatier, L., Kunz, C. and Bulet, P. (2002a). Immunopeptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei* infections. *Insect Biochem Mol Biol* 32(4): 369-375.
- Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., Svobodova, M., Beverley, S.M., Spath, G., Brun, R., Pesson, B. and Bulet, P. (2004). Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 72(12): 7140-7146.

- Boulanger, N., Munks, R.J., Hamilton, J.V., Vovelle, F., Brun, R., Lehane, M.J. and Bulet, P. (2002b). Epithelial innate immunity. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *J Biol Chem* 277(51): 49921-49926.
- Breton, C.B., Blisnick, T., Jouin, H., Barale, J.C., Rabilloud, T., Langsley, G. and Pereira da Silva, L.H. (1992). *Plasmodium chabaudi* p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9647-9651.
- Burgner, D., Usen, S., Rockett, K., Jallow, M., Ackerman, H., Cervino, A., Pinder, M. and Kwiatkowski, D.P. (2003). Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Hum Genet* 112(4): 379-386.
- Butzke, D., Hurwitz, R., Thiede, B., Goedert, S. and Rudel, T. (2005). Cloning and biochemical characterization of APIT, a new l-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. *Toxicon* 46(5): 479-489.

C

- Campbell, G., Jones, C.S., Lockyer, A.E., Hughes, S., Brown, D., Noble, L.R. and 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(1460): 2351-2358.
- Carton, Y., Bouletreau, M., van Alphen, J. and van Lenteren, J. (1986). The *Drosophila* parasitic wasps. The genetic and biology of *Drosophila* against parasitoids. Ashburner, M., Carson, J.H.L. and Thompson, J.N. New York, Academic Press. 3c: 347-394.
- Carton, Y., Frey, F. and Nappi, A. (1992). Genetic determinism of the cellular immune reaction in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 69 (Pt 5): 393-399.
- Carton, Y. and Nappi, A.J. (1997). *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol Today* 13(6): 218-227.
- Carton, Y., Nappi, A.J. and Poirie, M. (2005). Genetics of anti-parasite resistance in invertebrates. *Dev Comp Immunol* 29(1): 9-32.
- Carvalho, S., Caldeira, R.L., Simpson, A.J. and Vidigal, T.H. (2001). Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). *Parasitology* 123 Suppl: S197-209.
- Castillo, M.G. and Yoshino, T.P. (2002). Carbohydrate inhibition of *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell adhesion to primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 125(Pt 6): 513-525.
- Cattani, J.A., Gibson, F.D., Alpers, M.P. and Crane, G.G. (1987). Hereditary ovalocytosis and reduced susceptibility to malaria in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(5): 705-709.

- Cavaillès, P., Sargent, V., Bisanz, C., Papapietro, O., Colacios, C., Mas, M., Subra, J.F., Lagrange, D., Calise, M., Appolinaire, S., Faraut, T., Druet, P., Saoudi, A., Bessières, M.H., Pipy, B., Cesbron-Delauw, M.F. and Fournie, G.J. (2006). The rat Toxo1 locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3): 744-749.
- Chalk, R., Townson, H. and Ham, P.J. (1995). *Brugia pahangi*: the effects of cecropins on microfilariae in vitro and in *Aedes aegypti*. *Exp Parasitol* 80(3): 401-406.
- Chen, C.C. and Chen, C.S. (1995). *Brugia pahangi*: effects of melanization on the uptake of nutrients by microfilariae in vitro. *Exp Parasitol* 81(1): 72-78.
- Chen, C.C. and Laurence, B.R. (1985). An ultrastructural study on the encapsulation of microfilariae of *Brugia pahangi* in the haemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*. *Int J Parasitol* 15(4): 421-428.
- Chen, Q., Johnson, D.M., Haudenschild, D.R., Tondravi, M.M. and Goetinck, P.F. (1995). Cartilage matrix protein forms a type II collagen-independent filamentous network: analysis in primary cell cultures with a retrovirus expression system. *Mol Biol Cell* 6(12): 1743-1753.
- Chen, Q., Zhang, Y., Johnson, D.M. and Goetinck, P.F. (1999). Assembly of a novel cartilage matrix protein filamentous network: molecular basis of differential requirement of von Willebrand factor A domains. *Mol Biol Cell* 10(7): 2149-2162.
- Chikilian, M.L., Bradley, T.J., Nayar, J.K. and Knight, J.W. (1994). Ultrastructural comparison of extracellular and intracellular encapsulation of *Brugia malayi* in *Anopheles quadrimaculatus*. *J Parasitol* 80(1): 133-140.
- Chitnis, C.E. and Miller, L.H. (1994). Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 180(2): 497-506.
- Choi, H.U., Johnson, T.L., Pal, S., Tang, L.H., Rosenberg, L. and Neame, P.J. (1989). Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J Biol Chem* 264(5): 2876-2884.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Pattanapanyasat, K., Chierakul, W., Simpson, J., Looareesuwan, S. and White, N. (2002). Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* 100(4): 1172-1176.
- Chou, Y.H., Skalli, O. and Goldman, R.D. (1997). Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. *Curr Opin Cell Biol* 9(1): 49-53.
- Christensen, B.M. (1981). Observations on the immune response of *Aedes trivittatus* against *Dirofilaria immitis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75(3): 439-443.
- Christensen, B.M. and Forton, K.F. (1986). Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*. *J Parasitol* 72(2): 220-225.

- Christensen, B.M., Sutherland, D.R. and Gleason, L.N. (1984). Defense reactions of mosquitoes to filarial worms: comparative studies on the response of three different mosquitoes to inoculated *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* microfilariae. *J Invertebr Pathol* 44(3): 267-274.
- Christensen, B.M. and Tracy, J.W. (1989). Arthropod-transmitted parasites: mechanisms of immune interaction. *Am Zool* 29: 387-389.
- 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. and Kafatos, F.C. (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298(5591): 159-165.
- Cockburn, I.A., Mackinnon, M.J., O'Donnell, A., Allen, S.J., Moulds, J.M., Baisor, M., Bockarie, M., Reeder, J.C. and Rowe, J.A. (2004). A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 272-277.
- Collins, F.H., Sakai, R.K., Vernick, K.D., Paskewitz, S., Seeley, D.C., Miller, L.H., Collins, W.E., Campbell, C.C. and Gwadz, R.W. (1986). Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* 234(4776): 607-610.
- Colombatti, A., Bonaldo, P. and Doliana, R. (1993). Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix* 13(4): 297-306.
- Combes, C. (1995). *Interactions durables, Ecologie et évolution du parasitisme*. Paris, Editions Masson.
- Coustau, C. and Theron, A. (2004). Resistant or resisting: seeking consensus terminology. *Trends Parasitol* 20(5): 209-210.
- Coustau, C. and Yoshino, T.P. (2000). Flukes without snails: advances in the *in vitro* cultivation of intramolluscan stages of trematodes. *Exp Parasitol* 94(1): 62-66.
- Couvreux, J., Desmonts, G. and Girre, J.Y. (1976). Congenital toxoplasmosis in twins: a series of 14 pairs of twins: absence of infection in one twin in two pairs. *J Pediatr* 89(2): 235-240.
- Cronshaw, A.D., MacBeath, J.R., Shackleton, D.R., Collins, J.F., Fothergill-Gilmore, L.A. and Hulmes, D.J. (1993). TRAMP (tyrosine rich acidic matrix protein), a protein that co-purifies with lysyl oxidase from porcine skin. Identification of TRAMP as the dermatan sulphate proteoglycan-associated 22K extracellular matrix protein. *Matrix* 13(3): 255-266.

D

- Dalton, J.P., Neill, S.O., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy, G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moire, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maule, A.G. and Donnelly, S.M. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 33(11): 1173-1181.
- Damian, R.T. (1987). Molecular mimicry revisited. *Parasitol Today* 3(9): 263-266.
- Davids, B.J. and Yoshino, T.P. (1998). Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes. *Dev Comp Immunol* 22(1): 39-53.
- DeGaffe, G. and Loker, E.S. (1998). 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* 71(1): 64-72.
- Diallo, D.A., Doumbo, O.K., Dicko, A., Guindo, A., Coulibaly, D., Kayentao, K., Djimde, A.A., Thera, M.A., Fairhurst, R.M., Plowe, C.V. and Wellem, T.E. (2004). A comparison of anemia in hemoglobin C and normal hemoglobin A children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop* 90(3): 295-299.
- Diez-Tascon, C., Keane, O.M., Wilson, T., Zadissa, A., Hyndman, D.L., Baird, D.B., McEwan, J.C. and Crawford, A.M. (2005). Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. *Physiol Genomics* 21(1): 59-69.
- Dikkeboom, R., Bayne, C.J., van der Knaap, W.P. and Tijnagel, J.M. (1988a). Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitol Res* 75(2): 148-154.
- Dikkeboom, R., Tijnagel, J.M., Mulder, E.C. and van der Knaap, W.P. (1987). Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. *J Invertebr Pathol* 49(3): 321-331.
- Dikkeboom, R., van der Knaap, W.P., van den Bovenkamp, W., Tijnagel, J.M. and Bayne, C.J. (1988b). The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. *Dev Comp Immunol* 12(3): 509-520.
- Dimopoulos, G., Christophides, G.K., Meister, S., Schultz, J., White, K.P., Barillas-Mury, C. and Kafatos, F.C. (2002). Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 8814-8819.
- Dissous, C., Grzych, J.M. and Capron, A. (1986). *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature* 323(6087): 443-445.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 263(20): 9557-9560.

- Drickamer, K. (1992). Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 360(6400): 183-186.
- Drickamer, K. and Taylor, M.E. (1993). Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* 9: 237-264.
- Dubey, J.P. and Frenkel, J.K. (1998). Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol* 77(1): 1-32.
- Duclermortier, P., Lardans, V., Serra, E., Trottein, F. and Dissous, C. (1999). *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins. *Parasitol Res* 85(6): 481-486.
- Dupas, S. and Boscaro, M. (1999). Geographic variation and evolution of immune suppressive genes in a *Drosophila* parasitoid. *Echography* 22: 284-291.

E

- Esch, G.W. and Fernandez, J.C. (1994). Snail-trematode interaction and parasite community dynamics in aquatic systems: A review. *American Midland Naturalist* 131: 209-237.

F

- Facer, C.A. (1983). Merozoites of *Plasmodium falciparum* require glycophorin for invasion into red cells. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 76(5): 463-469.
- Fairhurst, R.M., Baruch, D.I., Brittain, N.J., Ostera, G.R., Wallach, J.S., Hoang, H.L., Hayton, K., Guindo, A., Makobongo, M.O., Schwartz, O.M., Tounkara, A., Doumbo, O.K., Diallo, D.A., Fujioka, H., Ho, M. and Wellems, T.E. (2005). Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. *Nature* 435(7045): 1117-1121.
- Fernandez-Reyes, D., Craig, A.G., Kyes, S.A., Peshu, N., Snow, R.W., Berendt, A.R., Marsh, K. and Newbold, C.I. (1997). A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet* 6(8): 1357-1360.
- Fletcher, M., LoVerde, P.T. and Richards, C.S. (1981). *Schistosoma mansoni*: electrophoretic characterization of strains selected for different levels of infectivity to snails. *Exp Parasitol* 52(3): 362-370.
- Flint, J., Harding, R.M., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. (1998). The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 11(1): 1-51.
- Flint, J., Hill, A.V., Bowden, D.K., Oppenheimer, S.J., Sill, P.R., Serjeantson, S.W., Bana-Koiri, J., Bhatia, K., Alpers, M.P., Boyce, A.J. and et al. (1986). High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature* 321(6072): 744-750.

- Flori, L., Delahaye, N.F., Iraqi, F.A., Hernandez-Valladares, M., Fumoux, F. and Rihet, P. (2005). TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso. *Genes Immun* 6(6): 472-480.
- Flori, L., Sawadogo, S., Esnault, C., Delahaye, N.F., Fumoux, F. and Rihet, P. (2003). Linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in families living in Burkina Faso. *Hum Mol Genet* 12(4): 375-378.
- Foo, L.C., Rekhraj, V., Chiang, G.L. and Mak, J.W. (1992). Ovalocytosis protects against severe malaria parasitemia in the Malayan aborigines. *Am J Trop Med Hyg* 47(3): 271-275.
- Frank, S.A. (1991). Ecological and genetic models of host-pathogen coevolution. *Heredity* 67 (Pt 1): 73-83.
- Frank, S.A. (1992). Models of plant-pathogen coevolution. *Trends Genet* 8(6): 213-219.
- Frank, S.A. (1993). Coevolutionary genetics of plants and pathogens. *Evolutionary Ecology* 7(1): 45-75.
- Freitas-Junior, L.H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S.A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O.K., Rojas-Meza, A.P., Mancio-Silva, L., Leal-Silvestre, R.J., Gontijo, A.M., Shorte, S. and Scherf, A. (2005). Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell* 121(1): 25-36.
- Fryer, S.E. and Bayne, C.J. (1990). *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 76(1): 45-52.
- Fujii, N., Minetti, C.A., Nakhasi, H.L., Chen, S.W., Barbehenn, E., Nunes, P.H. and Nguyen, N.Y. (1992). Isolation, cDNA cloning, and characterization of an 18-kDa hemagglutinin and amebocyte aggregation factor from *Limulus polyphemus*. *J Biol Chem* 267(31): 22452-22459.

G

- Ganczakowski, M., Town, M., Bowden, D.K., Vulliamy, T.J., Kaneko, A., Clegg, J.B., Weatherall, D.J. and Luzzatto, L. (1995). Multiple glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the Vanuatu archipelago (southwestern Pacific). *Am J Hum Genet* 56(1): 294-301.
- Garreis, K.A., La Peyre, J.F. and Faisal, M. (1996). The effects of *Perkinsus marinus* extracellular products and purified proteases on oyster defence parameters *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology* 6(8): 581-597.
- Gasbarre, L.C. and Canals, A. (1989). Induction of protective immunity in calves immunized with adult *Oesophagostomum radiatum* somatic antigens. *Vet Parasitol* 34(3): 223-238.

- Gasbarre, L.C., Leighton, E.A. and Davies, C.J. (1990). Genetic control of immunity to gastrointestinal nematodes of cattle. *Vet Parasitol* 37(3-4): 257-272.
- Gasbarre, L.C., Leighton, E.A. and Sonstegard, T. (2001). Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 98(1-3): 51-64.
- Genton, B., al-Yaman, F., Mgone, C.S., Alexander, N., Paniu, M.M., Alpers, M.P. and Mokela, D. (1995). Ovalocytosis and cerebral malaria. *Nature* 378(6557): 564-565.
- Gibson, D.I. and Bray, R.A. (1994). The evolutionary expansion and host-parasite relationships of the Digenea. *Int J Parasitol* 24(8): 1213-1226.
- Gibson, W. and Bailey, M. (2003). The development of *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly midgut observed using green fluorescent trypanosomes. *Kinetoplastid Biol Dis* 2(1): 1.
- Gilles, H.M., Fletcher, K.A., Hendrickse, R.G., Lindner, R., Reddy, S. and Allan, N. (1967). Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria. *Lancet* 1(7482): 138-140.
- Gottsch, J.D., Eisinger, S.W., Liu, S.H. and Scott, A.L. (1999). Calgranulin C has filariacidal and filariastatic activity. *Infect Immun* 67(12): 6631-6636.
- Grubhoffer, L., Hypsa, V. and Volf, P. (1997). Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. *Parasite* 4(3): 203-216.
- Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R. and Coustau, C. (2006). Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol*.
- Gutierrez, A., Pointier, J.P., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Perez, R.T., Yong, M., Sanchez, J., Loker, E.S. and Theron, A. (2003). *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Exp Parasitol* 105(3-4): 211-218.

H

- Hadley, T.J., Klotz, F.W., Pasvol, G., Haynes, J.D., McGinniss, M.H., Okubo, Y. and Miller, L.H. (1987). *Falciparum* malaria parasites invade erythrocytes that lack glycophorin A and B (MkMk). Strain differences indicate receptor heterogeneity and two pathways for invasion. *J Clin Invest* 80(4): 1190-1193.
- Haldane, J.B.S. (1949). Disease and evolution. *Ricerca Sci Suppl* 19: 3-10.
- Hansen, E.L. (1976). A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics. *Invertebrate Tissue Culture*. Maramorsch, K. New York, Academic Press: 75-99.
- Hao, Z., Kasumba, I. and Aksoy, S. (2003). Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem Mol Biol* 33(11): 1155-1164.

- Hao, Z., Kasumba, I., Lehane, M.J., Gibson, W.C., Kwon, J. and Aksoy, S. (2001). Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12648-12653.
- Harnett, W. and Harnett, M.M. (2001). Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes. *Biochim Biophys Acta* 1539(1-2): 7-15.
- Hartmann, S. and Lucius, R. (2003). Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol* 33(11): 1291-1302.
- Hawkins, J.A. (1993). Economic benefits of parasite control in cattle. *Vet Parasitol* 46(1-4): 159-173.
- Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M. and Hultmark, D. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell* 4(5): 827-837.
- Herberts, C., de Frescheville, J., Quignon, M. and Golvan, Y.J. (1989). A comparative study of the protein composition of the albumen gland of two populations of *Biomphalaria glabrata* (SAY) differing in their susceptibility to *Schistosoma mansoni* (SAMBON). 10.1093/mollus/55.3.373. *J. Mollus. Stud.* 55(3): 373-377.
- Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J. and Greenwood, B.M. (1991). Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352(6336): 595-600.
- Hobbs, M.R., Udayakumar, V., Levesque, M.C., Booth, J., Roberts, J.M., Tkachuk, A.N., Pole, A., Coon, H., Kariuki, S., Nahlen, B.L., Mwaikambo, E.D., Lal, A.L., Granger, D.L., Anstey, N.M. and Weinberg, J.B. (2002). A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 360(9344): 1468-1475.
- Hoffmann, W. and Schwarz, H. (1996). Ependymins: meningeal-derived extracellular matrix proteins at the blood-brain barrier. *Int Rev Cytol* 165: 121-158.
- Hu, C. and Aksoy, S. (2006). Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Mol Microbiol* 60(5): 1194-1204.
- Hu, Y. and Aksoy, S. (2005). An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35(2): 105-115.
- Humbert, E. and Coustau, C. (2001). Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata*-*Echinostoma caproni* system. *Parasitology* 122(Pt 6): 651-660.

Humphries, J.E. and Yoshino, T.P. (2006). *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products stimulate a p38 signalling pathway in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Int J Parasitol* 36(1): 37-46.

I

Ibrahim, E.A., Ingram, G.A. and Molyneux, D.H. (1984). Haemagglutinins and parasite agglutinins in haemolymph and gut of *Glossina*. *Tropenmed Parasitol* 35(3): 151-156.

Iijima, R., Kisugi, J. and Yamazaki, M. (1994). Biopolymers from marine invertebrates. XIV. Antifungal property of Dolabellin A, a putative self-defense molecule of the sea hare, *Dolabella auricularia*. *Biol Pharm Bull* 17(8): 1144-1146.

Ilg, T., Stierhof, Y.D., Wiese, M., McConville, M.J. and Overath, P. (1994). Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*. *Parasitology* 108 Suppl: S63-71.

Ingram, G.A. and Molyneux, D.H. (1988). Sugar specificities of anti-human ABO (H) blood group erythrocyte agglutinins (lectins) and hemolytic activity in the hemolymph and gut extracts of *Glossina* species. *Insect Biochemistry* 18: 269-279.

Irwin, J.A., Morrissey, P.E., Ryan, J.P., Walshe, A., O'Neill, S.M., Carrington, S.D., Matthews, E., Fitzpatrick, E., Mulcahy, G., Corfield, A.P. and Dalton, J.P. (2004). Glycosidase activity in the excretory-secretory products of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 129(Pt 4): 465-472.

Ivanchenko, M.G., Lerner, J.P., McCormick, R.S., Toumadje, A., Allen, B., Fischer, K., Hedstrom, O., Helmrich, A., Barnes, D.W. and Bayne, C.J. (1999). Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 4965-4970.

J

Jacob, H.J. and Kwitek, A.E. (2002). Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* 3(1): 33-42.

Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293(5532): 1074-1080.

Jeyarassasingam, U., Heyneman, D., Lim, H.K. and Mansour, N. (1972). Life cycle of a new echinostome from Egypt, *Echinostoma liei* sp.nov. (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology* 65(2): 203-222.

Johnston, L.A. and Yoshino, T.P. (2001). Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. *J Parasitol* 87(4): 786-793.

Jones, C.S., Lockyer, A.E., Rollinson, D. and Noble, L.R. (2001). Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata*-*Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. *Parasitology* 123 Suppl: S181-196.

- Jones, C.S., Lockyer, A.E., Rollinson, D., Piertney, S.B. and Noble, L.R. (1999). Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Mol Ecol* 8(12): 2149-2151.
- Jourdane, J. and Mounkassa, J.B. (1986). Topographic shifting of primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria pfeifferi* as a result of coinfection with *Echinostoma caproni*. *J Invertebr Pathol* 48(3): 269-274.
- Jourdane, J. and Theron, A. (1987). The Biology of Schistosomes. Rollinson, D. and Simpson, A.J.: 83-113.

K

- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22(9): 439-445.
- Kamhawi, S., Modi, G.B., Pimenta, P.F., Rowton, E. and Sacks, D.L. (2000). The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology* 121 (Pt 1): 25-33.
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V.M., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Barillas-Mury, C., Sacks, D.L. and Valenzuela, J.G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119(3): 329-341.
- Kang, Y.S., Kim, Y.M., Park, K.I., Kim Cho, S., Choi, K.S. and Cho, M. (2006). Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev Comp Immunol* 30(12): 1119-1131.
- Keane, O.M., Zadissa, A., Wilson, T., Hyndman, D.L., Greer, G.J., Baird, D.B., McCulloch, A.F., Crawford, A.M. and McEwan, J.C. (2006). Gene expression profiling of naive sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes. *BMC Genomics* 7: 42.
- Kempf, M.C., Cesbron-Delauw, M.F., Deslee, D., Gross, U., Herrmann, T. and Sutton, P. (1999). Different manifestations of *Toxoplasma gondii* infection in F344 and LEW rats. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 187(3): 137-142.
- Knight, J.C., Udalova, I., Hill, A.V., Greenwood, B.M., Peshu, N., Marsh, K. and Kwiatkowski, D. (1999a). A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 22(2): 145-150.
- Knight, M., Brindley, P.J., Richards, C.S. and Lewis, F.A. (1991). *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment length polymorphisms in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol* 73(3): 285-294.
- Knight, M., Miller, A.N., Geoghagen, N.S.M., Lewis, F.A. and Kerlavage, A.R. (1998). Expressed Sequence Tags (ESTs) of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of

- Schistosoma mansoni*: use in the identification of RFLPs markers. *Malacologia* 39: 175-182.
- Knight, M., Miller, A.N., Patterson, C.N., Rowe, C.G., Michaels, G., Carr, D., Richards, C.S. and Lewis, F.A. (1999b). The identification of markers segregating with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1510-1515.
- Knight, M., Ongele, E. and Lewis, F.A. (2000). Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 30(4): 535-541.
- Koch, O., Awomoyi, A., Usen, S., Jallow, M., Richardson, A., Hull, J., Pinder, M., Newport, M. and Kwiatkowski, D. (2002). IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria. *J Infect Dis* 185(11): 1684-1687.
- Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. and Sato, R. (1999). The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Lett* 443(2): 139-143.
- Korstanje, R. and Paigen, B. (2002). From QTL to gene: the harvest begins. *Nat Genet* 31(3): 235-236.
- Kun, J.F., Klabunde, J., Lell, B., Luckner, D., Alpers, M., May, J., Meyer, C. and Kremsner, P.G. (1999). Association of the ICAM-1 Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 61(5): 776-779.
- Kun, J.F., Mordmuller, B., Lell, B., Lehman, L.G., Luckner, D. and Kremsner, P.G. (1998). Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet* 351(9098): 265-266.
- Kwiatkowski, D.P. (2005). How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 77(2): 171-192.
- Kyes, S., Horrocks, P. and Newbold, C. (2001). Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol* 55: 673-707.

L

- Lang, T., Warburg, A., Sacks, D.L., Croft, S.L., Lane, R.P. and Blackwell, J.M. (1991). Transmission and scanning EM-immunogold labeling of *Leishmania major* lipophosphoglycan in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Eur J Cell Biol* 55(2): 362-372.
- Langand, J., Jourdane, J., Coustau, C., Delay, B. and Morand, S. (1998). Cost of resistance, expressed as a delayed maturity, detected in the host-parasite system *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni*. *Heredity* 80: 320-325.
- Langand, J. and Morand, S. (1998). Heritable non-susceptibility in an allopatric host-parasite system: *Biomphalaria glabrata* (Mollusca)-*Echinostoma caproni* (platyhelminth Digenea). *J Parasitol* 84(4): 739-742.

- Lardans, V., Boulo, V., Duclermortier, P., Serra, E., Mialhe, E., Capron, A. and Dissous, C. (1996). DNA transfer in a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line by DOTAP lipofection. *Parasitol Res* 82(6): 574-576.
- Larson, S.E., Anderson, P.L., Miller, A.N., Cousin, C.E., Richards, C.S., Lewis, F.A. and Knight, M. (1996). Use of RAPD-PCR to differentiate genetically defined lines of an intermediate host of *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 82(2): 237-244.
- Laursen, J.R., di Liu, H., Wu, X.J. and Yoshino, T.P. (1997). Heat-shock response in a molluscan cell line: characterization of the response and cloning of an inducible HSP70 cDNA. *J Invertebr Pathol* 70(3): 226-233.
- Laursen, J.R. and Yoshino, T.P. (1999). *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports in vitro miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. *Parasitology* 118 (Pt 2): 187-194.
- Lawyer, P.G., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O., Odongo, S.O., Mebrahtu, Y.B., Githure, J.I., Koech, D.K. and Roberts, C.R. (1990). Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 43(1): 31-43.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. and Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol* 171(2): 249-269.
- Lehane, M.J. and Msangi, A.R. (1991). Lectin and peritrophic membrane development in the gut of *Glossina m.morsitans* and a discussion of their role in protecting the fly against trypanosome infection. *Med Vet Entomol* 5(4): 495-501.
- Lehr, T., Geyer, H., Maass, K., Doenhoff, M.J. and Geyer, R. (2007). Structural characterization of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Glycobiology* 17(1): 82-103.
- Leighton, E.A., Murrell, K.D. and Gasbarre, L.C. (1989). Evidence for genetic control of nematode egg-shedding rates in calves. *J Parasitol* 75(4): 498-504.
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R.S., Abrams, J.M. and Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* 1(4): 353-358.
- Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M. and 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(5): 709-718.
- Lewis, F.A., Knight, M. and Richards, C.S. (1997). A laboratory-based approach to biological control of snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(5): 661-662.
- Lewis, F.A., Patterson, C.N., Knight, M. and Richards, C.S. (2001). The relationship between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*: genetic and molecular approaches. *Parasitology* 123 Suppl: S169-179.

- Lewit-Bentley, A. and Rety, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10(6): 637-643.
- Liang, P. and Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257(5072): 967-971.
- Lie, K.J. (1982). Swellengrebel lecture: Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. A discussion of the interference theory. *Trop Geogr Med* 34(2): 111-122.
- Lie, K.J. and Heyneman, D. (1976). Studies on resistance in snails. 3. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 62(1): 51-58.
- Lie, K.J. and Heyneman, D. (1977). Studies on resistance in snails: interference by nonirradiated echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *J Invertebr Pathol* 29(2): 118-125.
- Lie, K.J. and Heyneman, D. (1979). Capacity of irradiated echinostome sporocysts to protect *Schistosoma mansoni* in resistant *Biomphalaria glabrata*. *Int J Parasitol* 9(6): 539-543.
- Lightowers, M.W. and Rickard, M.D. (1988). Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology* 96 Suppl: S123-166.
- Liu, C.T., Hou, R.F., Ashida, M. and Chen, C.C. (1997). Effects of inhibitors of serine protease, phenoloxidase and dopa decarboxylase on the melanization of *Dirofilaria immitis* microfilariae with *Armigeres subalbatus* haemolymph in vitro. *Parasitology* 115 (Pt 1): 57-68.
- Liu, J., Istvan, E.S., Gluzman, I.Y., Gross, J. and Goldberg, D.E. (2006). *Plasmodium falciparum* ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23): 8840-8845.
- Lo, C.T. and Lee, K.M. (1995). *Schistosoma japonicum*, zoophilic strain, in *Oncomelania hupensis chiui* and *O. H. formosana*: miracidial penetration and comparative histology. *J Parasitol* 81(5): 708-713.
- Lockyer, A.E., Jones, C.S., Noble, L.R. and Rollinson, D. (2000). Use of differential display to detect changes in gene expression in the intermediate snail host *Biomphalaria glabrata* upon infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 120 (Pt 4): 399-407.
- Lockyer, A.E., Noble, L.R., Rollinson, D. and Jones, C.S. (2004). *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Exp Parasitol* 107(1-2): 97-104.
- Lockyer, A.E., Spinks, J., Noble, L.R., Rollinson, D. and Jones, C.S. (2006). Identification of genes involved in interactions between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* by suppression subtractive hybridization. *Mol Biochem Parasitol*.

- Lodes, M.J., Connors, V.A. and Yoshino, T.P. (1991). Isolation and functional characterization of snail hemocyte-modulating polypeptide from primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 49(1): 1-10.
- Lodes, M.J. and Yoshino, T.P. (1990). The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. *J Invertebr Pathol* 56(1): 75-85.
- Loker, E.S. (1978). *Schistosomatium douthitti*: exposure of *Lymnaea catascopium* to irradiated miracidia. *Exp Parasitol* 46(2): 134-140.
- Loker, E.S. and Adema, C.M. (1995). Schistosomes, Echinostomes and Snails: Comparative Immunobiology. *Parasitology Today* 11(3): 120-124.
- Loker, E.S., Bayne, C.J. and Yui, M.A. (1986). *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 62(1): 149-154.
- Loria, P., Miller, S., Foley, M. and Tilley, L. (1999). Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem J* 339 (Pt 2): 363-370.
- Loukopoulos, D. (1991). Thalassemia: genotypes and phenotypes. *Ann Hematol* 62(4): 85-94.
- Lowenberger, C., Bulet, P., Charlet, M., Hetru, C., Hodgeman, B., Christensen, B.M. and Hoffmann, J.A. (1995). Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 25(7): 867-873.
- Lowenberger, C.A., Ferdig, M.T., Bulet, P., Khalili, S., Hoffmann, J.A. and Christensen, B.M. (1996). *Aedes aegypti*: induced antibacterial proteins reduce the establishment and development of *Brugia malayi*. *Exp Parasitol* 83(2): 191-201.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X. and Xu, X. (2006). Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 30(7): 607-617.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z. and Xu, X. (2003). PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Lett* 551(1-3): 53-57.
- Luoni, G., Verra, F., Arca, B., Sirima, B.S., Troye-Blomberg, M., Coluzzi, M., Kwiatkowski, D. and Modiano, D. (2001). Antimalarial antibody levels and IL4 polymorphism in the Fulani of West Africa. *Genes Immun* 2(7): 411-414.
- Luty, A.J., Kun, J.F. and Kremsner, P.G. (1998). Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 178(4): 1221-1224.
- Luzzatto, L., Usanga, F.A. and Reddy, S. (1969). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* 164(881): 839-842.

M

- MacDonald, W.W. (1962a). The genetic basis of susceptibility to infection with semi-periodic *Brugia malayi* in *Aedes aegypti*. Ann Trop Med Parasit 56: 373-382.
- MacDonald, W.W. (1962b). The selection of a strain of *Aedes aegypti* susceptible to infection with semi-periodic *Brugia malayi*. Ann Trop Med Parasit 56: 368-372.
- Macdonald, W.W. and Ramachandran, C.P. (1965). The Influence of the Gene Fm (Filarial Susceptibility, *Brugia Malayi*) on the Susceptibility of *Aedes Aegypti* to Seven Strains of *Brugia*, *Wuchereria* and *Dirofilaria*. Ann Trop Med Parasitol 59: 64-73.
- Macdonald, W.W. and Sheppard, P.M. (1965). Cross-over Values in the Sex Chromosomes of the Mosquito *Aedes Aegypti* and Evidence of the Presence of Inversions. Ann Trop Med Parasitol 59: 74-87.
- Mahoney, A.B., Sacks, D.L., Saraiva, E., Modi, G. and Turco, S.J. (1999). Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. Biochemistry 38(31): 9813-9823.
- Maier, A.G., Duraisingh, M.T., Reeder, J.C., Patel, S.S., Kazura, J.W., Zimmerman, P.A. and Cowman, A.F. (2003). *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. Nat Med 9(1): 87-92.
- Makihira, S., Yan, W., Ohno, S., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Okimura, A., Yoshida, E., Noshiro, M., Hamada, T. and Kato, Y. (1999). Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage-specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein (CMP/Matrilin-1), via integrin alpha1beta1. J Biol Chem 274(16): 11417-11423.
- Marshall, J.J. (1973). Purification of a -1,4-glucan hydrolase (cellulase) from the snail, *Helix pomatia*. Comp Biochem Physiol B 44(4): 981-988.
- Marti, T., Erttmann, K.D. and Gallin, M.Y. (1996). Host-parasite interaction in human onchocerciasis: identification and sequence analysis of a novel human calgranulin. Biochem Biophys Res Commun 221(2): 454-458.
- Martin, K.J. and Pardee, A.B. (1999). Principles of differential display. Methods Enzymol 303: 234-258.
- Marxen, J.C., Nimtz, M., Becker, W. and Mann, K. (2003). The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. Biochim Biophys Acta 1650(1-2): 92-98.
- Mathieu-Daude, F., Cheng, R., Welsh, J. and McClelland, M. (1996). Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels. Nucleic Acids Res 24(8): 1504-1507.
- Matricon-Gondran, M. and Letocart, M. (1999). Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. J Invertebr Pathol 74(3): 248-254.

- Maudlin, I. and Welburn, S.C. (1987). Lectin mediated establishment of midgut infections of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* in *Glossina morsitans*. *Trop Med Parasitol* 38(3): 167-170.
- Mavarez, J., Amarista, M., Pointier, J.P. and Jarne, P. (2000). Microsatellite variation in the freshwater schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Mol Ecol* 9(7): 1009-1011.
- Mayor, A., Bir, N., Sawhney, R., Singh, S., Pattnaik, P., Singh, S.K., Sharma, A. and Chitnis, C.E. (2005). Receptor-binding residues lie in central regions of Duffy-binding-like domains involved in red cell invasion and cytoadherence by malaria parasites. *Blood* 105(6): 2557-2563.
- McCarthy, J. and Moore, T.A. (2000). Emerging helminth zoonoses. *Int J Parasitol* 30(12-13): 1351-1360.
- McCleary, B.V. and Matheson, N.K. (1986). Enzymic analysis of polysaccharide structure. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 44: 147-276.
- McConville, M.J., Schnur, L.F., Jaffe, C. and Schneider, P. (1995). Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J* 310 (Pt 3): 807-818.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A. and Sacks, D.L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Embo J* 11(10): 3593-3600.
- McGreal, E.P., Martinez-Pomares, L. and Gordon, S. (2004). Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol* 41(11): 1109-1121.
- McGuire, W., Hill, A.V., Allsopp, C.E., Greenwood, B.M. and Kwiatkowski, D. (1994). Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371(6497): 508-510.
- McGuire, W., Knight, J.C., Hill, A.V., Allsopp, C.E., Greenwood, B.M. and Kwiatkowski, D. (1999). Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 179(1): 287-290.
- McKerrow, J.H. (1989). Parasite proteases. *Exp Parasitol* 68(1): 111-115.
- Mengeling, B.J. and Turco, S.J. (1998). Microbial glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 8(5): 572-577.
- Meyer, C.G., May, J., Luty, A.J., Lell, B. and Kremsner, P.G. (2002). TNFalpha-308A associated with shorter intervals of *Plasmodium falciparum* reinfections. *Tissue Antigens* 59(4): 287-292.
- Michelson, E.H. and Dubois, L. (1977). Agglutinins and lysins in the molluscan family Planorbidae: a survey of hemolymph, egg-masses, and albumen-gland extracts. *Biol Bull* 153(1): 219-227.

- Michon, P., Woolley, I., Wood, E.M., Kastens, W., Zimmerman, P.A. and Adams, J.H. (2001). Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *Plasmodium vivax* ligand required for blood-stage infection. *FEBS Lett* 495(1-2): 111-114.
- Mihok, S., Otieno, L.H., Darji, N. and Munyinyi, D. (1992). Influence of D(+)-glucosamine on infection rates and parasite loads in tsetse flies (*Glossina* spp.) infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop* 51(3-4): 217-228.
- Miller, A.N., Ofori, K., Lewis, F. and Knight, M. (1996). *Schistosoma mansoni*: use of a subtractive cloning strategy to search for RFLPs in parasite-resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol* 84(3): 420-428.
- Miller, A.N., Raghavan, N., FitzGerald, P.C., Lewis, F.A. and Knight, M. (2001). Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *Int J Parasitol* 31(7): 687-696.
- Miller, L.H. (1996). Malaria. Protective selective pressure. *Nature* 383(6600): 480-481.
- Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F. and McGinniss, M.H. (1976). The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 295(6): 302-304.
- Mitta, G., Galinier, R., Tisseyre, P., Allienne, J.F., Girerd-Chambaz, Y., Guillou, F., Bouchut, A. and Coustau, C. (2005). Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Dev Comp Immunol* 29(5): 393-407.
- Mockenhaupt, F.P., Ehrhardt, S., Cramer, J.P., Otchwemah, R.N., Anemana, S.D., Goltz, K., Mylius, F., Dietz, E., Eggelte, T.A. and Bienzle, U. (2004a). Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. *J Infect Dis* 190(5): 1006-1009.
- Mockenhaupt, F.P., Ehrhardt, S., Gellert, S., Otchwemah, R.N., Dietz, E., Anemana, S.D. and Bienzle, U. (2004b). Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria. *Blood* 104(7): 2003-2006.
- Modiano, D., Luoni, G., Sirima, B.S., Simporé, J., Verra, F., Konate, A., Rastrelli, E., Olivieri, A., Calissano, C., Paganotti, G.M., D'Urbano, L., Sanou, I., Sawadogo, A., Modiano, G. and Coluzzi, M. (2001). Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 414(6861): 305-308.
- Morahan, G., Boutlis, C.S., Huang, D., Pain, A., Saunders, J.R., Hobbs, M.R., Granger, D.L., Weinberg, J.B., Peshu, N., Mwaikambo, E.D., Marsh, K., Roberts, D.J. and Anstey, N.M. (2002). A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. *Genes Immun* 3(7): 414-418.
- Morris, C.A., Wheeler, M., Watson, T.G., Hosking, B.C. and Leathwick, D.M. (2005). Direct and correlated responses to selection for high or low faecal nematode egg count in Perendale sheep. *N Z J Agric Res* 48: 1-10.

Mulvey, M. and Vrijenhoek, R.C. (1981). Genetic variation among laboratory strains of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. *Biochem Genet* 19(11-12): 1169-1182.

Mulvey, M. and Woodruff, D.S. (1985). Genetics of *Biomphalaria glabrata*: linkage analysis of genes for pigmentation, enzymes, and resistance to *Schistosoma mansoni*. *Biochem Genet* 23(11-12): 877-889.

N

Neame, P.J., Choi, H.U. and Rosenberg, L.C. (1989). The isolation and primary structure of a 22-kDa extracellular matrix protein from bovine skin. *J Biol Chem* 264(10): 5474-5479.

Newton, W.L. (1953). The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp Parasitol* 2: 242-257.

Newton, W.L. (1954). Tissue response to *Schistosoma mansoni* in second generation snails from a cross between two strains of *Australorbis glabratus*. *J Parasitol* 40(3): 352-355.

Newton, W.L. (1955). The establishment of a strain of *Australorbis glabratus* which combines albinism and high susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 41(5): 526-528.

Niare, O., Markianos, K., Volz, J., Oduol, F., Toure, A., Bagayoko, M., Sangare, D., Traore, S.F., Wang, R., Blass, C., Dolo, G., Bouare, M., Kafatos, F.C., Kruglyak, L., Toure, Y.T. and Vernick, K.D. (2002). Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. *Science* 298(5591): 213-216.

Nie, M., Knox, A.J. and Pang, L. (2005). β 2-Adrenoceptor Agonists, Like Glucocorticoids, Repress Eotaxin Gene Transcription by Selective Inhibition of Histone H4 Acetylation. *The Journal of Immunology* 175(1): 478-486.

Nimmrich, I., Erdmann, S., Melchers, U., Chtarbova, S., Finke, U., Hentsch, S., Hoffmann, I., Oertel, M., Hoffmann, W. and Muller, O. (2001). The novel ependymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells. *Cancer Lett* 165(1): 71-79.

Noda, S. and Loker, E.S. (1989a). Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology* 98 (Pt 1): 35-41.

Noda, S. and Loker, E.S. (1989b). Phagocytic activity of hemocytes of M-line *Biomphalaria glabrata* snails: effect of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*. *J Parasitol* 75(2): 261-269.

Nowak, T.S., Woodards, A.C., Jung, Y., Adema, C.M. and Loker, E.S. (2004). Identification of transcripts generated during the response of resistant *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection using suppression subtractive hybridization. *J Parasitol* 90(5): 1034-1040.

Nunez, P.E., Adema, C.M. and de Jong-Brink, M. (1994). Modulation of the bacterial clearance activity of haemocytes from the freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology* 109 (Pt 3): 299-310.

O

Ockenhouse, C.F., Tandon, N.N., Magowan, C., Jamieson, G.A. and Chulay, J.D. (1989). Identification of a platelet membrane glycoprotein as a *falciparum* malaria sequestration receptor. *Science* 243(4897): 1469-1471.

Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K.E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M. and Lobb, R.R. (1992). Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* 176(4): 1183-1189.

Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Brittenham, G., Looareesuwan, S., Clark, A.G. and Tokunaga, K. (2004). Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. *Am J Hum Genet* 74(6): 1198-1208.

Omi, K., Ohashi, J., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Naka, I., Looareesuwan, S. and Tokunaga, K. (2003). CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria. *Am J Hum Genet* 72(2): 364-374.

Ootsuka, S., Saga, N., Suzuki, K., Inoue, A. and Ojima, T. (2006). Isolation and cloning of an endo-beta-1,4-mannanase from Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *J Biotechnol* 125(2): 269-280.

Orlandi, P.A., Klotz, F.W. and Haynes, J.D. (1992). A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *J Cell Biol* 116(4): 901-909.

Orr, H.A. and Irving, S. (1997). The genetics of adaptation - the genetic basis of resistance to wasp parasitism in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 51: 1877-1885.

Osta, M.A., Christophides, G.K. and Kafatos, F.C. (2004). Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* 303(5666): 2030-2032.

P

Pain, A., Urban, B.C., Kai, O., Casals-Pascual, C., Shafi, J., Marsh, K. and Roberts, D.J. (2001). A non-sense mutation in Cd36 gene is associated with protection from severe malaria. *Lancet* 357(9267): 1502-1503.

Pastrana, D.V., Raghavan, N., FitzGerald, P., Eisinger, S.W., Metz, C., Bucala, R., Schleimer, R.P., Bickel, C. and Scott, A.L. (1998). Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect Immun* 66(12): 5955-5963.

- Pasvol, G., Weatherall, D.J. and Wilson, R.J. (1978). Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 274(5672): 701-703.
- Pauling, L., Itano, H.A. and et al. (1949). Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* 110(2865): 543-548.
- Paulitschke, M. and Nash, G.B. (1993). Membrane rigidity of red blood cells parasitized by different strains of *Plasmodium falciparum*. *J Lab Clin Med* 122(5): 581-589.
- Peacock, L., Ferris, V., Bailey, M. and Gibson, W. (2006). Multiple effects of the lectin-inhibitory sugars D-glucosamine and N-acetyl-glucosamine on tsetse-trypanosome interactions. *Parasitology* 132(Pt 5): 651-658.
- Pearson, T.W., Beecroft, R.P., Welburn, S.C., Ruepp, S., Roditi, I., Hwa, K.Y., Englund, P.T., Wells, C.W. and Murphy, N.B. (2000). The major cell surface glycoprotein procyclin is a receptor for induction of a novel form of cell death in African trypanosomes *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol* 111(2): 333-349.
- Perlson, E., Medzihradszky, K.F., Darula, Z., Munno, D.W., Syed, N.I., Burlingame, A.L. and Fainzilber, M. (2004). Differential proteomics reveals multiple components in retrogradely transported axoplasm after nerve injury. *Mol Cell Proteomics* 3(5): 510-520.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology* 14(14): R546-R551.
- Poirie, M., Frey, F., Hita, M., Huguet, E., Lemeunier, F., Periquet, G. and Carton, Y. (2000). *Drosophila* resistance genes to parasitoids: chromosomal location and linkage analysis. *Proc Biol Sci* 267(1451): 1417-1421.
- Pringle, G. (1966). A quantitative study of naturally-acquired malaria infections in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in a highly malarious area of East Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 60(5): 626-632.

R

- Raghavan, N., Miller, A.N., Gardner, M., FitzGerald, P.C., Kerlavage, A.R., Johnston, D.A., Lewis, F.A. and Knight, M. (2003). Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 126(2): 181-191.
- Ramalho-Ortigao, J.M., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M. and Valenzuela, J.G. (2003). Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochem Mol Biol* 33(2): 163-171.
- Ribeiro, C., Duvic, B., Oliveira, P., Givaudan, A., Palha, F., Simoes, N. and Brehelin, M. (1999). Insect immunity-effects of factors produced by a nematobacterial complex on immunocompetent cells(1). *J Insect Physiol* 45(7): 677-685.

- Richards, C.S. (1973). Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg* 22(6): 748-756.
- Richards, C.S. (1975a). Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 70(2): 231-241.
- Richards, C.S. (1975b). Genetic studies of pathologic conditions and susceptibility to infection in *Biomphalaria glabrata*. *Ann N Y Acad Sci* 266: 394-410.
- Richards, C.S. (1984). Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni*. *Malacologia* 25: 493-502.
- Richards, C.S., Knight, M. and Lewis, F.A. (1992). Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Today* 8(5): 171-174.
- Richards, C.S. and Merritt, J.W., Jr. (1972). Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg* 21(4): 425-434.
- Richards, C.S. and Shade, P.C. (1987). The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 73(6): 1146-1151.
- Rihet, P., Flori, L., Tall, F., Traore, A.S. and Fumoux, F. (2004). Hemoglobin C is associated with reduced *Plasmodium falciparum* parasitemia and low risk of mild malaria attack. *Hum Mol Genet* 13(1): 1-6.
- Rother, S., Schmidt, R., Brysch, W. and Schlingensiepen, K.H. (1995). Learning-induced expression of meningeal ependymin mRNA and demonstration of ependymin in neurons and glial cells. *J Neurochem* 65(4): 1456-1464.
- Rowe, J.A., Moulds, J.M., Newbold, C.I. and Miller, L.H. (1997). *Plasmodium falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* 388(6639): 292-295.
- Ruwende, C., Khoo, S.C., Snow, R.W., Yates, S.N., Kwiatkowski, D., Gupta, S., Warn, P., Allsopp, C.E., Gilbert, S.C., Peschu, N. and et al. (1995). Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 376(6537): 246-249.

S

- Sabeti, P.C., Reich, D.E., Higgins, J.M., Levine, H.Z., Richter, D.J., Schaffner, S.F., Gabriel, S.B., Platko, J.V., Patterson, N.J., McDonald, G.J., Ackerman, H.C., Campbell, S.J., Altshuler, D., Cooper, R., Kwiatkowski, D., Ward, R. and Lander, E.S. (2002). Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 419(6909): 832-837.
- Sacks, D. and Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55: 453-483.

- Sacks, D.L. (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* 3(4): 189-196.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J. and Beverley, S.M. (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1): 406-411.
- Sacks, D.L., Pimenta, P.F., McConville, M.J., Schneider, P. and Turco, S.J. (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181(2): 685-697.
- Sarashina, I., Yamaguchi, H., Haga, T., Iijima, M., Chiba, S. and Endo, K. (2006). Molecular evolution and functionally important structures of molluscan Dermatopontin: implications for the origins of molluscan shell matrix proteins. *J Mol Evol* 62(3): 307-318.
- Schierack, P., Lucius, R., Sonnenburg, B., Schilling, K. and Hartmann, S. (2003). Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun* 71(5): 2422-2429.
- Schlein, Y., Schnur, L.F. and Jacobson, R.L. (1990). Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84(3): 353-355.
- Schneider, O. and Zelck, U.E. (2001). Differential display analysis of hemocytes from schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts. *Parasitol Res* 87(6): 489-491.
- Schonemeyer, A., Lucius, R., Sonnenburg, B., Brattig, N., Sabat, R., Schilling, K., Bradley, J. and Hartmann, S. (2001). Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. *J Immunol* 167(6): 3207-3215.
- Schutze, J., Skorokhod, A., Muller, I.M. and Muller, W.E. (2001). Molecular evolution of the metazoan extracellular matrix: cloning and expression of structural proteins from the demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *J Mol Evol* 53(4-5): 402-415.
- Sengupta, S., Farheen, S., Mukherjee, N., Dey, B., Mukhopadhyay, B., Sil, S.K., Prabhakaran, N., Ramesh, A., Edwin, D., Usha Rani, M.V., Mitra, M., Mahadik, C.T., Singh, S., Sehgal, S.C. and Majumder, P.P. (2004). DNA sequence variation and haplotype structure of the ICAM1 and TNF genes in 12 ethnic groups of India reveal patterns of importance in designing association studies. *Ann Hum Genet* 68(Pt 6): 574-587.
- Sergent, V., Cautain, B., Khalife, J., Deslee, D., Bastien, P., Dao, A., Dubremetz, J.F., Fournie, G.J., Saoudi, A. and Cesbron-Delauw, M.F. (2005). Innate refractoriness of the Lewis rat to toxoplasmosis is a dominant trait that is intrinsic to bone marrow-derived cells. *Infect Immun* 73(10): 6990-6997.

- Severson, D.W., Mori, A., Zhang, Y. and Christensen, B.M. (1994). Chromosomal mapping of two loci affecting filarial worm susceptibility in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 3(2): 67-72.
- Shashoua, V.E. (1977). Brain protein metabolism and the acquisition of new patterns of behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(4): 1743-1747.
- Shashoua, V.E. (1991). Ependymin, a brain extracellular glycoprotein, and CNS plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 627: 94-114.
- Shear, H.L., Roth, E.F., Jr., Fabry, M.E., Costantini, F.D., Pachnis, A., Hood, A. and Nagel, R.L. (1993). Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria. *Blood* 81(1): 222-226.
- Shi, Y.P., Nahlen, B.L., Kariuki, S., Urdahl, K.B., McElroy, P.D., Roberts, J.M. and Lal, A.A. (2001). Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with protection of infants against high-density *Plasmodium falciparum* infection. VII. Asembo Bay Cohort Project. *J Infect Dis* 184(1): 107-111.
- Shozawa, A. and Suto, C. (1990). Hemocytes of *Pomacea canaliculata*: I. Reversible aggregation induced by Ca²⁺. *Dev Comp Immunol* 14(2): 175-184.
- Shozawa, A., Suto, C. and Kumada, N. (1989). Superoxide production by the haemocytes of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, stimulated by miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Zoological Science* 6: 1019-1022.
- Sibley, L.D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 304(5668): 248-253.
- Sibley, L.D., Mordue, D.G., Su, C., Robben, P.M. and Howe, D.K. (2002). Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357(1417): 81-88.
- Sorci, G., Morand, S. and Hugot, J.P. (1997). Host-parasite coevolution: comparative evidence for covariation of life history traits in primates and oxyurid parasites. *Proc Biol Sci* 264(1379): 285-289.
- Spada, R.G., da Silva, D., Abdel-Hamid, A.Z., Sobral-Hamaguchi, S.S., Zuim, N.R., Zanotti-Magalhaes, E.M., Magalhaes, L.A. and Ribeiro-Paes, J.T. (2002). Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 Suppl 1: 53-58.
- Stein, P.C. and Basch, P.F. (1979). Purification and binding properties of hemagglutinin from *Biomphalaria glabrata*. *J Invertebr Pathol* 33(1): 10-18.
- Stevenson, M.M. and Riley, E.M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 4(3): 169-180.
- Stirnadel, H.A., Stockle, M., Felger, I., Smith, T., Tanner, M. and Beck, H.P. (1999). Malaria infection and morbidity in infants in relation to genetic polymorphisms in Tanzania. *Trop Med Int Health* 4(3): 187-193.

- Stohler, R.A., Curtis, J. and Minchella, D.J. (2004). A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 34(5): 595-601.
- Suarez-Castillo, E.C., Medina-Ortiz, W.E., Roig-Lopez, J.L. and Garcia-Arraras, J.E. (2004). Ependymin, a gene involved in regeneration and neuroplasticity in vertebrates, is overexpressed during regeneration in the echinoderm *Holothuria glaberrima*. *Gene* 334: 133-143.
- Superti-Furga, A., Rocchi, M., Schafer, B.W. and Gitzelmann, R. (1993). Complementary DNA sequence and chromosomal mapping of a human proteoglycan-binding cell-adhesion protein (dermatopontin). *Genomics* 17(2): 463-467.
- Suzuki, T., Takagi, T., Furukohri, T., Kawamura, K. and Nakauchi, M. (1990). A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. Isolation, characterization, and amino acid sequence. *J Biol Chem* 265(3): 1274-1281.

T

- Takamatsu, N., Shiba, T., Muramoto, K. and Kamiya, H. (1995). Molecular cloning of the defense factor in the albumen gland of the sea hare *Aplysia kurodai*. *FEBS Lett* 377(3): 373-376.
- Takeichi, M. (1987). Cadherins: a molecular family essential for selective cell-cell adhesion and animal morphogenesis. *Trends in Genetics* 3: 213-217.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 59: 237-252.
- Takemoto, S., Murakami, T., Kusachi, S., Iwabuchi, A., Hirohata, S., Nakamura, K., Sezaki, S., Havashi, J., Suezawa, C., Ninomiya, Y. and Tsuji, T. (2002). Increased expression of dermatopontin mRNA in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats: comparison with decorin and type I collagen mRNAs. *Basic Res Cardiol* 97(6): 461-468.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17(16): 6463-6471.
- Taylor, T.E., Fu, W.J., Carr, R.A., Whitten, R.O., Mueller, J.S., Fosiko, N.G., Lewallen, S., Liomba, N.G. and Molyneux, M.E. (2004). Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med* 10(2): 143-145.
- Theron, 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(2): 205-218.
- Theron, A. and Coustau, C. (2005). Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J Helminthol* 79(3): 187-191.

- Thomas, G.W., Barton, N.J., McGowan, A.A., Mickan, F.J., Miller, G. and James, R.E. (1984). Effect of whole herd anthelmintic treatment on milk production of dairy cows. *Res Vet Sci* 36(3): 266-269.
- Tishkoff, S.A., Varkonyi, R., Cahinhinan, N., Abbes, S., Argyropoulos, G., Destro-Bisol, G., Drouiotou, A., Dangerfield, B., Lefranc, G., Loiselet, J., Piro, A., Stoneking, M., Tagarelli, A., Tagarelli, G., Touma, E.H., Williams, S.M. and Clark, A.G. (2001). Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science* 293(5529): 455-462.
- Toft, C.A. and Karter, A.J. (1990). Parasite-host coevolution. *Trends in Ecology & Evolution* 5(10): 326-329.
- Tokumasu, F., Fairhurst, R.M., Ostera, G.R., Brittain, N.J., Hwang, J., Wellems, T.E. and Dvorak, J.A. (2005). Band 3 modifications in *Plasmodium falciparum*-infected AA and CC erythrocytes assayed by autocorrelation analysis using quantum dots. *J Cell Sci* 118(Pt 5): 1091-1098.
- Tort, J., Brindley, P.J., Knox, D., Wolfe, K.H. and Dalton, J.P. (1999). Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol* 43: 161-266.
- Tournamille, C., Colin, Y., Cartron, J.P. and Le Van Kim, C. (1995). Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 10(2): 224-228.
- Turco, S.J., Hull, S.R., Orlandi, P.A., Jr., Shepherd, S.D., Homans, S.W., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W. (1987). Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemistry* 26(19): 6233-6238.
- Turk, V. and Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 285(2): 213-219.
- Tzen, C.Y. and Huang, Y.W. (2004). Cloning of murine early quiescence-1 gene: the murine counterpart of dermatopontin gene can induce and be induced by cell quiescence. *Exp Cell Res* 294(1): 30-38.

U

- Usanga, E.A. and Luzzatto, L. (1985). Adaptation of *Plasmodium falciparum* to glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient host red cells by production of parasite-encoded enzyme. *Nature* 313(6005): 793-795.

V

- Vaidyanathan, R. (2004). *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects. *J Invertebr Pathol* 87(2-3): 123-128.
- Vaidyanathan, R. (2005). Isolation of a myoinhibitory peptide from *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and its function in the vector sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 42(2): 142-152.

- van der Knaap, W.P., Boots, A.M., Meuleman, E.A. and Sminia, T. (1985). Search for shared antigens in the schistosome-snail combination *Trichobilharzia ocellata-Lymnaea stagnalis*. *Z Parasitenkd* 71(2): 219-226.
- van der Knaap, W.P. and Loker, E.S. (1990). Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol Today* 6(6): 175-182.
- Van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1: 1-130.
- Vargas, L. (1949). Culicine and aedine mosquitoes and the malaria infections of lower animals. *Malariology*. Boyd, M.F. Philadelphia, WB Saunders Company: 526-538.
- Vergote, D., Bouchut, A., Sautiere, P.E., Roger, E., Galinier, R., Rognon, A., Coustau, C., Salzet, M. and Mitta, G. (2005). Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Int J Parasitol* 35(2): 215-224.
- Vernick, K.D., Fujioka, H., Seeley, D.C., Tandler, B., Aikawa, M. and Miller, L.H. (1995). *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol* 80(4): 583-595.
- Vidigal, T.H., Dias Neto, E., Carvalho Odos, S. and Simpson, A.J. (1994). *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Exp Parasitol* 79(2): 187-194.
- Vidigal, T.H., Spatz, L., Nunes, D.N., Simpson, A.J., Carvalho, O.S. and Dias Neto, E. (1998). *Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Exp Parasitol* 89(2): 180-187.
- Vilcinskis, A. and Gotz, P. (1999). Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in Parasitology* 43: 267-313.
- Volf, P., Kiewegova, A. and Svobodova, M. (1998). Sandfly midgut lectin: effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. *Med Vet Entomol* 12(2): 151-154.
- Volf, P., Svobodova, M. and Dvorakova, E. (2001). Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus duboscqi*: effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. *Med Vet Entomol* 15(3): 281-286.
- Volz, J., Muller, H.M., Zdanowicz, A., Kafatos, F.C. and Osta, M.A. (2006). A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. *Cell Microbiol* 8(9): 1392-1405.

W

- Wahlgren, M., Fernandez, V., Scholander, C. and Carlson, J. (1994). Rosetting. *Parasitol Today* 10(2): 73-79.

- Wajeman, H. and Galacteros, F. (2004). [Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: a protection against malaria and a risk for hemolytic accidents]. *C R Biol* 327(8): 711-720.
- Walley, A.J., Aucan, C., Kwiatkowski, D. and Hill, A.V. (2004). Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and susceptibility to clinical malaria in a Gambian case-control study. *Eur J Hum Genet* 12(2): 132-138.
- Wang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D. and Xu, W. (2007). Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Mol Immunol* 44(5): 722-731.
- Wang, H.Y., Tang, H., Shen, C.K. and Wu, C.I. (2003). Rapidly evolving genes in human. I. The glycophorins and their possible role in evading malaria parasites. *Mol Biol Evol* 20(11): 1795-1804.
- Wang, X., Fuchs, J.F., Infanger, L.C., Rocheleau, T.A., Hillyer, J.F., Chen, C.C. and Christensen, B.M. (2005). Mosquito innate immunity: involvement of beta 1,3-glucan recognition protein in melanotic encapsulation immune responses in *Armigeres subalbatus*. *Mol Biochem Parasitol* 139(1): 65-73.
- Watanabe, A., Miyazawa, S., Kitami, M., Tabunoki, H., Ueda, K. and Sato, R. (2006). Characterization of a novel C-type lectin, *Bombyx mori* multibinding protein, from the *B. mori* hemolymph: mechanism of wide-range microorganism recognition and role in immunity. *J Immunol* 177(7): 4594-4604.
- Wattam, A.R. and Christensen, B.M. (1992). Induced polypeptides associated with filarial worm refractoriness in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6502-6505.
- Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 79(8): 704-712.
- Webster, J.P. (2001). Compatibility and sex in a snail-schistosome system. *Parasitology* 122(Pt 4): 423-432.
- Webster, J.P. and Woolhouse, M.E.J. (1998). Selection and strain specificity of compatibility between snail intermediate hosts and their parasitic schistosomes. *Evolution* 52: 1627-1634.
- Webster, J.P. and Woolhouse, M.E.J. (1999). Cost of resistance: relationship between reduced fertility and increased resistance in a snail-schistosome host-parasite system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266(1417): 391.
- Weis, W.I., Taylor, M.E. and Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 163: 19-34.
- Welburn, S.C., Lillico, S. and Murphy, N.B. (1999). Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense* --identification of differentially expressed genes during con A induced death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(2): 229-234.
- Welburn, S.C., Maudlin, I. and Molyneux, D.H. (1994). Midgut lectin activity and sugar specificity in teneral and fed tsetse. *Med Vet Entomol* 8(1): 81-87.

- Wheelock, M.J. and Johnson, K.R. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 207-235.
- Wijdenes, J., van Elk, R. and Joosse, J. (1983). Effects of two gonadotropic hormones on polysaccharide synthesis in the albumen gland of *Lymnaea stagnalis*, studied with the organ culture technique. *Gen Comp Endocrinol* 51(2): 263-271.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22): 6531-6535.
- Williams, T.N., Maitland, K., Bennett, S., Ganczakowski, M., Peto, T.E., Newbold, C.I., Bowden, D.K., Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (1996). High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature* 383(6600): 522-525.
- Williams, T.N., Wambua, S., Uyoga, S., Macharia, A., Mwacharo, J.K., Newton, C.R. and Maitland, K. (2005). Both heterozygous and homozygous alpha⁺ thalassemias protect against severe and fatal *Plasmodium falciparum* malaria on the coast of Kenya. *Blood* 106(1): 368-371.
- Wilson, J.N., Rockett, K., Jallow, M., Pinder, M., Sisay-Joof, F., Newport, M., Newton, J. and Kwiatkowski, D. (2005). Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria. *Genes Immun* 6(6): 462-466.
- Worcel, A., Han, S. and Wong, M.L. (1978). Assembly of newly replicated chromatin. *Cell* 15(3): 969-977.
- Wright, C.A. (1974). Snail susceptibility or trematode infectivity? *Journal of Natural History* 8: 545-548.
- Wu, W.K. and Tesh, R.B. (1990a). Genetic factors controlling susceptibility to *Leishmania major* infection in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 42(4): 329-334.
- Wu, W.K. and Tesh, R.B. (1990b). Selection of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) lines susceptible and refractory to *Leishmania major* infection. *Am J Trop Med Hyg* 42(4): 320-328.

X

- Xu, B., Hellman, U., Ersson, B. and Janson, J.C. (2000). Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-beta-1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Eur J Biochem* 267(16): 4970-4977.
- Xu, B., Sellos, D. and Janson, J.C. (2002). Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) beta-mannanase gene. *Eur J Biochem* 269(6): 1753-1760.
- Xue, Q.G., Waldrop, G.L., Schey, K.L., Itoh, N., Ogawa, M., Cooper, R.K., Losso, J.N. and La Peyre, J.F. (2006). A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major

extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 145(1): 16-26.

Y

- Yamamoto, H., Kobayashi, M., Ogura, N., Tsuruoka, H. and Chigusa, Y. (1985). Studies on filariasis VI: The encapsulation of *Brugia malayi* and *B. pahangi* larvae in the mosquito, *Armigeres subalbatus*. Japanese Journal of Sanitary Zoology 36: 1-6.
- Yamaura, I. and Matsumoto, T. (1993). Purification and some properties of endo-1,4-beta-D-mannanase from a mud snail, *Pomacea insularis* (de Ordigny). Biosci Biotechnol Biochem 57(8): 1316-1319.
- Yamaura, I., Nozaki, Y., Matsumoto, T. and Kato, T. (1996). Purification and some properties of an endo-1,4-beta-D-mannanase from a marine mollusc, *Littorina brevicula*. Biosci Biotechnol Biochem 60(4): 674-676.
- Yang, T.H., Tzeng, S., Cheng, I., Burnett, M.G., Yoshizawa, Y., Fukuyama, K., Lee, S.C. and Epstein, W.L. (1997). Identification of the mouse calcium-binding proteins, MRP 8 and MRP 14, in *Schistosoma mansoni*-induced granulomas: biochemical and functional characterization. J Leukoc Biol 61(3): 258-266.
- Yazdani, S.S., Shakri, A.R., Mukherjee, P., Baniwal, S.K. and Chitnis, C.E. (2004). Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. Vaccine 22(27-28): 3727-3737.
- Yoshino, T.P. and Bayne, C.J. (1983). Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol 5(3): 317-328.
- Yoshino, T.P., Boyle, J.P. and Humphries, J.E. (2001). Receptor-ligand interactions and cellular signalling at the host-parasite interface. Parasitology 123 Suppl: S143-157.
- Yoshino, T.P., Cheng, T.C. and Renwrtantz, L.R. (1977). Lectin and human blood group determinants of *Schistosoma mansoni*: alteration following in vitro transformation of miracidium to mother sporocyst. J Parasitol 63(5): 818-824.
- Yoshino, T.P., Coustau, C., Modat, S. and 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. and Laursen, J.R. (1995). Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. J Parasitol 81(5): 714-722.
- Yoshino, T.P., Wu, X.J. and Liu, H.D. (1998). Transfection and heat-inducible expression of molluscan promoter-luciferase reporter gene constructs in the *Biomphalaria glabrata* embryonic snail cell line. Am J Trop Med Hyg 59(3): 414-420.

- Yu, X.Q., Gan, H. and Kanost, M.R. (1999). Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem Mol Biol* 29(7): 585-597.
- Yu, X.Q. and Kanost, M.R. (2000). Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 275(48): 37373-37381.
- Yu, X.Q., Tracy, M.E., Ling, E., Scholz, F.R. and Trenczek, T. (2005). A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochem Mol Biol* 35(4): 285-295.

Z

- Zelck, U. and Becker, W. (1990). Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. *J Invertebr Pathol* 55(1): 93-99.
- Zelck, U. and Becker, W. (1992). *Biomphalaria glabrata*: influence of calcium, lectins, and plasma factors on in vitro phagocytic behavior of hemocytes of noninfected or *Schistosoma mansoni*-infected snails. *Exp Parasitol* 75(1): 126-136.
- Zelck, U.E. (1999). Glycosidase activities in plasma of naive and schistosome-infected *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Parasitology* 119 (Pt 6): 563-568.
- Zheng, L., Cornel, A.J., Wang, R., Erfle, H., Voss, H., Ansorge, W., Kafatos, F.C. and Collins, F.H. (1997). Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium cynomolgi* B. *Science* 276(5311): 425-428.
- Zheng, L., Wang, S., Romans, P., Zhao, H., Luna, C. and Benedict, M.Q. (2003). Quantitative trait loci in *Anopheles gambiae* controlling the encapsulation response against *Plasmodium cynomolgi* Ceylon. *BMC Genet* 4: 16.
- Zimmerman, P.A., Fitness, J., Moulds, J.M., McNamara, D.T., Kasehagen, L.J., Rowe, J.A. and Hill, A.V. (2003). CR1 Knops blood group alleles are not associated with severe malaria in the Gambia. *Genes Immun* 4(5): 368-373.
- Zimmerman, P.A., Woolley, I., Masinde, G.L., Miller, S.M., McNamara, D.T., Hazlett, F., Mgone, C.S., Alpers, M.P., Genton, B., Boatin, B.A. and Kazura, J.W. (1999). Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13973-13977.

Annexe

Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes

G. Mitta^a, R. Galinier^a, P. Tisseyre^b, J.-F. Allienne^a, Y. Girerd-Chambaz^c,
F. Guillou^a, A. Bouchut^a, C. Coustau^{a,*}

^aParasitologie fonctionnelle et Evolutive UMR 5555, CNRS Université de Perpignan 52 Ave Paul Alduy, 66 860 Perpignan cedex, France

^bFédération de recherche Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne FR2577, CNRS Université de Perpignan, Perpignan, France

^cAventis-Pasteur, Marcy l'Etoile, France

Received 29 June 2004; revised 20 September 2004; accepted 14 October 2004

Available online 11 November 2004

Abstract

The immune effector cells (hemocytes) of the snail host *Biomphalaria glabrata* are known to play a key role in recognition and elimination of larval helminths such as the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. To identify novel immune-relevant genes, we undertook an expressed sequence tag program. A hemocyte cDNA library was constructed using snails that were not exposed to a particular pathogen or parasite but maintained in non-axenic conditions. Putative function could be assigned to 53% of the 1613 high quality cDNAs analysed. Based on sequence similarities, we identified 31 immune-relevant genes corresponding either to cellular defence effectors, proteases and protease inhibitors, pattern recognition receptors, cell adhesion molecules or immune regulators. In order to further investigate the potential involvement of these genes in snail–trematode immunobiological interactions, we analysed their expression in unchallenged and parasite-challenged snails, using the immunosuppressive trematode *Echinostoma caproni* and snail strains selected for resistance or susceptibility to this parasite. Real-time PCR analysis of expression ratios at 7 time-points post-exposure revealed both (i) genes displaying constitutive expression differences between the two strains; and (ii) genes differentially modulated after parasite exposure.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*; *Echinostoma caproni*; Host–parasite interactions; Innate immunity; EST; Invertebrate; Cytokine-like; Pattern recognition receptor

1. Introduction

Innate immunity of gastropods has been particularly studied on *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Biomphalaria* circulating hemocytes

* Corresponding author. Tel.: +33 4 68 66 21 85; fax: +33 4 68 66 22 81.

E-mail address: coustau@univ-perp.fr (C. Coustau).

are known to be the major cellular effectors of the immune response against larval trematodes [1]. In cooperation with humoral factors, these cells accomplish recognition of, and adhesion to the parasite surface, formation of a multilayer cellular capsule and killing of the parasite after cytotoxic activation [2].

Past biochemical and molecular approaches, aimed at identifying genes involved in host–parasite relationships, resulted in the identification of several immune-relevant genes such as the family of fibrinogen related proteins (FREPs) [3,4], a β integrin subunit [5], a α -macroglobulin proteinase inhibitor [6], and the C-type lectin BgSel [7]. Recently, in a common effort to identify genes involved in *B. glabrata* immunity, several laboratories have developed gene discovery programs (<http://biology.unm.edu/biomphalaria-genome/>). Although thousands of cDNAs are being characterized from various tissues or cell types, few immune-relevant genes have been identified so far [8–12]. For example, comparative analysis of ESTs from *B. glabrata* hemocytes pre and post-exposure to *S. mansoni* revealed that the most abundant transcripts showed sequence similarity with reverse-transcriptases [11]. Reverse-transcriptase activity has been detected in this snail and the potential role of this enzyme in immunobiological interactions is under investigation [11].

The aim of the present study was to further characterize genes involved in *B. glabrata* immunity by (i) generating a SMART cDNA library from hemocytes and identifying candidate transcripts after ESTs sequencing; and (ii) investigating expression of the candidate genes after immune challenge. For this latter point, we used the immunosuppressive trematode *Echinostoma caproni* and two strains of *B. glabrata* selected for their susceptibility or resistance to this parasite. *In vivo* and *in vitro* studies have shown that *E. caproni* inhibit hemocyte defence functions of susceptible snails, via its excretory–secretory products, and achieve development without being encapsulated [13,14]. In contrast, in resistant snails, excretory–secretory products do not affect hemocytic functions, and the parasite larvae are encapsulated and killed within 2 days post-exposure [13,14]. This host–parasite system therefore provides a useful tool for identification of transcripts whose expression is differentially regulated between

susceptible immunosuppressed snails and resistant snails mounting an efficient immune response.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental infection

B. glabrata snails used in this study belonged either to the unselected Bg.Bra stock originating from Brazil [15], or to the EAF or CB strains selected, respectively, for their susceptibility or resistance to *E. caproni* infection [14,16]. At the time of the study, the percentages of adult snails susceptible to *E. caproni* were: Bg.Bra = 70%, EAF = 98% and CB = 1%.

The parasite *E. caproni* [17] was maintained in Bg.Bra snails and mice (SWISS OF1 stock) as described previously [18]. For one experiment, adult EAF and CB snails (measuring 9 to 14 mm in shell diameter) were exposed to *E. caproni* infection according to previously described procedures [15]. Ten individuals from each strain were collected at 2, 5, 10, 22 h, 2 and 4 days post-exposure and frozen in liquid nitrogen until RNA extraction.

2.2. Hemocytes recovery and RNA extraction

Hemolymph was extracted from the headfoot of 400 Bg.Bra snails according to standard procedure [19] and immediately placed on ice. Approximately 200 ml of hemolymph were recovered and centrifuged at $2000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The pellet of hemocytes was immediately used for extraction of total RNA. Total RNA was extracted using Trizol-® Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

2.3. cDNA library construction

An amount of 420 ng of hemocyte total RNA was recovered and used to generate the cDNA library. cDNA library was constructed using the Creator™ SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech), as described in the manufacturer's protocol. Oriented double stranded cDNAs were ligated into pDNR-LIB plasmids. ElectroMAX™ DH5 α -E™ (Invitrogen) cells were then transformed by electroporation with recombinant plasmid and plated on LB agar plate

containing 30 µg/ml chloramphenicol. Positive clones were arrayed in 96-well plates.

2.4. DNA isolation and EST sequencing

A total of 1920 individual colonies were picked randomly and submitted to plasmid DNA extraction using Automated Plasmid DNA purification kit (Macherey-Nagel) and a Biorobot 9600 (Qiagen). cDNAs isolated from the individual clones were sequenced using a dideoxy-dye-terminator method (CEQ™ DTCS-Quick Start kit, Beckman coulter) and a CEQ™ 8000 apparatus (Beckman coulter). The forward primer F-Lib used for sequencing was 5'CGAAGTTATCAGTCGACG3'. Sequences were obtained using the CEQ™ 8000 sequence analysis software.

2.5. Sequence pre-processing and analysis

Vector and adaptor sequences were trimmed from all sequences using Sequencher™ software (Gene Codes Corporation). All sequences were then examined for possible sequencing errors. High quality ESTs, greater than 150 bp in length, were assembled in clusters (Sequencher™ software). Consensus sequences from clusters or unique sequences from singletons were submitted to database searches using BLASTX and BLASTN programs (<http://blast.genome.jp/> or <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Specific domain searches were performed using the RPS-BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

2.6. Real-time PCR

Real-time PCR analysis of potential immune-relevant genes expression was performed on total RNAs extracted from parasite-exposed EAF and CB snails. RNA extraction and reverse transcription were performed according to previously described procedures [15]. Specific primers for real-time quantitative PCR were edited using the LightCycler Probe Design Software version 1.0 (Roche). PCR reactions were set up according to the LightCycler Manual (Roche Molecular Biochemicals, Germany) [10,15]. The following LightCycler run protocol was used: denaturation program (95 °C, 10 min), amplification

and quantification programs repeated 40 times (95 °C for 15 s, annealing temperature for 5 s, 72 °C for 13 s), melting curve program (60–95 °C with a heating rate of 0,1 °C/s and continuous fluorescence measurement), and a cooling step to 40 °C. Analysis of melting curves allowed optimization of annealing temperatures for each amplification products. Single highly specific amplification products were obtained using annealing temperatures equal to 1 °C above the T_m of primer pairs. For each reaction, the crossing point CP was determined using the 'Fit Point Method' of the LightCycler Software 3.3 (Roche Diagnostics). PCR reactions were set in duplicates and the mean value of the CPs were calculated. For each mRNA to be analysed, the absence of contaminating genomic DNA was verified by running a no-RT control using primers for the ribosomal protein S19 (accession number CK988928). In addition, a no-template control (H₂O control) was analysed for each mastermix.

Amplification efficiencies (E) of each PCR product were determined according to previously described procedures [10,15]. For each sample, the level of expression of the target gene (Tg) was compared to the expression of the ribosomal protein S19 (accession number CK988928). The expression ratio (R) was calculated according to the formula:

$$R = (E_{Tg})^{CPTg} / (E_{S19})^{CPS19}.$$

3. Results

3.1. EST sequencing and general characteristics

Using the CEQ™ 8000 sequence analysis software, 1707 5'-end cDNA sequences were obtained as one-path reads and submitted to a BLASTN search. Contaminant sequences corresponding to vector, repeated DNA, rRNA, xenocontaminants (sequences from foreign genomes) or low quality sequences were removed from the ESTs. The remaining 1613 high quality ESTs, longer than 150 bp were analysed. Redundant ESTs were organized into overlapping contigs using the Sequencher™ 4.2 software (Gene Codes Corporation). The ESTs coalesced into 197 contigs and 664 singletons, suggesting that the overall redundancy of the library was 58,8% (Table 1). On average, each contig was composed of 4 ESTs

Table 1
General characteristics of *Biomphalaria glabrata* hemocyte ESTs

Total number of cDNA sequenced	1707
Total number of cDNA analysed	1613
Average insert size ^a	1500 bp
Average EST length ^b	525 bp
EST clusters ^c	197
Singletons	664
Redundancy ^d	58,8%

^a The average insert size was calculated from 36 randomly selected cDNA clones after insert digestion.

^b The average EST length was calculated from 100 randomly selected cDNA ESTs.

^c ESTs with 90% or greater identity over a 100 bp region were clustered together forming 197 clusters.

^d Redundancy = number of ESTs assembled in clusters/total EST.

and was 684 bp in length. In order to minimize redundancy in the EST database, sequences displaying 100% identity were submitted as a single sequence. ESTs aligning in a same contig but displaying differences in their nucleotidic sequence were submitted individually in the database. A total of 1481 ESTs were submitted to the dbEST section of the NCBI/GenBank (accession numbers from CK988653 to CK990133).

3.2. Functional groups of ESTs

ESTs were subjected to a BLAST search based on the deduced amino acid sequence (BLASTX analysis using the substitution matrix BLOSUM62, [20])

Sequence similarities were considered to be significant when the expected value was less than 10^{-2} . Comparison of the ESTs against non-redundant protein databases (SwissProt, TrEMBL, PIR, PRF, and PDBSTR) revealed that 29.1% of the ESTs did not align significantly with known genes, 16.1% significantly aligned with genes of unknown function, and the remaining 54.8% ESTs were significantly similar to genes of known function (Fig. 1). ESTs showing significant sequence similarities to genes of known function were clustered into seven broad functional categories (Fig. 1). These were genes-encoding proteins involved in: (1) immunity; (2) stress response and detoxification; (3) nucleic acid and protein metabolism and processing; (4) cell signalling; (5) cell structure, shape and mobility; (6) energy metabolism, or (7) other functions.

3.3. Identification of immune-relevant genes

Thirty-one EST clusters (including 18 contigs and 13 singletons) showed significant sequence similarities to genes potentially involved in innate immunity (Table 2). In order to further investigate the potential function of the corresponding genes, consensus sequences of each cluster have been subjected to a domain search analysis using the RPS-BLAST program [21]. These clusters were classified into six functional groups according to predicted functions (Table 2).

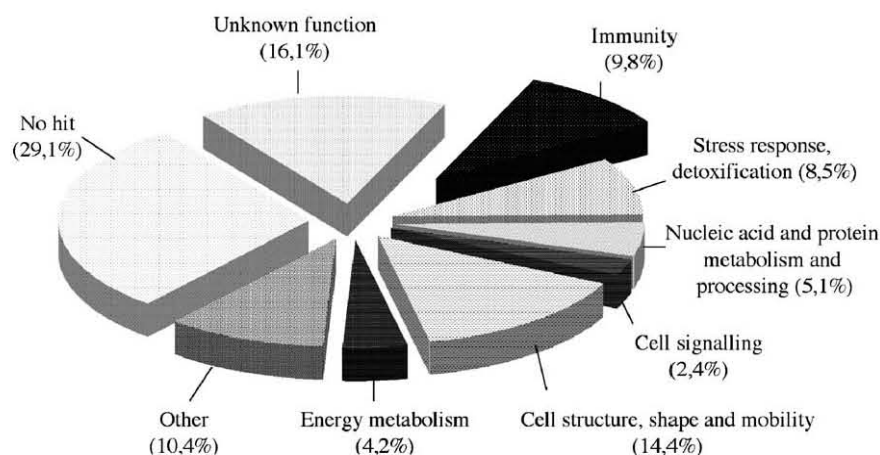


Fig. 1. Distribution of the 1613 ESTs by functional classes. The percentages of ESTs present in each class are given between parentheses.

Table 2
Immune-related clusters identified in a cDNA library from *B. glabrata* hemocytes

Functional group	Cluster #	Accession # in dbEST	Homologous region	Annotated BLASTX similarity (accession #)	Organism	E-value	RPS-BLAST detected domain (E-value)
Cellular defence effectors	1	CK990069 CK989379	174–467	Dual oxidase 1 (AF547266)	<i>S. scrofa</i>	5×10^{-16}	gnl CDD- 26022 An_peroxidase (5×10^{-12})
	2	CK988723 CK988975 CK989886	65–598	Thioredoxin peroxidase (AY438331)	<i>B. mori</i>	2×10^{-78}	gnl CDD- 18645 AhpC-TSA (2×10^{-85})
	3	CK988821 CK988679 CK989443 CK989729	111–422	LBP/BPI (AB042026)	<i>O. mykiss</i>	6×10^{-12}	gnl CDD 302 BPI1 (4×10^{-7})
	4	CK988685	65–373	LBP/BPI (AU279378)	<i>C. carpio</i>	4×10^{-3}	gnl CDD- 24147 BPI2 (6×10^{-8})
	5	CK988667	41–391	β -1,3-glucanase (AY308829) Coelomic Cytolytic Factor (AF395805, AF030028) Lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan-binding protein (AJ250128)	<i>P. sachalinensis</i> <i>L. Terrestris</i> <i>E. foetida</i> <i>P. leniusculus</i>	3×10^{-30} 4×10^{-20} 2×10^{-19} 3×10^{-9}	ND
	6	CK989131, -805, -692, -482 CK990041	69–290	Theromacin (AY434032)	<i>T. tessulatum</i>	7×10^{-3}	ND
	7	CK989857, -987, -825	75–293	Theromacin (AY434032)	<i>T. tessulatum</i>	1.5×10^{-2}	ND
Protease	8	CK989867	3–533	Coagulation factor XI (AF356627)	<i>M. musculus</i>	2×10^{-31}	gnl CDD 5391 Tryp-SPc (5×10^{-45})
	9	CK988684 CK988995	50–583	Metalloproteinase (X56224)	<i>P. lividus</i>	3×10^{-29}	gnl CDD- 24541 Astacin (3×10^{-42})
Protease inhibitor	10	CK988862	159–311	Serine proteinase inhibitor (AY351957)	<i>P. clarkii</i>	5×10^{-6}	gnl CDD- 25305 KAZAL (5×10^{-6})
	11	CK989049	140–286	Serine proteinase inhibitor (AY351957)	<i>P. clarkii</i>	2×10^{-9}	gnl CDD- 25305 KAZAL (4×10^{-7})
	12	CK989290 CK988774	123–338	Inter α -trypsin inhibitor (AK050016)	<i>M. musculus</i>	1×10^{-9}	gnl CDD 9009 vault protein inter-alpha-trypsin domain (5×10^{-14})

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Functional group	Cluster #	Accession # in dbEST	Homologous region	Annotated BLASTX similarity (accession #)	Organism	E-value	RPS-BLAST detected domain (E-value)
Pattern recognition receptor	13	CK988733 ^a	57–356	Cystatin (NP_956562.1)	<i>D. rerio</i>	2×10^{-19}	gnl CDD- 25366 cystatin domain (5×10^{-8})
	14	CK989239, -358, -361, -753, -841 CK988717	11–667	FREP 3.3 (AF515461)	<i>B. glabrata</i>	$e \times 10^{-102}$	ND
	15	CK988943 CK989058, -315, -187	11–640	FREP 3.2 (AY028461)	<i>B. glabrata</i>	1×10^{-98}	ND
	16 ^b	CK989785, -142, -583	129–205	MFREP7var1 (AY028463)	<i>B. glabrata</i>	9×10^{-22}	ND
	17 ^b	CK988666	1–101	FREP 13.1 (AF515470 and AF515469)	<i>B. glabrata</i>	7×10^{-36}	ND
Cell-adhesion	18	CK988696	171–656	Peptidoglycan recognition protein (AY437875)	<i>A. irradians</i>	8×10^{-35}	gnl CDD- 25350 PGRP (6×10^{-44})
	19	CK989092, -409, -721, -676, -715 CK990133	143–583	Dermatopontin (P83553) amoebocyte aggregation factor (Q01528)	<i>B. glabrata</i> <i>L. polyphemus</i>	3×10^{-41} , 2×10^{-35}	ND ND
	20	CK989060, -525, -009 CK988817, -846, -741, -973	69–428	Dermatopontin (P83553) amoebocyte aggregation factor (Q01528)	<i>B. glabrata</i> <i>L. polyphemus</i>	9×10^{-31} , 2×10^{-24}	ND
	21	CK988686	96–389	Dermatopontin (P83553) amoebocyte aggregation factor (Q01528)	<i>B. glabrata</i> <i>L. polyphemus</i>	2×10^{-41} , 7×10^{-32}	ND
	22 ^b	CK988697 CK988964 CK989450 CK989985	164–883	Matrilin (AF486289 and CN476089)	<i>B. glabrata</i>	0	gnl CDD 5236 VWA (5×10^{-25})
	23	CK988847, -906, CK989235, -246, -838, -513, -847, -829, -577, -625 CK990068, -083	126–533	Matrilin-1 (P51942)	<i>M. musculus</i>	8×10^{-6}	gnl CDD- 24254 VWA (1×10^{-12})
	24	CK989901	186–350	Galectin-IIa (AB060970)	<i>X. laevis</i>	1×10^{-14}	gnl CDD- 24239 GLECT (3×10^{-10})
	25	CK989149	107–490	Galectin-IIIa (AB060971)	<i>X. laevis</i>	9×10^{-20}	gnl CDD- 14806 GLECT (1×10^{-31})

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Functional group	Cluster #	Accession # in dbEST	Homologous region	Annotated BLASTX similarity (accession #)	Organism	E-value	RPS-BLAST detected domain (E-value)
Immune regulators	26	CK989024 CK989796 CK988997	237–725	F-spondin precursor (AF149302)	<i>G. gallus</i>	4×10^{-35}	gnl CDD- 26581 Spondin_N (2×10^{-45})
	27	CK988897	6–248	Integrin alpha-3 precursor (P26006)	<i>H. sapiens</i>	1×10^{-3}	gnl CDD- 21418 vitronectin receptor, α -subunit (2×10^{-7})
	28	CK988729	106–555	Integrin alpha-5 precursor (U12683)	<i>H. sapiens</i>	4×10^{-4}	ND
	29	CK988945 CK989314 CK989451	159–311	β -Integrin related protein (AE014302)	<i>H. sapiens</i>	4×10^{-3}	ND
	30	CK989824	58–363	Macrophage migration inhibitory factor-like protein (AY050662)	<i>T. pseudospiralis</i>	1×10^{-11}	gnl CDD- 19545 MIF (1×10^{-13})
	31	CK988911, -762, -879 CK989205, -616, -768, -474, -109, -208, -177	239–604	Allograft inflammatory factor-1 (AB012309)	<i>C. carpio</i>	9×10^{-29}	gnl CDD- 17839 EF-hand protein superfamily (2×10^{-7})

ND=Not detected.

^a Complete list of accession numbers: CK988733, -735, -768, -769, -805, -871, -872, -880, -884, -891, -930, -955, CK989038, -072, -075, -133, -140, -145, -174, -234, -253, -257, -270, -343, -359, -391, CK990100.

^b BLASTN in this case.

3.3.1. Cellular defence effectors

Some clusters displayed sequence similarity to genes involved in the production of reactive oxygen intermediates. Cluster 1 significantly aligned with dual oxidase and NADPH oxidase which are responsible for the bactericidal superoxide anion production in phagocytes [22]. Cluster 2 contains an ORF that harbors an AhpC-TSA (alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant) domain and appears to be highly similar to (i) the thioredoxin peroxidase from the silkworm *Bombyx mori* and (ii) the natural killer cell enhancement factor of *Cyprinus carpio* (NKEF, E-value 2×10^{-73} , accession number AB010959). This protein participates in eliminating hydrogen peroxide and could be involved in enhancing cytotoxic activity of NK cells [23].

Clusters 3 and 4 show sequence similarities to LBP (LPS binding protein)/BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-1 from human and fishes. These two clusters contain BPI 1 and BPI 2 domains, respectively (Table 2). These proteins, produced by myeloid cells, display cytotoxicity directed against many species of Gram-negative bacteria [24,25].

Cluster 5 significantly aligns with a protein identified as a β -1,3-glucanase from the bivalve *Pseudocardium sachalinensis*, whose function remains to be elucidated. However, it also aligns with two immune-relevant glucanases, namely lipopolysaccharide and glucan-binding protein (LGBP) from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and coelomic cytolytic factor (CCF) from worms. These proteins are involved in

the activation of the pro-Phenoloxidase activating system [26–28].

Clusters 6 and 7 both show sequence similarity to an antibacterial molecule characterized from the leech *Theromyzon tessulatum* [29]. Although *E*-values obtained with these cDNAs are quite high, the cysteine array is conserved (result not shown) and strongly supports a conservation of function.

3.3.2. Protease and protease inhibitors

In addition to their role in nutrient digestion, proteases and protease inhibitors are important in many extracellular processes, including anti-infectious response. In invertebrates, protease inhibitors may be expressed during humoral immune response to inactivate proteases produced by invading pathogens [30]. Involvement of protease inhibitors in defence mechanisms is also illustrated by their role in the control of the antifungal response of *Drosophila* [31]. Some proteases, like metalloproteases or serine proteases, are released into the hemolymph of invertebrates after immune-challenge [32,33]. Cluster 8 aligns with trypsinogen and exhibits a portion of the Tryp-SPc (trypsin-like serine protease) domain. Cluster 9 showed similarity with a Zinc-dependent metalloprotease (Table 2). Clusters 10 and 11 showed sequence similarities with Kazal type serine protease inhibitors and cluster 12 contains a Vault protein Inter-alpha-Trypsin domain (Table 2). Finally, cluster 13 significantly aligns with cystatins from numerous species.

3.3.3. Pattern recognition receptors (PRR) and cell-adhesion molecules

Some clusters (14–17) displayed high similarities to molecules already described in *B. glabrata*, namely Fibrinogen-Related Proteins (FREPS) [3]. These molecules contain two types of functional domains: an N-terminal immunoglobulin superfamily (IgSF) domain and a C-terminal fibrinogen (FBG) domain [34,35]. Although their precise function remains to be elucidated, evidence suggests that they may play a key role in immunity. Previous studies showed that (i) some FREPs transcripts are up-regulated after infection with the digenean *Echinostoma paraense* [3] and that (ii) some FREPs gene products are capable of precipitating soluble trematode antigens and of binding sporocysts surface [36].

In addition to FREPs, a novel gene encoding a putative PRR was characterized in this work. Cluster 18 presents a high degree of similarity to genes of the animal peptidoglycan recognition proteins (PGRP) family. Recent studies have highlighted the pivotal role of these molecules in innate immunity from insects to mammals [37].

Regarding cell-adhesion molecules, clusters 19–21 are significantly similar to genes of the dermatopontin family. They represent different isoforms of a dermatopontin already characterized from *B. glabrata* [38]. These three proteins are likely to be secreted molecules as predicted using PSORTII prediction software (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>). In addition to dermatopontin, they also align significantly with the amoebocyte aggregation factor (LAF) from *Limulus polyphemus* [39]. Although, based on *E*-values, alignments with the previously characterized *B. glabrata* dermatopontin appear more significant, all three clusters present some structural features of LAF that are not shared with dermatopontins, namely two internal repeating units (VND[W/F]D and EDRR[W/F]) repeated three times at conserved positions [39].

Two other cell adhesion molecules were partially characterized in this study as the clusters 22 and 23 aligned with molecules of the matrilin family. While cluster 22 corresponds to a matrilin already characterized from *B. glabrata* embryonic cells (accession number: AF486289), the cluster 23 shows higher similarities to mammalian matrilins. This last cluster seems to correspond to a secreted molecule (PSORTII prediction software) containing a von Willebrand factor type A domain (VWA). Such domains are known to mediate adhesion via metal ion-dependent adhesion sites (MIDAS).

Two clusters (24 and 25) significantly align with Galectins (Table 2). These molecules, containing β -galactoside binding domains, are involved in cell–cell interactions and their activity is metal ion independent. Involvement of this type of molecule in innate immunity was recently reviewed [40].

Cluster 26 presents a strong sequence similarity to extracellular spondins, which can be involved in cell adhesion. Finally, three other clusters (27–29) display similarities to α or β -chains of integrins, which are involved in numerous cell adhesion processes. They represent novel *B. glabrata* integrins, different

from the β -integrins already characterized in this organism [5].

3.3.4. Molecules involved in regulation of immunity

Cluster 30 displays significant similarity to helminth analogs of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). These molecules are involved in immune evasion strategies of these human parasites [41]. In mammals, MIF molecules are known to regulate innate immune processes [42].

Cluster 31 encodes a Ca^{2+} binding protein (EF-Hand domain detected by RPS-BLAST) displaying high similarities ($E^{-27} < E\text{-value} < E^{-7}$) to mammalian Allograft Inhibitory Factors (AIF). AIFs are overproduced in monocytes and macrophages during allo and auto-immune reactions and seem to play a role in macrophage activation during these processes [43].

3.4. Expression of the candidate transcripts in susceptible and resistant snails after immune-challenge

In order to further investigate the potential involvement of the selected genes in immune processes, we compared their expression at various times after exposure to *E. caproni*, in the susceptible EAF and the resistant CB strains of *B. glabrata*. In this host–parasite system, parasite mother sporocysts are known to be encapsulated and killed within the first 4 days of infection in resistant snails, whereas they develop normally in susceptible snails. Representation of the transcripts corresponding to the selected 31 immune-relevant genes was analysed, using quantitative RT-PCR, on total RNA extracted from pools of 10 snails for each time of the kinetics (0, 2, 5, 10, 22, 48 and 96 h post-infection).

Among the 31 candidate transcripts analysed, 12 showed variations in their expression ratios that were greater than three-fold (results shown in Fig. 2). Several types of expression patterns were observed.

A first group of genes appeared regularly and highly induced following infection in resistant snails. These are genes-encoding cystatin, dermatopontin/LAF, matrilin, AIF, LBP and serine protease inhibitor-like molecules (Fig. 2). These same genes also appear induced in susceptible snails, but inductions are much lower and irregular. Notice, for example,

a decrease in AIF and serine protease inhibitor-like transcript levels at 2 and 5 h post-exposure in susceptible snails.

A second group of genes, namely dual oxidase, FREP3, β -integrin, F-Spondin, α -trypsin inhibitors and integrin α 5-like genes are of particular interest as they show: (i) constitutive differences in their expression levels between the 2 strains; (ii) relatively stable expression levels in resistant snails as compared with susceptible snails, and (iii) strong increase in transcript levels in susceptible snails, in some cases followed by a decrease at 10 and 48 h post-infection (dual oxidase, FREP3, F-Spondin, integrin α 5). Note that expression levels of the integrin α 5 like gene, even if increased in susceptible snails, remain much lower than that of resistant snails.

4. Discussion

Many studies focusing on immune responses towards a particular pathogen have been using cDNA libraries from immune-challenged animals, or subtractive (challenged vs unchallenged) libraries [44–46]. Because of the veterinary and medical importance of *B. glabrata* as an intermediate host of *S. mansoni*, most previous studies analysed differential gene expression following infection with this parasite [9–12]. However, very few immune-relevant genes have been characterized so far. It is therefore crucial, not only to keep investigating genes specifically regulated after infection, but also to identify most genes potentially involved in immune processes, regardless the nature of the immune challenge. For this reason, we based our EST sequencing approach on the analysis of cDNAs from circulating hemocytes collected from hundreds of snails that were uninfected but maintained in non-axenic conditions. Our study, as well as others performed on different species [47,48], confirmed that this approach permits identification of important immune-relevant genes, even if particular transcripts potentially expressed in response to specific immune-challenges may remain undetected. Out of the 1613 ESTs analysed here, 31 clusters were identified as potential immune-relevant genes based on their sequence similarities to known genes, and 23 of these clusters corresponded to novel *B. glabrata* genes. Most interestingly, seven of these

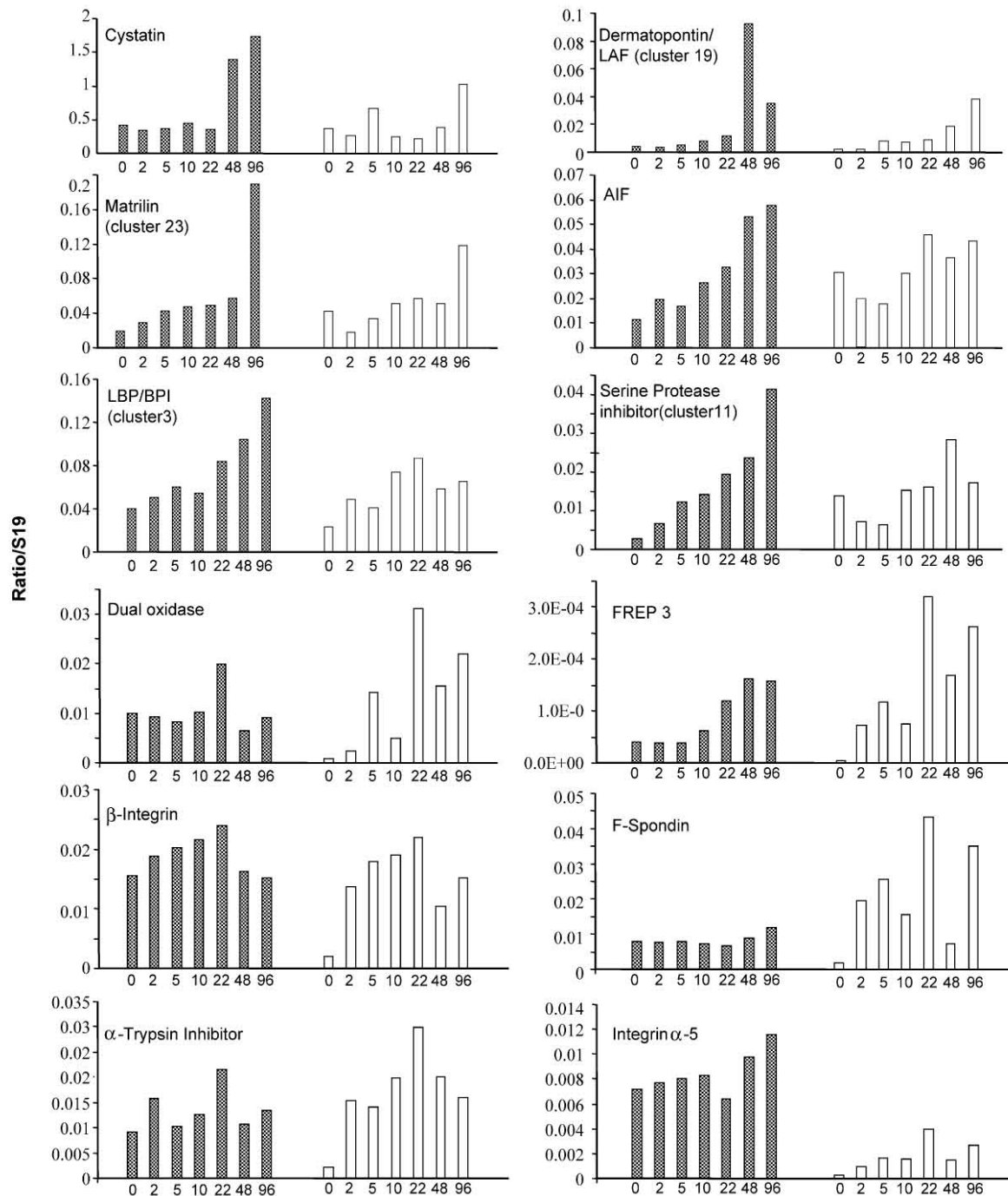


Fig. 2. Expression profiles of 12 potential immune-relevant genes in the resistant CB snails (dark boxes) and susceptible EAF snails (light boxes) at various times following exposure to *E. caproni*. Each cDNA is identified by the closest annotated match. Expression ratios were determined using real-time quantitative PCR and are expressed relative to S19 expression levels (ratio candidate/S19).

novel cDNAs, significantly aligned with immune genes that had never been reported in mollusc species.

The most surprising observation is the identification of two genes presenting sequence similarities to vertebrate immunoregulatory molecules such as a cytokine and a cytokine-regulated molecule. Regarding cytokines, extensive efforts have been made, in past studies, to identify orthologs of vertebrate cytokines from molluscs and other invertebrates [49]. Numerous studies, using functional assays or immune-reactivity, confirmed the existence of invertebrate immunoregulatory molecules functioning as analogs of vertebrate cytokines [49]. However, most studies investigating the existence of molecules presenting sequence similarities with vertebrate cytokines have failed [49]. To our knowledge, the only molluscan genes characterized so far as being orthologous to vertebrate cytokines are members of the TGF- β superfamily, but their role in immunity remains unclear [49,50]. In the present study, we identified a potential cytokine-like molecule displaying significant sequence similarity to macrophage migration inhibitory factor (MIF) from nematodes and vertebrates. This molecule is an important mediator of innate immunity that is not regulated transcriptionally (see [42] for review). MIF is rapidly released in vertebrates after stimulation with bacterial endotoxins and exotoxins, or other endogenous cytokines. Investigations into the mechanisms whereby MIF modulates innate immune responses to endotoxin and Gram-negative bacteria have shown that MIF up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), the signal-transducing molecule of the LPS receptor complex. Thus, MIF enables cells, such as the macrophage, to sense promptly the presence of invading Gram-negative bacteria and to mount an innate immune response. In nematodes, these molecules are involved in immune evasion strategies by inducing a counter-inflammatory response, either by desensitization or by stimulating macrophages beyond the short-term acute time period which has generally been examined [41]. Regarding cytokine-regulated molecules, we identified several ESTs (cluster 31) presenting sequence similarities to mammalian allograft inflammatory factors (AIF). To date, such AIFs have only been found in vertebrates [43] and in sponges [51,52]. Mammalian AIF-1 are inducible polypeptides expressed during allograft

rejection and are potentially regulated during inflammatory responses [43]. In sponges, they are also upregulated during alloimmune rejection [52]. An upregulation of the AIF-like transcript in resistant immune-challenged *B. glabrata* (greater than 5-fold) further supports that the corresponding gene may be involved in immune processes. Both MIF and AIF-like genes deserve further studies aimed at establishing their potential involvement in snail immunity.

A second surprising observation is the identification of a PGRP-like gene. PGRPs are known to be conserved from insects to mammals (see [37] for review), but this is the first report of a PGRP-like gene from a non-insect invertebrate. These genes encode pattern recognition proteins that recognize bacteria and their unique cell wall component, peptidoglycan. Insect PGRPs have been grouped into two classes: short PGRPs (PGRP-S) which are extracellular, and long PGRPs (PGRP-L), which are either intracellular or membrane-spanning proteins [37]. Based on the deduced amino acid sequence, *B. glabrata* PGRP gene belongs to the class of long PGRPs (PGRP-L).

A third category of immune-relevant genes not previously reported from gastropods are potential antimicrobial molecules. Among the ESTs from the present study, two clusters displayed sequence similarities with two distinct bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) from vertebrates, presenting BPI1 and two domains, respectively. Two other clusters displayed similarities with antibacterial peptides from the leech *Theromyzon tessulatum*. BPI and antibacterial peptides (defensins) are components of polymorphonuclear leucocytes (PMN) granules which function in both phagocytosis and extracellular killing of microbes [53]. Although such genes have not been identified in gastropods so far, their potential expression in *B. glabrata* hemocytes, would not be surprising as hemocytes are a heterogeneous group of cells comprising granulocytes which are functional analogs of PMNs [54].

In addition to exploring novel immune-relevant genes, we examined expression patterns of the 31 candidate transcripts in susceptible and resistant snails following infection. Some candidate transcripts did not exhibit regulation of expression. This, however, does not mean that they are not involved in immune processes, as they may be either: (i) regulated in response to other immune challenges; (ii) non-transcriptionally

regulated; or (iii) nonregulated immune genes. Future studies should therefore investigate their potential involvement in immune processes. In addition, because expression analysis was performed using entire snail tissues, expression changes may reflect changes in hemocyte response as well as potential changes in other tissues. Twelve of the 31 candidate genes appeared highly regulated and exhibited differential expression between the two strains. Observation of expression patterns does not reveal a general and common mode of expression/regulation, but a set of complex patterns of expression. It is premature, at this stage, to attempt to give a functional interpretation of expression patterns of each regulated transcript, and here we will only discuss some of the most significant variations.

A first observation is that several genes, potentially involved in cell-adhesion processes exhibit expression differences between the two strains. For example, constitutive differences in expression ratios have been observed with the Integrin α 5, Integrin β and F-spondin-like transcripts. In addition, two other transcripts potentially involved in adhesive processes are highly upregulated after infection: the dermatopontin/LAF and matrilin-like genes. Although expression of both transcripts is upregulated in susceptible as well as resistant snails, induction appears higher in resistant snails. In particular, the transcript showing similarities with dermatopontin/LAF exhibit a 40 fold induction in resistant snails. In addition to its sequence similarity with dermatopontin, this transcript also aligns significantly with *Limulus* amebocyte aggregation factor (LAF), known to be involved in promoting aggregation of amebocytes [39]. Because, hemocytes from susceptible and resistant *B. glabrata* have been shown to present different adhesive responses in the presence of *E. caproni* in vivo and in vitro [13,14], future studies should investigate the potential link between differential hemocyte adhesive properties and differential expression (constitutive or induced) of these potential adhesion-related genes.

A second observation is that eight out of the 12 regulated transcripts show either a relatively stable expression (β -integrin dual-oxidase, and F-spondin-like genes) or a gradual up-regulation (matrilin, AIF, LBP/BPI, Serine protease inhibitor, FREP-3-like genes) in resistant snails, while, in the susceptible

strains, they present complex expression patterns involving both up and down-regulations. Two non-exclusive hypotheses may explain the higher complexity of expression patterns observed in susceptible snails. A first explanation is that because sporocysts of *E. caproni* are known to interfere with immune functions [2,14], they may alter expression of some immune-relevant genes in susceptible snails. In resistant snails, on the contrary, their rapid encapsulation and killing would prevent them from interfering with expression of the same genes. This could be illustrated by the expression patterns of the LBP/BPI, AIF, and serine-protease inhibitor-like genes, for example. A second explanation is that the response mounted by resistant snails is, to some extent, more specific as it corresponds to the immune response that is efficient against this parasite. On the contrary, susceptible snails would mount various defence responses, inefficient and potentially uncoordinated. It is known that susceptible snails, even if failing to encapsulate and kill the parasite, do establish an immune response after infection. For example, the number of circulating hemocytes significantly increases following infection in both resistant and susceptible snails [13], and it is therefore likely that potential immune genes are regulated in susceptible as well as in resistant snails. Advances made with arthropod innate immunity demonstrate that, although nonadaptive, the immune system of invertebrates involves various pathways that may be selectively activated depending on the nature of the immune challenge [55–57]. Expression patterns observed for FREP-3 and F-spondin-like transcripts, for example, could reflect activation of immune responses that would be non-efficient against this parasite. These genes exhibit upregulations of 87 and 23-fold, respectively, in susceptible snails and a weak (max four-fold) or no induction in resistant snails.

In conclusion, the sequencing of over 1700 ESTs from *B. glabrata* hemocytes has yielded substantial new information on the immune function (and other genes) of this species. Most importantly, we have identified several cDNAs similar to immune genes that had never been seen in molluscs, such as PGRP, MIF, AIF, or LBP/BPI-like genes. These genes clearly deserve further study as they may be functionally involved in snail–trematode relationships. In addition, their complete structural and functional

characterization may provide crucial information for a better understanding of the evolution of innate immunity.

Acknowledgements

Authors are grateful to Anne Rognon for technical assistance and to Dr Luc Aujame (Aventis-Pasteur) for free access to his Qiagen Biorobot 9600. This work was supported by the CNRS (SDV).

References

- [1] Van der Knaap WPW, Loker ES. Immune mechanisms in trematod-snail interactions. *Parasitol Today* 1990;6(6): 175–82.
- [2] Loker ES, Adema CM. Schistosomes, echinostomes and snails: comparative immunobiology. *Parasitol Today* 1995; 11(3):120–4.
- [3] Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(16):8691–6.
- [4] Zhang SM, Adema CM, Kepler TB, Loker ES. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* 2004; 305(5681):251–4.
- [5] Davids BJ, Wu XJ, Yoshino TP. Cloning of a beta integrin subunit cDNA from an embryonic cell line derived from the freshwater mollusc, *Biomphalaria glabrata*. *Gene* 1999; 228(1–2):213–23.
- [6] Bender RC, Bayne CJ. Purification and characterization of a tetrameric alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. *Biomphalaria glabrata*. *Biochem J* 1996;316(3):893–900.
- [7] Duclermortier P, Lardans V, Serra E, Trottein F, Dissous C. *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins. *Parasitol Res* 1999;85(6):481–6.
- [8] Jones CS, Lockyer AE, Rollinson D, Noble LR. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata*–*Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. *Parasitology* 2001;123(Suppl.): S181–S96.
- [9] Miller AN, Raghavan N, FitzGerald PC, Lewis FA, Knight M. Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *Int J Parasitol* 2001;31(7):687–96.
- [10] Coustau C, Mita G, Dissous C, Guillou F, Galinier R, Allienne JF, et al. *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni* excretory-secretory products differentially affect gene expression in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Parasitology* 2003;127(6):533–42.
- [11] Raghavan N, Miller AN, Gardner M, FitzGerald PC, Kerlavage AR, Johnston DA, et al. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;126(2):181–91.
- [12] Lockyer AE, Noble LR, Rollinson D, Jones CS. *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Exp Parasitol* 2004;107(1–2):97–104.
- [13] Ataev GL, Coustau C. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. *Dev Comp Immunol* 1999;23(3): 187–98.
- [14] 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(6):651–60.
- [15] Guillou F, Mita 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* 2004;138(2):175–81.
- [16] Langed J, Jourdan 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.
- [17] Jeyarasingam U, Heyneman D, Lim HK, Mansour N. Life cycle of a new echinostome from Egypt, *E. liei* sp. nov. (Trematoda; Echinostomatidae). *Parasitology* 1972;65:203–22.
- [18] Trouvé S, Renaud F, Durand P, Jourdan J. Selfing and outcrossing in a parasitic hermaphrodite helminth (Trematoda, Echinostomatidae). *Heredity* 1996;77:1–8.
- [19] Sminia T, Barendsen L. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails, *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncatus*. *J Morphol* 1980;165:31–9.
- [20] Henikoff S, Henikoff JG. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(22): 10915–9.
- [21] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25(17):3389–402.
- [22] Roos D, Van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 2003;5(14): 1307–15.
- [23] Zhang H, Evenhuis JP, Thorgaard GH, Ristow SS. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 2001;25(1):25–35.
- [24] Elsbach P, Weiss J. Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(1):45–9.
- [25] Elsbach P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol* 1998;64(1): 14–18.

- [26] Bilej M, de Baetselier P, Van Dijck E, Stijlemans B, Colige A, Beschin A. Distinct carbohydrate recognition domains of an invertebrate defense molecule recognize Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 2001;276(49):45840–7.
- [27] Beschin A, Bilej M, Hanssens F, Raymakers J, Van Dyck E, Revets H. Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J Biol Chem* 1998;273(38):24948–54.
- [28] Lee SY, Wang R, Soderhall K. A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem* 2000;275(2):1337–43.
- [29] Tasiemski A, Vandenbulcke F, Mitta G, Lemoine J, Lefebvre C, Sautiere PE, et al. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid: the leech *Theromyzon tessulatum*. *J Biol Chem* 2004;279(30):30973–82.
- [30] Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol* 1999;23(4–5):291–301.
- [31] Levashina EA, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, et al. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science* 1999;285(5435):1917–9.
- [32] Griesch J, Wedde M, Vilcinskas A. Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Biochem Mol Biol* 2000;30(6):461–72.
- [33] Wedde M, Weise C, Kopacek P, Franke P, Vilcinskas A. Purification and characterization of an inducible metalloproteinase inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Eur J Biochem* 1998;255(3):535–43.
- [34] Zhang SM, Leonard PM, Adema CM, Loker ES. Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics* 2001;53(8):684–94.
- [35] Zhang SM, Loker ES. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. Fibrinogen-related proteins. *Dev Comp Immunol* 2003;27(3):175–87.
- [36] Hertel LA, Stricker SA, Monroy FP, Wilson WD, Loker ES. *Biomphalaria glabrata* hemolymph lectins: binding to bacteria, mammalian erythrocytes, and to sporocysts and rediae of *Echinostoma paraense*. *J Invertebr Pathol* 1994;64(1):52–61.
- [37] Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol* 2004;40(12):877–86.
- [38] Marxen JC, Nimtz M, Becker W, Mann K. The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. *Biochim Biophys Acta* 2003;1650(1–2):92–8.
- [39] Fujii N, Minetti CA, Nakhasi HL, Chen SW, Barbehenn E, Nunes PH, et al. Isolation, cDNA cloning, and characterization of an 18-kDa hemagglutinin and amebocyte aggregation factor from *Limulus polyphemus*. *J Biol Chem* 1992;267(31):22452–9.
- [40] Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing 'danger': galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J* 2004;19(7–9):583–91.
- [41] Maizels RM, Gomez-Escobar N, Gregory WF, Murray J, Zang X. Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol* 2001;31(9):889–98.
- [42] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(10):791–800.
- [43] Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett* 2002;514(2–3):115–21.
- [44] Bayne CJ, Gerwick L, Fujiki K, Nakao M, Yano T. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Dev Comp Immunol* 2001;25(3):205–17.
- [45] Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguere C, Girardot AL, Garnier J. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 2003;303:139–45.
- [46] Zhu Y, Johnson TJ, Myers AA, Kanost MR. Identification by subtractive suppression hybridization of bacteria-induced genes expressed in *Manduca sexta* fat body. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33(5):541–59.
- [47] Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol* 2001;25(7):565–77.
- [48] Shida K, Terajima D, Uchino R, Ikawa S, Ikeda M, Asano K. Hemocytes of *Ciona intestinalis* express multiple genes involved in innate immune host defense. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302(2):207–18.
- [49] Beschin A, Bilej M, Torreele E, de Baetselier P. On the existence of cytokines in invertebrates. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(5–6):801–14.
- [50] Herpin A, Lelong C, Favrel P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 2004;28(5):461–85.
- [51] Kruse M, Steffen R, Batel R, Muller IM, Muller WE. Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges. *J Cell Sci* 1999;112(23):4305–13.
- [52] Muller WE, Krasko A, Skorokhod A, Bunz C, Grebenjuk VA, et al. Histocompatibility reaction in tissue and cells of the marine sponge *Suberites domuncula* in vitro and in vivo: central role of the allograft inflammatory factor 1. *Immunogenetics* 2002;54(1):48–58.

- [53] Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol* 1997;34(4):343–54.
- [54] Cheng TC, Dougherty WJ. Ultrastructural evidence for the destruction of *Schistosoma mansoni* sporocysts associated with elevated lysosomal enzyme levels in *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 1989;75(6):928–41.
- [55] Iwanaga S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr Opin Immunol* 2002;14(1):87–95.
- [56] Lee SY, Soderhall K. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol* 2002;12(5):421–37.
- [57] Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 2003;426(6962):33–8.