



HAL
open science

Monogamie et changements de partenaires chez un parasite monogame, *Schistosoma mansoni*

S. Beltran

► **To cite this version:**

S. Beltran. Monogamie et changements de partenaires chez un parasite monogame, *Schistosoma mansoni*. Sciences de l'environnement. Université de Perpignan, 2009. Français. NNT: . tel-00939328

HAL Id: tel-00939328

<https://theses.hal.science/tel-00939328>

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.

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE VIA DOMITIA PERPIGNAN
THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE VIA DOMITIA
Biologie - Ecologie comportementale - Evolution
Spécialité : Parasitologie
Ecole Doctorale : Energie et Environnement
présentée par

Sophie BELTRAN

MONOGAMIE ET CHANGEMENTS DE PARTENAIRE chez un parasite monogame,
Schistosoma mansoni



Thèse dirigée par André THERON et Jérôme BOISSIER

Soutenue le 20 novembre 2009 devant le jury composé de :
Pr Dominique ALLAINE, Université de Lyon 1, Rapporteur
MER, PD Philippe CHRISTE, Université de Lausanne, Rapporteur
Pr Frank CEZILLY, Université de Bourgogne, Examineur
CR Franck PRUGNOLLE, IRD Montpellier, Examineur
DR André THERON, Université de Perpignan, Directeur de thèse
MC Jérôme BOISSIER, Université de Perpignan, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Comment ne pas remercier ceux qui m'ont épauler durant ces années pleines de bouleversements et de construction professionnelle et personnelle...

A commencer par Claude COMBES sans qui rien n'aurait été possible... et mes directeurs de thèse, André THERON et Jérôme BOISSIER, pour leur soutien, leur enthousiasme et leur ouverture d'esprit... et oui, il en a fallu !

Tous mes remerciements au Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne et en particulier à toute l'équipe de Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive dont Guillaume, Benjamin, Christoph, David, Céline, Hélène, Gabriel, Juliette, Elisabeth... qui ont su apporter à mon sujet une aide précieuse et des lumières essentielles.

Un grand merci à Irma Fagette pour son investissement, sa bonne humeur et ses inexorables appels téléphoniques... Merci à Anne pour son travail et son investissement à la « bibliothèque », à Anne et Nathalie pour leur aide précieuse dans l'animalerie « mollusque », à Bernard et ses poèmes dans l'animalerie « vertébré », à Rémi pour son indispensable assistance informatique, à Jef et Richard pour leur soutien technique et moral en biologie moléculaire. Quel humour, quels échanges, quels sourires, quelles joies à votre contact ne vais-je pas regretter ? Je vous souhaite à tous tout le meilleur tant d'un point de vue personnel que professionnel!

Merci également aux membres passés et présents de la « salle des thésards », Anne, Géraldine, Guillem, Manu, Mathieu, Pauline, Rodrigues, Yves pour les nombreuses discussions (pas toujours scientifiques), les fous rires (parfois nerveux certes), les encouragements et conseils... Je vous souhaite beaucoup de bonnes choses et notamment une belle poursuite scientifique...

Merci à toutes les souris, mollusques et schistosomes durant ma thèse, sans eux je n'en serais certainement pas là non plus...

Merci à l'équipe « MONOGAMIX » et particulièrement à Frank et François-Xavier qui m'ont permis de voir ce qu'est le terrain et de vivre une sacrée expérience humaine.

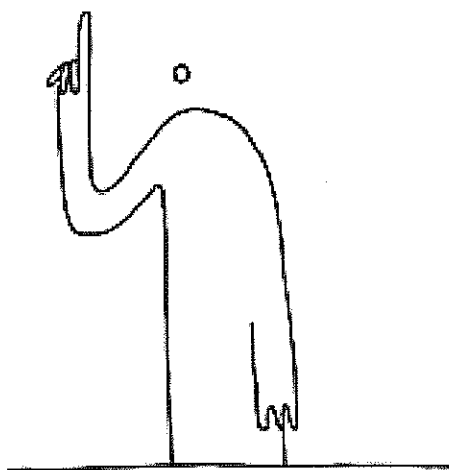
Merci à ma si chère « famille en kit », à mes grands parents, qui ont fêté cette année leur 60 ans de mariage (un magnifique exemple de « long term

monogamy »), à mes parents divorcés (lol), à ma mère Corinne, à Patrick, à mon père Eloi, à ma sœur Caroline, à mes frères Thomas et Kévin, à Stéphane et Karine ainsi qu'à ma « belle famille », Brigitte, Lucien, Valérie et Vincent, pour votre diversité à tous et votre richesse intérieure, vous êtes si chers à mon cœur! Vous êtes tous, de près ou de loin, responsables de ce que je suis aujourd'hui et parfois même de mon orientation professionnelle!

Merci à mes amis, Anne, Coco, Karima, Stéphanie, Sandrine, Frédérique, Julien... pour leurs apports, leur soutien et pour ce qu'ils sont, tout simplement !

Et non, je ne t'ai pas oublié... Nicolas, que serai-je sans toi ? Merci pour tout, pas besoin d'en rajouter, nous nous comprenons...

Merci à tous...



*voilà raison de me lire
est ma raison d'être...*

o
|
FRO|SSARD

SOMMAIRE

PROLOGUE	1
L'évolution biologique	1
Le paradoxe de la monogamie	2
INTRODUCTION	4
Monogamie, définition et personnages en scène	4
Origine et maintien de la monogamie	5
Origine de la monogamie	5
Maintien de la monogamie	7
Monogamie sociale, infidélités et divorces	8
<i>Schistosoma mansoni</i> , modèle de choix dans l'étude de la monogamie.....	11
Présentation du modèle biologique.....	11
Problématiques de la thèse.....	15
CHAPITRE I	22
QUI EST MONOGAME PARMIS LES SCHISTOSOMATIDAE ET POURQUOI ?	23
I.1. Publication: « Schistosome monogamy: who, how and why? » Trends in Parasitology, 24, 386-391 (2008) et nouveautés	24
I.1.1. Monogamie au sein des schistosomatidae ?	24
I.1.2. Pourquoi l'installation et le maintien de la monogamie chez les schistosomes ?	25
I.2. Publication « Mating systems and evolutionary trade-offs between morpho-anatomical features in Schistosomatidae », en préparation.	38
CHAPITRE II	67
MONOGAMIE SOCIALE ET GÉNÉTIQUE CHEZ SCHISTOSOMA MANSONI ?	68
II.1. Publication: « Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all <i>Schistosoma mansoni</i> stages ». Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103, 501-503 (2008).	70
II. 2. Publication: « Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes » Plos One, 3, e3328. doi:10.1371/journal.pone.0003328 (2008).....	75

II. 3. Publication : «Are schistosomes socially and genetically monogamous?»
Parasitology Research, 104, 481-483 (2009). 83

CHAPITRE III88

**BIAIS DE SEX RATIO EN FAVEUR DES MÂLES CHEZ LES SCHISTOSOMES,
MONOGAMIE ET CHANGEMENTS DE PARTENAIRE 89**

III. 1. Publication : « Male Biased Sex Ratio: Why and What Consequences for
Schistosoma Genus? » Trends in Parasitology, submitted. 91
Facteurs proximaux du biais de sex ratio en faveur des mâles..... 91
Facteurs ultimes du biais de sex ratio en faveur des mâles..... 94

III. 2. Publication : « Adult sex ratio affects divorce rate in the monogamous
endoparasite *Schistosoma mansoni* » Behavioral Ecology and Sociobiology,
63:1363-1368 (2009). 114

CHAPITRE IV.....123

CHANGEMENTS DE PARTENAIRE ET SÉLECTION SEXUELLE124

IV. Publication : « Molecular basis of genotype dependant concomitant immunity in
Schistosoma mansoni: candidate proteins identified by a proteomic approach», en
préparation. 125

SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES161

Quel est le lien entre taux de changements de partenaire et taux de descendants
issus de ces changements? Quel est le rôle du réceptacle séminal de la femelle ?
..... 163

Gain de diversité génétique = gain de valeur sélective (« fitness ») ? 164

Hypothèses mécanistiques du « choix » de la femelle pour la dissimilarité..... 172

Schéma évolutif général du système de reproduction chez *Schistosoma mansoni* 176

EPILOGUE178

Schistosoma mansoni, un modèle magique 178

« Mieux vaut un tiens que deux tu l'auras »..... 178

Et l'Homme dans tout ça ?..... 179

BIBLIOGRAPHIE180

ANNEXES191

Annexe 1 : 191

Article soumis dans Nature Methods sur l'identification de nouveaux marqueurs du sexe chez *S. mansoni* : « Whole-genome comparison : identification of sex-specific sequences in *Schistosoma mansoni* »..... 191

Annexe 2 : 204

Article en cours d'écriture sur le suivi d'une souche de *S. mansoni* depuis sa récupération sur le terrain en 2005 et durant trois ans de maintien en laboratoire : « Follow-up of the genetic diversity and a parasite life history trait of a *Schistosoma mansoni* strain from field to laboratory »..... 204

ILLUSTRATIONS

Figure 1: Cycle simplifié de <i>Schistosoma mansoni</i>	11
Figure 2: Photographie en microscopie électronique du couple <i>S. mansoni</i> . La femelle (plus fine) vit dans le canal gynéochophore de son mâle (plus musculeux) en position ventrale.	13
Figure 3: Couverture de Trends in Parasitology 24 (2008) lors de la publication de cet article.....	24
Figure 4: Schéma d'une femelle Schistosomatidae.....	40
Figure 5: Schéma d'un mâle Schistosomatidae.....	40
Figure 6: Schéma de l'étape préliminaire de sexage et de génotypage (profil génétique neutre) des populations clonales de cercaires.....	68
Figure 7: Schéma du protocole expérimental en condition d'excès de mâles. Le même protocole peut être réalisé en condition d'excès de femelles.....	70
Figure 8: Schéma du protocole pour tester l'influence du biais de sex ratio en faveur des mâles. Le même protocole proposant différentes femelles à un mâle est également réalisé pour tester l'influence du biais de sex ratio en faveur des femelles	115
Figure 9: Schéma du protocole pour tester le lien entre diversité génétique neutre entre les mâles et polymorphisme phénotypique d'immunisation.....	128
Figure 10: Résultats des mesures réalisées sur différentes souches de <i>Schistosoma mansoni</i>	171
Figure 11: Evolution du taux d'infectivité du parasite en fonction de la similarité génétique entre « clone immunisant » et « clone infestant »	175
Figure 12: Schéma évolutif du système de reproduction chez <i>Schistosoma mansoni</i>	176

GLOSSAIRE

COURSE AUX ARMEMENTS : en biologie de l'évolution, l'analogie de la course aux armements est utilisée pour qualifier une situation de co-évolution adaptative entre deux espèces dans laquelle les stratégies évolutives de l'une répondent aux stratégies de l'autre, et réciproquement.

FITNESS ou **VALEUR SELECTIVE** : elle décrit la capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire. C'est une mesure de la sélection naturelle. La fitness ou valeur sélective w d'un génotype correspond au nombre de descendants viables et fertiles que produit en moyenne chaque individu de ce génotype à la génération suivante.

MONOGAMIE : système d'appariement qui lie une seule femelle avec un seul mâle.

POLYGAMIE : système d'appariement qui lie un mâle avec plusieurs femelles (polygynie) ou une femelle avec plusieurs mâles (polyandrie).

POLYGYNIE : système d'appariement qui lie un mâle avec plusieurs femelles.

POLYANDRIE : système d'appariement qui lie une femelle avec plusieurs mâles.

POLYGYNANDRIE ou **PROMISCUITE** : système d'appariement qui lie plusieurs femelles avec plusieurs mâles.

POÏKILOTHERME ou **hétérotherme** : se dit d'un organisme dont la température interne varie. Elle n'est pas régulée comme chez les homéothermes, dont la température varie très peu. On parle également d'animaux à sang froid.

SELECTION DE PARENTELE ou **KIN SELECTION** : cette théorie offre une explication des comportements altruistes au sein d'un groupe. Du point de vue darwinien, un comportement qui minimise l'aptitude d'un individu au profit d'un autre n'a pas de sens : il aurait dû être éliminé (puisque l'individu altruiste, en se sacrifiant, ne transmet pas ses « gènes de l'altruisme »). Le paradoxe a été résolu de manière élégante par la théorie de la sélection de parentèle (W.D. Hamilton) : un comportement altruiste peut être préservé par l'évolution s'il bénéficie à un individu génétiquement apparenté. Les coûts du comportement altruiste sont alors compensés par la survie des gènes.

PROLOGUE

Dieu observe la méchanceté et la perversité des hommes, et décide de faire tomber un Déluge sur la terre pour y détruire toute vie. Un homme, Noé, trouve toutefois grâce aux yeux de Dieu, et est choisi pour survivre et perpétuer sa lignée. Dieu, pour cette raison, demande à Noé de construire une arche puis lui dit : « Entre dans l'arche, toi et toute ta famille, car je t'ai vu seul juste à mes yeux parmi cette génération. De tous les animaux purs, tu prendras sept paires, le mâle et sa femelle; des animaux qui ne sont pas purs, tu prendras un couple, le mâle et sa femelle et aussi des oiseaux du ciel, sept paires, le mâle et sa femelle, pour perpétuer la race sur toute la terre. Car encore sept jours et je ferai pleuvoir sur la terre pendant quarante jours et quarante nuits et j'effacerai de la surface du sol tous les êtres que j'ai faits. » (La Bible Génèse 7.1 à 7.4).

Cette introduction quelque peu provocatrice illustre le poids de la morale religieuse sur nos convictions conjugales et pourrait peut-être expliquer (entre autres points) notre intérêt pour la MONOGAMIE (voir glossaire). Un autre point pourrait expliquer l'engouement des scientifiques (peut-être fascinés par le miroir d'un idéal dans les sociétés humaines) : ce système d'appariement monogame si particulier représente un paradoxe. Mais avant d'expliquer en quoi la monogamie constitue un paradoxe, il est indispensable de poser le cadre évolutif dans lequel se place le scientifique pour comprendre les facteurs impliqués dans l'installation et le maintien de ce système d'appariement.

L'évolution biologique

L'évolution biologique est un phénomène décrit pour la première fois par Charles Darwin (1809-1882) dans son ouvrage *De l'origine des espèces* (1859) dans lequel les mécanismes de l'évolution du vivant émergent, *via* la sélection naturelle. En profonde contradiction avec les idées philosophiques et religieuses dominantes de l'époque, *De l'origine des espèces* obtient un écho conséquent et convainc rapidement la majorité des biologistes de la réalité de l'évolution.

La sélection naturelle désigne le fait que les traits qui favorisent la survie et la reproduction d'un individu dans un environnement donné, voient leur fréquence

s'accroître d'une génération à l'autre. Cela découle logiquement du fait que les porteurs de ces traits ont plus de descendants portant eux-mêmes ces traits. Cette théorie de l'évolution repose donc sur trois principes (Mayr, 1982): le principe de variation selon lequel les individus diffèrent les uns des autres, le principe d'adaptation selon lequel les individus les plus adaptés au milieu survivent et se reproduisent davantage, et enfin, le principe d'hérédité selon lequel les caractéristiques avantageuses doivent être héréditaires.

L'organisation sociale de chaque espèce n'échappe pas à ce mécanisme de sélection naturelle et la monogamie étant un système d'organisation sociale de la reproduction, elle s'installe et se maintient au travers de ce même processus. Ainsi, rien ne se fait « consciemment ou intentionnellement ». La sélection naturelle a façonné, en sélectionnant les « bonnes choses » apparues au hasard, les processus de décision de l'animal de telle manière qu'ils lui confèrent une certaine efficacité en terme de capacité à diffuser ses gènes. Les raccourcis que nous pourrions faire du type « la femelle fait ceci *pour* cela » permettent donc seulement un raccourci logique du point de vue de notre compréhension des mécanismes de l'adaptation biologique.

Le paradoxe de la monogamie

La raison pour laquelle la monogamie est perçue comme un paradoxe est que l'on peut se demander pourquoi les mâles de certaines espèces ne vivent qu'avec une seule partenaire alors qu'ils sont capables de fertiliser plus d'œufs qu'elle ne saurait en produire.

De manière générale, il existe un conflit qui oppose les deux sexes, mâle et femelle (Chapman et al., 2003). Du fait de l'anisogamie (les gamètes mâles sont moins coûteux à produire que les gamètes femelles), les mâles ont un succès reproducteur uniquement limité par l'accès aux femelles (ils peuvent fertiliser plus d'œufs que la femelle ne peut produire). Les mâles peuvent donc investir dans l'effort de reproduction (ornementation et parades) et la POLYGYNIE ou la PROMISCUITE sont les systèmes d'appariement favorisés qui leur permet d'optimiser le nombre de descendants. Pour ce qui est des femelles, leur succès de reproduction est limité par l'accès à la ressource (les œufs sont très coûteux). Elles sont privilégiées quand elles peuvent bénéficier de soins de leur partenaire de reproduction et/ou d'un

territoire de bonne qualité. Il s'agit souvent du sexe qui choisit son partenaire (moins d'investissement possible dans l'ornementation et les parades) et le système monogame est favorisé. Cette vision des choses est très schématique car ce conflit entre les sexes peut se retrouver à différents niveaux :

- au niveau **génomique** (il existe un conflit entre les sexes *via* l'empreinte génétique où un seul des allèles, soit celui du père soit celui de la mère, s'exprime chez le descendant) (Pennisi, 1998) ;
- au niveau **physiologique/morphologique** (des caractères reproducteurs sont sélectionnés par ce conflit sexuel chez la drosophile (Hosken et al., 2001) chez qui l'on peut observer une augmentation de la taille des testicules des mâles pour augmenter la quantité de sperme en parallèle à une augmentation de spermicides dans les glandes accessoires des femelles pour garder le contrôle de la paternité) ;
- au niveau **écologique/comportemental** (des préférences différentes dans le système d'appariement, la femelle trouvant plus son intérêt dans la monogamie, le mâle dans la polygynie ou la promiscuité...) ;
- au niveau **évolutif** (le conflit peut conduire, quand les deux sexes résistent trop l'un à l'autre, à des différenciations, des incompatibilités et donc à des spéciations (Martin and Hosken, 2003)).

Le système monogame (bien que paradoxal du point de vue des mâles principalement) résulterait donc d'un compromis entre les sexes, c'est-à-dire d'un ajustement adaptatif des valeurs de deux caractères, ou plus, qui ne peuvent être optimisés simultanément.

A l'heure de l'interdisciplinarité, ce manuscrit va tenter de mettre en relief ce que des disciplines scientifiques allant de la biologie moléculaire à l'évolution en passant par l'écologie comportementale peuvent apporter à la question de la monogamie. Il est tout de même important d'avertir les lecteurs qu'il ne s'agit pas là de donner des réponses concrètes et finies à cette question brûlante et passionnante de la monogamie mais, sans avoir la prétention d'être exhaustif, de fournir des éléments intéressants issues de la bibliographie et d'études expérimentales.

INTRODUCTION

Pourquoi les mâles de certaines espèces ne vivent qu'avec une seule partenaire alors qu'ils sont capables de fertiliser plus d'œufs qu'elle ne saurait en produire ? Inversement, pourquoi les femelles ne s'accoupleraient-elles qu'avec un seul mâle ? Ces deux questions reviennent à se demander pourquoi il existe des animaux monogames, ce système d'appariement particulier qui intéresse, intéresse et intéressera longtemps les scientifiques, peut-être fascinés par le miroir d'un idéal dans les sociétés humaines...

Monogamie, définition et personnages en scène

Le système d'appariement monogame peut être observé à des niveaux différents (Reichard and Boesch, 2003). La monogamie sociale reflète l'observation d'un couple constitué uniquement d'un seul mâle et d'une seule femelle. Elle ne correspond pas toujours à la monogamie génétique, considérée aujourd'hui comme une exception, qui implique une relation sexuelle exclusive entre les deux partenaires, ou du moins que la progéniture élevée par le couple soit bien le fruit exclusif des accouplements entre les deux partenaires (Danchin et al., 2005; Hughes, 1998). Quel que soit le niveau de monogamie (sociale ou génétique), ce système d'appariement peut également être considéré sur différentes échelles de temps. La monogamie séquentielle (ou sérielle) est rythmée par les saisons de reproduction, ce qui est fréquent, notamment chez les oiseaux migrateurs (Poirier et al., 2004) ; alors que la monogamie permanente, plus rare, dure toute la vie des individus. Cette dernière se rencontre plus particulièrement chez les mammifères (Reichard and Boesch, 2003).

Plusieurs hypothèses non exclusives sont proposées pour expliquer l'évolution et le maintien d'un système monogame. Les réflexions portant sur la compréhension du système d'appariement monogame sont, pour la majeure partie, issues de modèles « oiseau ». Ceci semble logique à la vue de l'importance de ce système d'appariement au sein de ce groupe. En effet, 90% des oiseaux sont monogames (Reichard and Boesch, 2003). Chez les vertébrés, des études révèlent quand même des cas de monogamie chez les mammifères (Brotherton and Manser, 1997;

Fernandez-Duque et al., 2008; Gubernick and Teferi, 2000; Runcie, 2000), les poissons (DeWoody et al., 2000), les reptiles (Bull, 2000) ou les amphibiens (Gillette et al., 2000; Prosen et al., 2004). Chez les invertébrés, les cas de monogamie sont plus rares, nous les trouvons chez certaines espèces de crustacés du genre *Alpheus* (Mathews, 2002, 2003), ou d'insectes du genre *Nicrophorus* (Eggert et al., 1998). En dehors des espèces d'invertébrés libres, certaines espèces parasites sont connues pour présenter un système monogame. Les parasites de Crustacés des genres *Sacculina*, *Aphanodomus* et *Gonophysema* pourraient par exemple être considérés comme étant monogames, les deux sexes étant associés de façon fusionnelle dans leur hôte, donnant l'apparence d'organismes hermaphrodites. Chez des nématodes de la famille des Syngamidae, le mâle des deux espèces parasites *Syngamus trachea* (Fernando et al., 1971) et *Mammomonogamus laryngeus* (Nosanchuk et al., 1995) est plus petit que sa femelle et s'attache à la bourse copulatoire de sa partenaire, formant ainsi une forme caractéristique de « Y ». Enfin, si le gonochorisme est considéré comme un pré-requis à la monogamie - ce qui exclut les couples hermaphrodites de la famille des Diplozoidae formés à vie dans leur hôte et certaines espèces hermaphrodites de Didymozoidae – deux familles de Plathelminthes présentent des cas de monogamie : les Didymozoidae et les Schistosomatidae. Chez les Didymozoidae gonochoriques, les couples monogames sont souvent enkystés dans les tissus ou organes de leur hôte, le mâle logé dans le « creux » de sa femelle. Inversement, chez les Schistosomatidae qui regroupent une centaine d'espèces gonochoriques présentant plusieurs types de systèmes d'appariement (POLYGAMIE, POLYGYNANDRIE ou promiscuité et monogamie), les couples monogames arborent un fort dimorphisme sexuel (la femelle est plus longue et fine que le mâle), la femelle vivant à l'intérieur de son mâle (Loker and Brant, 2006).

Origine et maintien de la monogamie

Origine de la monogamie

La séparation des sexes induit un conflit d'intérêt dans la stratégie de reproduction de chaque sexe (Chapman et al., 2003). En effet, du fait de l'anisogamie (il est plus coûteux de produire un œuf qu'un spermatozoïde), le mâle, afin d'optimiser sa

reproduction, ne sera limité que par l'accès à un maximum de femelles tandis que pour la plupart des femelles, le facteur limitant, lié à la reproduction, sera l'accès à un maximum de ressources. Le mâle a donc tendance à chercher un maximum de compagnes, et a donc plus d'intérêts à être polygyne, alors que la femelle, qui a besoin d'un maximum de ressources, a plus d'intérêts à être monogame (ou polyandre). L'adoption d'un système d'appariement, qu'il soit monogame, polyandre, ou polygyne, résulte donc d'un compromis entre les sexes, c'est-à-dire d'un ajustement adaptatif des valeurs de deux caractères, ou plus, qui ne peuvent être optimisés simultanément (cf. Prélude). Concernant la monogamie, trois hypothèses non exclusives sont classiquement proposées pour en expliquer l'origine : la dispersion des femelles (Brotherton and Manser, 1997; Pereira et al., 2002), le soin biparental (Reichard and Boesch, 2003), et l'absence de variabilité des mâles et/ou de leur territoire (Danchin et al., 2005; Reichard and Boesch, 2003).

La dispersion des femelles est souvent considérée comme étant à la base de l'installation de la monogamie chez les mammifères. En effet, si les femelles sont trop dispersées, cela empêche les mâles d'en monopoliser plusieurs. Ceci est le cas chez les Antilopes (Brotherton and Manser, 1997; Komers, 1996; Komers and Brotherton, 1997), mais aussi chez certains lézard (Pereira et al., 2002).

Le soin paternel est souvent considéré comme étant à la base de l'installation de la monogamie chez les oiseaux. Le soin parental (maternel ou paternel) peut être défini comme tout investissement apporté par les parents qui augmentera la « FITNESS » (ou VALEUR SELECTIVE) de la descendance. Ce soin peut prendre deux formes : il peut être pré-zygotique (avant la fécondation) et/ou post-zygotique (après la fécondation). Les « cadeaux pré-nuptiaux » donnés par le mâle à la femelle chez certains insectes (Fedorka and Mousseau, 2002) ou la construction du nid chez les oiseaux (Moller and Cuervo, 2000) et les poissons (DeWoody et al., 2000; Neff, 2003), correspondent à un soin pré-zygotique. Par contre, couvrir, nourrir, ou encore défendre la descendance, représentent des soins post-zygotiques. C'est ainsi que nous pouvons expliquer le fait que 90% des espèces d'oiseaux sont monogames. En effet, chez les oiseaux, le père, au même titre que la mère, peut apporter des soins à sa progéniture sous la forme de couvaision ou de nourrissage ; chez les mammifères (seulement 3% d'espèces monogames), seule la mère peut effectuer les soins

équivalents : gestation et allaitement (Moller and Cuervo, 2000). En dehors des oiseaux, le rôle prépondérant du soin paternel dans l'installation de la monogamie peut être trouvé chez les mammifères comme chez certains primates (Fernandez-Duque et al., 2008), chez le renard *Otocyon megalotis* (Wright, 2006) ou dans des niveaux taxonomiques inférieurs, chez les poissons (DeWoody et al., 2000) ou chez les insectes du genre *Necrophorus* (Eggert et al., 1998).

L'absence de variation qualitative du mâle et/ou de son territoire est également un facteur perçu comme important dans l'installation de la monogamie. En effet, si, par exemple, la plupart des mâles sont capables de défendre un territoire, mais que la qualité d'un territoire varie d'un mâle à l'autre, les femelles ont le choix entre s'installer seules sur un territoire de faible qualité avec un mâle célibataire, ou se joindre à un mâle déjà apparié mais possédant un territoire plus riche. C'est ce que l'on appelle la théorie du seuil de polygynie (i.e. « Polygyny threshold theory ») (Danchin et al., 2005; Reichard and Boesch, 2003). Selon la variation entre mâles dans leur qualité propre et/ou dans celle du territoire qu'ils défendent, la femelle peut avoir un avantage à s'établir comme seconde femelle, avec un mâle particulièrement performant et/ou sur un territoire particulièrement favorable à la reproduction, malgré le coût de la polygynie. Il suffit que ce coût de la polygynie soit compensé par une haute qualité du mâle et/ou de son territoire. Par contre, selon la théorie inverse (i.e. « Reverse polygyny threshold theory »), lorsque les ressources sont uniformément réparties dans l'espace ou lorsqu'elles sont limitées, il serait impossible pour un mâle d'en contrôler une quantité suffisamment importante pour assurer la reproduction de plus d'une femelle. De la même manière, en absence de variation de qualité des mâles, la femelle préférerait s'accoupler avec un mâle célibataire plutôt que subir le coût de la polygynie. En quelque sorte, la monogamie serait le seul régime d'appariement possible tant que le seuil de polygynie n'est pas atteint (Danchin et al., 2005).

Maintien de la monogamie

Les trois dernières hypothèses (dispersion des femelles, soin paternel et l'absence de variation qualitative du mâle et/ou de son territoire) expliqueraient l'origine de la monogamie dans le règne animal. Il va sans dire que si ces trois facteurs peuvent

être à la base de ce système d'appariement monogame, ils peuvent également le maintenir. Mais d'autres éléments permettraient le maintien d'un tel système : l'agressivité intra-sexe et la séquestration.

L'agressivité entre individus du même sexe peut être un paramètre maintenant la monogamie. En effet, l'agressivité permet de repousser les prétendants du même sexe et leur empêche ainsi l'accès au partenaire de reproduction. Chez les espèces monogames, des agressions entre femelles et entre mâles se retrouvent, par exemple, chez des poissons Gobiidae (Harding et al., 2003; Whiteman and Côté, 2003), et uniquement entre femelles chez des oiseaux comme les phalaropes de Wilson (Delehanty et al., 1998).

La séquestration permettrait également le maintien de la monogamie. En effet, si un individu séquestre son partenaire, cela lui permet de monopoliser ce dernier et donc de bloquer son accès aux autres individus. Chez le gralline pie (*Grallina cyanoleuca*), c'est le mâle qui séquestre sa femelle : il lui impose des copulations fréquentes ainsi que des duos de chants pour la repérer et s'assurer qu'elle ne s'accouple pas avec d'autres mâles (Hall and Magrath, 2000). Chez les calaos, le mâle emmure même sa femelle (Stanback et al., 2002). Par contre, chez nombreuses espèces de la famille des Syngnathidae chez qui le mâle élève seul ces jeunes (soins uni-parentaux paternels post-zygotiques), le système d'appariement monogame observé (Foster and Vincent, 2004; Kvarnemo et al., 2000) serait maintenu par la séquestration, cette fois, du mâle par la femelle (Matsumoto and Yanagisawa, 2001).

Monogamie sociale, infidélités et divorces

La monogamie sociale ne correspond pas forcément à la monogamie génétique. L'infidélité ou le divorce sont des événements qui conduisent au fait que monogamie sociale et génétique ne coïncident pas toujours. L'infidélité, c'est lorsqu'un individu quitte ponctuellement son partenaire initial pour aller s'accoupler avec un autre individu ; il revient cependant vers le partenaire initial. Le divorce, quant à lui, est un changement définitif de partenaire (Choudhury, 1995). Chez les oiseaux, ces changements de partenaire sont souvent observés (Cézilly, 2006). Le taux de paternité hors couple (i.e. « EPP ou extra pair paternity ») chez les oiseaux

socialement monogames montre bien l'ampleur des infidélités : de 0 % à 55 % des poussins sont illégitimes et la proportion des nichées contenant au moins un poussin illégitime peut atteindre 87 % (Griffith et al., 2002). En dehors du modèle « oiseau », des cas de changements de partenaire sont également reportés chez des primates monogames (Palombit, 1996), des rongeurs (Svendsen, 1989), des lézards (Bull, 2000), et des poissons (Kvarnemo et al., 2000; van Breukelen and Draud, 2005).

Changer de partenaire peut présenter un intérêt adaptatif, mais ces changements peuvent également présenter des risques, notamment celui de ne pas retrouver de partenaire sexuel. Par exemple, l'intérêt pour une femelle serait d'obtenir les gènes d'un meilleur mâle, en étant infidèle à son partenaire initial, sans avoir à subir les effets coûteux de la polygynie, c'est-à-dire tout en conservant le soin paternel que fournit son partenaire initial dans un système socialement monogame (Hasselquist and Sherman, 2001). Cependant, l'infidélité peut représenter un risque pour la femelle si l'investissement paternel est associé à la fidélité. En effet, le mâle n'a aucun intérêt à s'investir pour des jeunes dont il n'est pas sûr d'être le père (Moller and Cuervo, 2000). Chez certains oiseaux, comme les phalaropes de Wilson (Delehanty et al., 1998), le tyran tritri (*Tyrannus tyrannus*) (Woodard and Murphy, 1999), le bécasseau d'Alaska (*Calidris mauri*) (Blomqvist et al., 2002), le calao de Monteiro (*Tockus monteiri*) (Stanback et al., 2002), ou encore chez des poissons comme le crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*) (Neff, 2003), le soin paternel est dépendant de la certitude de paternité. Être infidèle, c'est donc prendre le risque de perdre son partenaire initial.

Plusieurs hypothèses -adaptatives ou non- ont été proposées pour expliquer ces changements de partenaire (Choudhury, 1995). L'**hypothèse d'incompatibilité** (Choudhury, 1995; Coulson, 1966) suggère que, pris indépendamment, les deux membres du couple peuvent ne pas présenter de mauvaises qualités intrinsèques, mais ensemble, leurs qualités combinées diminuent leur succès reproducteur. En conséquence, chacun des membres du couple peut bénéficier d'un changement de partenaire. Selon l'**hypothèse de meilleure option** (Choudhury, 1995; Ens et al., 1993), il y a changement de partenaire lorsqu'un des membres du couple est capable d'augmenter son succès reproducteur en obtenant un nouveau partenaire de meilleure qualité que le précédent. L'**hypothèse des chaises musicales**

(Choudhury, 1995; Dhondt and Adriaensen, 1994) s'applique aux espèces dont le choix pour le territoire prime sur celui pour la qualité du partenaire sexuel et dont l'installation dans le territoire dépend des séquences d'arrivées sur le site après migration. Dans ce contexte, les changements de partenaire peuvent résulter d'une arrivée différentielle entre les partenaires du couple initial. Les individus arrivant en premier sur le meilleur territoire disponible s'y installent, l'individu du couple qui arrive en retard trouvera sa « chaise » occupée et devra s'installer sur un territoire différent. Selon l'**hypothèse de perte accidentelle** (Choudhury, 1995), les changements de partenaire peuvent arriver après une perte accidentelle du partenaire initial, par exemple à cause d'une séparation temporaire lors de la migration. Enfin, l'**hypothèse de divorce forcé** (Choudhury, 1995; Hatchwell et al., 2000) suggère que les changements de partenaire ne sont pas initiés par les partenaires du couple mais causés par l'intrusion d'un tiers qui se débarrasse d'un des membres du couple initial.

***Schistosoma mansoni*, modèle de choix dans l'étude de la monogamie**

Présentation du modèle biologique

Cycle biologique des schistosomes

Les schistosomes sont des parasites à cycle complexe (figure 1) responsables d'une maladie humaine, la schistosomose ou bilharzirose qui cause la mort de 300 000 personnes par an dans le monde (Chitsulo et al., 2000; Crompton, 1999), avec plus de 200 millions de personnes infestées. Le genre *Schistosoma* comprend 21 espèces dont la plus importante, d'un point de vue santé publique, est *Schistosoma mansoni* (Cycle figure 1). La plupart du temps, lorsque nous allons parler de « schistosome », il s'agira de cette espèce, sur laquelle nous détenons le plus d'informations et sur laquelle nous avons mené toute l'approche expérimentale.

L'hôte vertébré (Homme ou Rongeur) **b** contracte la maladie au contact de l'eau qui permet le passage à travers la peau des larves infestantes du parasite (cercaires) **a**. Les vers devenus adultes (après un stade schistosomule) **c** vivent dans les gros vaisseaux veineux et pondent des œufs qui traversent différents organes avant d'être excrétés dans les faeces. Cette migration provoque la plupart des symptômes de la maladie (fièvre, rate et foie énormes, diarrhées...). Les œufs **d** issus des faeces éclosent dans l'eau douce et donnent le miracidium **e**, larve infestante de l'hôte intermédiaire (*Biomphalaria glabrata*) **f**. C'est de ce dernier hôte que sortent les cercaires **a**.

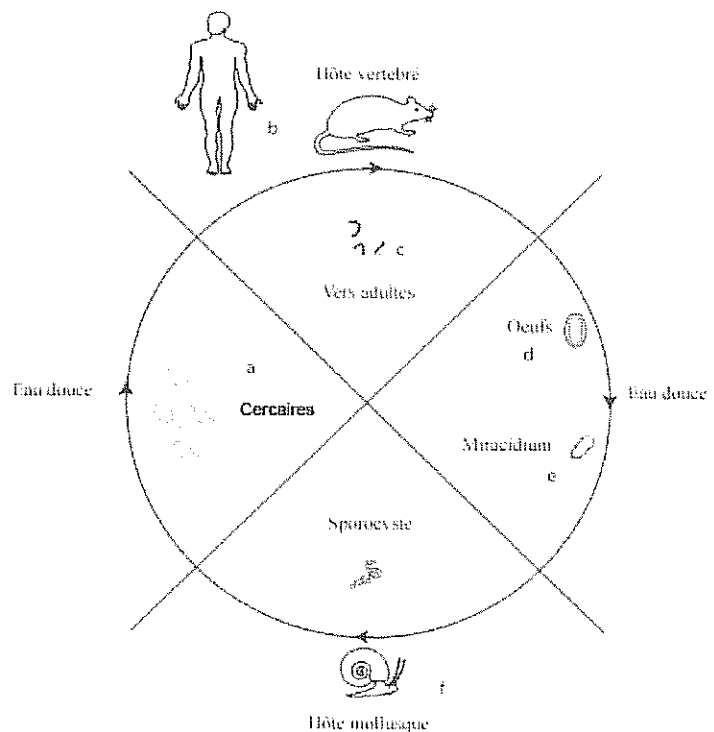


Figure 1: Cycle simplifié de *Schistosoma mansoni*

Le parasite possède deux modalités de reproduction : la multiplication asexuée chez l'hôte intermédiaire mollusque et la reproduction sexuée chez l'hôte définitif vertébré. Dès la formation du zygote pendant la reproduction sexuée, et tout le long du cycle parasitaire, le parasite possède la même information génétique et est sexué, c'est-à-

dire soit mâle, soit femelle. Il présente une hétérogamétie femelle, c'est-à-dire que la femelle est hétérogamétique ZW alors que le mâle est homogamétique ZZ (Short, 1983).

C'est au niveau de l'hôte définitif vertébré, lieu d'accès à la maturité sexuelle, de rencontre du partenaire sexuel, d'accouplement et de reproduction du parasite, que va se focaliser notre étude.

Migration dans l'hôte définitif

Comprendre la migration de ce parasite dans l'hôte vertébré (Armstrong, 1965; Standen, 1953b) est une chose importante pour comprendre le système d'appariement des schistosomes. L'hôte est en effet le milieu de vie, de développement et de reproduction du parasite et nous n'avons malheureusement pas accès en temps réel à ce qui se passe à l'intérieur de cet hôte ; c'est une véritable « boîte noire ».

La migration du parasite commence par la pénétration du tégument de l'hôte définitif par la cercaire. Seul le corps de la cercaire traverse l'épiderme (la queue se détache et reste à l'extérieur) et migre vers le cœur de l'hôte *via* le système sanguin (Standen, 1953a). 24 heures après la pénétration, la cercaire arrive dans le ventricule droit du cœur de l'hôte et se transforme en schistosomule. Elle met entre 5 et 7 jours post-pénétration pour arriver aux poumons et entre 7 et 20 jours post-pénétration pour arriver au foie. A cette étape, la schistosomule a atteint sa maturité sexuelle et est devenue adulte. 25 jours post-pénétration, le dimorphisme sexuel entre mâle et femelle apparaît (Basch, 1990) (figure 2). Jusqu'au foie, la migration du parasite se fait dans le sens de la circulation sanguine. Cependant, la ponte des œufs se réalise dans les veinules du système mésentérique afin que les œufs, après avoir traversé les veinules à l'aide d'un éperon jusqu'aux intestins, puissent être excrétés *via* les faeces de l'hôte. Pour ce faire, les adultes doivent migrer à contre-courant le long de la veine porte hépatique jusqu'au système mésentérique, lieu de ponte. La femelle étant trop fine et ne possédant pas de muscle locomoteur pour passer ce contre-courant, elle aurait besoin du mâle pour aller jusqu'aux sites de ponte. Le foie de l'hôte apparaît donc comme étant le lieu de rendez-vous, de rencontre et d'accouplement entre les individus adultes de sexes différents avant leur

migration vers les sites de ponte (Armstrong, 1965). La figure 2 montre l'accouplement entre un seul mâle et une seule femelle schistosome : la femelle (plus fine) vit dans le canal gynéchophore de son mâle (plus musculeux) en position ventrale. Cette photographie ne semble faire aucun doute : les schistosomes sont socialement monogames.

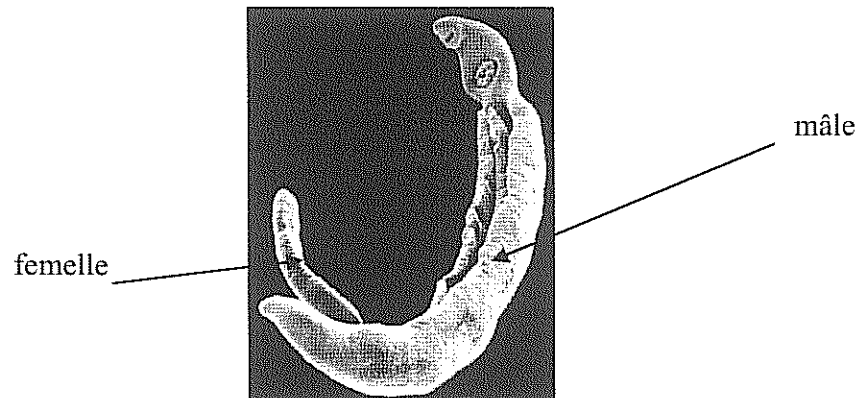


Figure 2: Photographie en microscopie électronique du couple *S. mansoni*. La femelle (plus fine) vit dans le canal gynéchophore de son mâle (plus musculeux) en position ventrale.

Pourquoi les schistosomes sont-ils gonochoriques ?

Le système d'appariement monogame suppose selon notre définition que les sexes soient séparés (espèce dite gonochorique). Le gonochorisme est classique chez les animaux libres mais plutôt rare chez les parasites. En effet, l'acquisition de l'hermaphrodisme fait partie de la panoplie des stratégies adoptées par les parasites pour avoir une longueur d'avance dans la COURSE AUX ARMEMENTS qui les opposent à leurs hôtes. L'hermaphrodisme leur permet à la fois de créer de la diversité génétique quand ils rencontrent un partenaire au sein de leur hôte mais aussi de se reproduire seul lorsqu'ils n'en rencontrent pas. Les schistosomes font donc exception. En effet, parmi les espèces de trématodes décrites, seule la centaine d'espèces de Schistosomatidae est gonochorique. Les « frères phylogénétiques » des Schistosomatidae sont les Spirorchidae (Brooks et al., 1985) ; ils vivent dans l'appareil circulatoire des tortues d'eau douce et sont hermaphrodites. L'acquisition du mode de reproduction à sexes séparés a longtemps fait débat et deux hypothèses non exclusives ont émergées : l'adaptation à l'homéothermie et la séparation des « tâches ménagères » (Combes, 2001; Despres and Maurice, 1995; Loker and Brant, 2006; Platt and Brooks, 1997). La première hypothèse fut proposée sur la base d'une

autre particularité des Schistosomatidae. Ils seraient les seuls trématodes vivant dans le sang des vertébrés homéothermes (oiseaux et mammifères). Les Schistosomatidae auraient acquis les deux sexes au moment de l'apparition de l'homéothermie et de la sophistication du système immunitaire (Basch, 1990). L'acquisition des sexes séparés permet alors une diversité génétique optimale pour s'opposer à l'immunité de l'hôte. Cependant, tout s'effondre lorsque certains auteurs découvrent un Schistosomatidae chez un crocodile POÏKILOTHERME (Platt and Brooks, 1997). Notons que ce parasite (*Griphobilharzia amoena*) peut provenir d'un transfert secondaire d'un hôte oiseau ou mammifère. L'hypothèse de l'apparition du gonochorisme, concomitante à l'apparition de l'homéothermie, est fragile mais toujours envisageable. La seconde hypothèse est basée sur le fait que la séparation des sexes s'accompagne d'un dimorphisme sexuel et d'une séparation des « tâches ménagères » : la femelle vit dans le canal gynécophore du mâle, elle n'a plus les éléments structuraux permettant la locomotion et les muscles pharyngiens, ce qui certes lui permet d'optimiser le succès reproducteur (en investissant plus d'énergie dans la reproduction), mais qui la rend également « dépendante » du mâle, qui en plus de fertiliser les œufs, transporte la femelle et stimule sa croissance (Loker and Brant, 2006; Loverde et al., 2009; LoVerde et al., 2004b). Chaque partenaire optimise ainsi ses fonctions.

Problématiques de la thèse

Schistosoma mansoni est un modèle idéal pour étudier la monogamie et les changements de partenaire. Premièrement, le cycle du parasite, caractérisé par une expansion clonale dans l'hôte intermédiaire mollusque directement suivie de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif vertébré, est contrôlé en laboratoire. Il est ainsi possible d'infester l'hôte vertébré murin avec des populations clonales de larves (cercaires) dont le sexe, le génotype et la densité peuvent être prédéterminés dès ce stade larvaire et ainsi contrôlés pour l'infestation du vertébré. Deuxièmement, les couples se forment dans l'hôte définitif après infestation et lorsqu'ils s'accouplent ou se ré-accouplent après un changement de partenaire, ils restent physiquement « unis » (figure 2). Cette caractéristique permet d'estimer le taux de changements de partenaire. Troisièmement, à notre connaissance, les schistosomes sont les espèces monogames dont le niveau taxonomique est le plus bas, ce qui permet d'éliminer les biais introduits par des interactions sociales complexes (comme l'apprentissage, la hiérarchie, la coopération...) qui peuvent altérer notre compréhension du système monogame. Finalement, le génome du parasite est séquencé ce qui permet ou permettra d'aller plus loin, d'un point de vue mécanistique, dans la compréhension des interactions entre les sexes (LoVerde et al., 2004a).

Ce manuscrit tente de détailler le système d'appariement monogame de *Schistosoma mansoni* en quatre chapitres : (1) chapitre I : Qui est monogame parmi les Schistosomatidae et pourquoi ? ; (2) chapitre II : Monogamie sociale et génétique ? ; (3) chapitre III : Biais de sex ratio en faveur des mâles chez les schistosomes, monogamie et changements de partenaire ; (4) chapitre IV : Changements de partenaire et sélection sexuelle. Chacun de ces chapitres est composé d'un ou plusieurs articles publiés ou soumis. Ces articles sont soit des articles d'opinion, soit des articles expérimentaux. Les articles d'opinion, reflétant certaines réflexions engagées durant cette thèse et nécessitant plus d'explications que les articles expérimentaux, sont davantage détaillés. Ainsi, la lecture de cette thèse peut se faire « indépendamment » des articles.

Problématiques du chapitre I « Qui est monogame parmi les Schistosomatidae et pourquoi ? »

Chez *S. mansoni*, la femelle vit en permanence dans un canal situé en position ventrale du mâle ce qui présage une monogamie sociale. Si l'origine du gonochorisme, exception chez ces parasites classiquement hermaphrodites, a fait l'objet d'un intense débat (Basch, 1990; Combes, 1991; Loker and Brant, 2006; Platt et al., 1991), personne jusqu'à présent ne s'est posé de question sur la monogamie chez les schistosomes.

(1) Qui est monogame au sein des Schistosomatidae et pourquoi ? Quelles sont les pressions évolutives qui ont pu conduire à l'adoption d'un tel système ? Les raisons communément évoquées dans les systèmes monogames des animaux libres peuvent-elles expliquer l'origine et le maintien de la monogamie chez ces parasites ?

Au sein des Schistosomatidae, il existe des espèces qui arborent d'autres systèmes d'appariement que le système monogame. En effet, certaines espèces sont polygynes avec des mâles capables de monopoliser plus d'une femelle (Chu and Cutress, 1954; McKown et al., 1991; Najim, 1956). Chez d'autres espèces, comme *Gigantobilharzia huronensis* et *Dendritobilharzia pulverulenta*, les mâles et les femelles ne sont jamais observés en couple *in vivo* (Najim, 1956; Nollen, 1983). Dans ce cas, ces espèces sont considérées comme polygynandres (ou promiscuitaires), système d'appariement dans lequel les mâles comme les femelles s'accouplent avec plusieurs partenaires.

(2) Au sein des Schistosomatidae, peut-on associer des traits morpho-anatomiques (liés eux même à des traits de vie) à tel ou tel système d'appariement ? Quelle est la part de la phylogénie et de l'adaptation dans l'évolution de ces traits ?

C'est par la réflexion, en se basant sur des aspects et des traits connus de la biologie en général et des schistosomes et notamment de *S. mansoni* en particulier, que nous avons essayé de répondre à ces questions dans la première partie de mon travail de thèse (Chapitre I du manuscrit) (Beltran and Boissier, 2008; Beltran et al., 2009b).

Problématiques du chapitre II « Monogamie sociale et génétique ? »

Chez les schistosomes, deux études révèlent des cas de changements de partenaire, mais présentent toutes les deux des biais importants. Une première étude

concerne une analyse hétérosécifique des changements de partenaire (Tchuem Tchuente et al., 1995). En effet, la notion d'espèce est particulière dans le genre *Schistosoma* puisque des individus décrits comme appartenant à des espèces différentes sont capables d'être interféconds et de donner des hybrides fertiles. Dans un tel contexte, des auteurs ont analysé si des couples hétérosécifiques, *S. mansoni* + *S. intercalatum*, sont capables de changer de partenaire pour former des couples homosécifiques (Tchuem Tchuente et al., 1995). Ces auteurs montrent que des changements de partenaire ont lieu et que les mâles *S. mansoni* sont plus compétitifs pour l'accès aux femelles que les mâles *S. intercalatum* (quelque soit l'espèce de la femelle). La deuxième étude concerne une analyse homosécifique des changements de partenaire chez *S. mansoni* (Pica-Mattocchia et al., 2000). Dans cette étude, les mâles « proposés » aux femelles présentent soit une résistance, soit une sensibilité à une drogue, l'hycanthone. Cette discrimination des mâles présente un biais, retrouvé dans les résultats de l'étude : 88.2% des changements de partenaire sont effectués par les mâles sensibles à la drogue, contre 11.8% effectués par les mâles résistants. Cela pourrait être dû au fait que les mâles qui investissent de l'énergie dans la résistance à la drogue sont moins efficaces dans les changements de partenaire. Cette étude ne donne donc pas un taux réel de changements de partenaire chez *S. mansoni*. De plus, ces auteurs n'ont pas cherché à savoir si des femelles proposées à des mâles pouvaient également induire un changement de partenaire. Nous ne pouvons donc pas déterminer quel est le sexe le plus enclin aux changements.

(1) Peut-on détecter des cas de changements de partenaire chez les schistosomes en utilisant des marqueurs sans biais de valeur sélective (comme les marqueurs microsatellites) ? Si tel est le cas, quel est le taux réel de changements de partenaire et quel est le sexe le plus enclin aux changements ?

Plusieurs études ont été réalisées dans le monde animal pour analyser les facteurs pouvant influencer les changements de partenaire. Par exemple, parmi ces facteurs, nous pouvons distinguer l'**âge du couple** : chez le Tyran tritri *Tyrannus tyrannus*, les couples les plus expérimentés présentent moins de changements de partenaire que les jeunes couples (Woodard and Murphy, 1999), mais aussi la **densité des prétendants** : chez les certains oiseaux, plus il y a de prétendants géographiquement proches du couple et plus il y a de cas d'infidélités (Westneat and

Mays, 2005), ou encore la **diversité génétique des partenaires potentiels** : chez la rousserolle des Seychelles (*Acrocephalus sechellensis*), la femelle choisira comme amant un mâle ayant une plus forte diversité de Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) que son mâle initial (Richardson et al., 2005). La **similarité génétique entre les partenaires de reproduction** peut également être un facteur responsable de changements de partenaire, la femelle préférant un amant génétiquement plus éloigné (Foerster et al., 2003).

(2) Il reste donc à étudier les facteurs pouvant influencer le taux de changements de partenaire chez les schistosomes.

Les changements de partenaire ne donnent pas toujours lieu à une descendance, surtout chez des espèces où les femelles peuvent stocker le sperme. Chez certaines espèces d'oiseaux, la monogamie génétique coïncide avec des changements de partenaire intensifs, par exemple chez le faucon émerillon *Falco columbarius* (Sodhi, 1991; Warkentin et al., 1994), chez le fulmar boréal *Fulmaris glacialis* (Hunter et al., 1992), ou encore chez le manchot de Humboldt *Spheniscus humboldti* (Schwartz et al., 1999). Un *receptaculum seminis* (ou réceptacle séminal), présent chez les femelles schistosomes (Clough, 1981; Erasmus, 1973; Neves et al., 2005), pourrait permettre le stockage de sperme et ainsi le contrôle de la paternité de la descendance par la femelle.

(3) Pour définir si, chez les schistosomes, la monogamie est « sociale et génétique » ou « sociale et non génétique », il est nécessaire d'évaluer la présence ou non d'une descendance issue des changements de partenaire.

Nous avons tenté de répondre à l'ensemble de ces trois problèmes par l'expérimentation dans le chapitre II du manuscrit (Beltran and Boissier, 2009a; Beltran et al., 2008a; Beltran et al., 2008b).

Problématique du chapitre III « Biais de sex ratio en faveur des mâles chez les schistosomes, monogamie et changements de partenaire »

Le genre *Schistosoma* inclue 21 espèces d'endoparasites définies comme socialement monogames (Beltran and Boissier, 2008, 2009a). Les patterns de distribution des vers parasites dans l'hôte et leur accouplement sont d'une grande

importance pour comprendre les dynamiques de transmission du parasite. Dans le genre *Schistosoma*, le sex ratio est connu pour être biaisé en faveur des mâles (plus de mâles que de femelles adultes) dans l'hôte définitif. La majorité des études reportant un biais de sex ratio en faveur des mâles est expérimentale (Boissier and Mone, 2001a). En milieu naturel, il a été montré que ce biais est d'autant plus important que l'intensité parasitaire est faible et que le sex ratio tend à s'équilibrer lorsque l'intensité parasitaire augmente (Morand et al., 1993). Globalement, en milieu naturel, les populations de schistosomes présentent un biais de sex ratio en faveur des mâles. En effet, sur 207 rats infestés capturés, le sex ratio est de 1.45 (3,830 mâles pour 2,638 femelles) (Morand et al., 1993). De plus, ce biais de sex ratio est rencontré quelque soit l'espèce de *Schistosoma* et l'hôte définitif examiné (Mone and Boissier, 2004).

Ce biais de sex ratio en faveur des mâles intrigue les scientifiques depuis plusieurs années. Un grand nombre d'études expérimentales (Boissier and Mone, 2000; Evans and Stirewalt, 1951; Liberatos, 1987; Mitchell et al., 1990; Rowntree and James, 1977; Stirewalt and Fregeau, 1968) et d'analyses (Boissier et al., 2004; Boissier and Mone, 2001b; Boissier et al., 1999; Dietz, 1975; May, 1977; Morand et al., 1993) ont été réalisées pour expliquer (i.e facteurs proximaux) ce biais, mais les conséquences (i.e. facteurs ultimes) de ce biais de sex ratio en faveur des mâles ont rarement été explorées.

Pourquoi un biais de sex ratio en faveur des mâles chez les schistosomes et quelles conséquences évolutives, notamment en terme de changement de partenaire ?

C'est par la réflexion, en se basant à nouveau sur des aspects connus de la biologie en général et celle des schistosomes (principalement *Schistosoma mansoni*, l'espèce la plus connue au sein des schistosomes) en particulier, et par une approche expérimentale que nous avons tenté de répondre à ces questions dans deux publications de ce manuscrit (Beltran and Boissier, 2009b; Beltran et al., 2009a). Le chapitre III du manuscrit détaille cette partie.

Problématique du chapitre IV « Changements de partenaire et sélection sexuelle »

Charles Darwin révolutionne la théorie de l'évolution dans son ouvrage *L'Origine des espèces* (1859) en proposant le mécanisme de sélection naturelle basé sur la reproduction différentielle des individus en fonction de leur capacité à survivre (cf. Prélude). Mais Darwin découvre que la sélection naturelle n'explique pas tout : à côté de la lutte pour la survie, les espèces déploient des caractères secondaires dans la compétition pour la reproduction. Dans son ouvrage *La filiation de l'homme et la sélection liée au sexe* (*The descent of man and selection in relation to sex*) (1871), il ajoute donc un autre versant à sa théorie de l'évolution, la **sélection sexuelle** qui a l'avantage d'expliquer certains traits ou comportements représentant des handicaps au regard de la survie. Débat très anthropomorphique dès le début, le « caprice féminin » permet de comprendre et d'expliquer pourquoi les mâles de nombreuses espèces présentent des caractères qui réduisent potentiellement leur survie, l'exemple le plus connu, cité par Darwin, étant celui de la queue du paon. La sélection sexuelle semble être la clef du problème, les mâles entrant en compétition pour être choisis par les femelles. Mais Darwin a beaucoup de difficultés à défendre cet aspect de sa théorie contre ses contemporains, refusant l'idée que le choix des femelles puisse exercer une quelconque pression évolutive. Ce n'est qu'au cours du XX^e siècle, notamment grâce aux travaux de Ronald Fisher dans les années 1930 mais surtout à partir des années 1970, avec les travaux de Robert Trivers ou Robert Williams que cet aspect de la théorie darwinienne sera pleinement accepté comme un mécanisme à part entière.

Le changement de partenaire peut être considéré comme issu d'un deuxième choix (Choudhury, 1995). Pour mieux en comprendre l'origine, il est donc important de s'intéresser à la sélection sexuelle et à ses composantes. La sélection sexuelle est particulièrement importante parmi de nombreux groupes chez qui la production de gamètes par la femelle est relativement coûteuse (cf. Prélude). L'accès au partenaire sexuel est dans ce cas un facteur important de la différence de fécondité entre les individus. Pour bien comprendre la sélection sexuelle, il est important de comprendre les deux composantes non exclusives dont elle est constituée. La première composante est la **sélection intrasexuelle** qui implique une compétition entre individus du même sexe pour l'accès aux partenaires sexuels. La rivalité des mâles, subtile (ainsi certains insectes mâles vident-ils, au cours de la copulation, la femelle de tout le sperme qu'elle pouvait contenir avant le coït) ou en combat

ritualisé, peut s'opérer par le développement d'armes contre les autres mâles (bois des cerfs, cornes, griffes, etc.) et/ou une différence de force et d'agressivité. La deuxième composante est la **sélection intersexuelle** qui implique une compétition en vue d'être le plus attirant pour les membres du sexe opposé et qui est façonnée par le choix des femelles pour des " ornements ", indices de qualité et de vigueur pour la reproduction. La queue du Paon est un ornement, c'est-à-dire d'un facteur de la sélection intersexuelle. D'autres caractères comme l'hétérozygotie peuvent être considérés comme des indices de qualité et ainsi faire l'objet du choix des femelles. Selon cette composante, plus de différences sur des caractères potentiellement « attractifs » devraient être observées au sein des mâles qu'au sein des femelles.

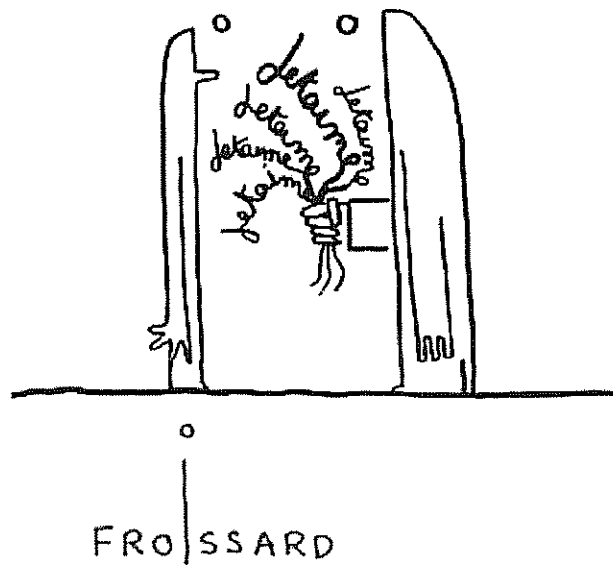
Chez les schistosomes, la compétition entre les mâles et le choix des femelles sont deux composantes de la sélection sexuelle qui pourraient être impliquées dans les changements de partenaire. La compétition entre mâles a été proposée à un niveau interspécifique (Tchuem Tchuente et al., 1995). Concernant le choix des femelles, quelques éléments le favoriseraient. L'observation en milieu naturel d'une plus forte diversité génétique entre les mâles qu'entre les femelles dans l'hôte vertébré (Prugnolle et al., 2002) suggère que les mâles adultes schistosomes varient plus que les femelles. Le rôle crucial des mâles dans le transport (Basch, 1990), l'accès à la maturité des femelles, la nutrition de celles-ci (Atkinson and Atkinson, 1980; Cornford and Huot, 1981; Gupta and Basch, 1987; Haseeb et al., 1989; Haseeb et al., 1985) favorise l'hypothèse selon laquelle la femelle gagnerait à être le sexe qui choisit.

A quels niveaux (de l'ADN au phénotype) les mâles schistosomes diffèrent-ils entre eux ?
--

Nous nous sommes intéressés à plusieurs niveaux de polymorphisme permettant de discriminer les mâles adultes entre eux, des zones neutres de l'ADN au phénotype d'immunisation en passant par les protéines synthétisées, et nous avons utilisé une approche alliant diversité neutre (à l'aide de marqueurs microsatellites), diversité fonctionnelle (étude du protéome) et diversité phénotypique (efficacité d'immunisation) pour tenter de répondre à cette question (chapitre IV du manuscrit) (Beltran et al., 2009c).

Chapitre I

Qui est monogame parmi les Schistosomatidae et pourquoi ?



Chapitre I. Qui est monogame parmi les Schistosomatidae et pourquoi ?

A la simple observation du couple de schistosomes (figure 3), la femelle vivant enchassée dans le canal gynéchophore de son mâle, nous pouvons dire que ce couple est socialement monogame. Comme énoncé précédemment, si l'origine du gonochorisme, exception chez ces parasites classiquement hermaphrodites, a fait l'objet d'un intense débat (Basch, 1990; Combes, 1991; Platt et al., 1991), personne jusqu'à présent ne s'est posé de question sur la monogamie de ce parasite.

La première publication de ce manuscrit (Beltran and Boissier, 2008) tente, en premier lieu, de poser la problématique de cette thèse en s'intéressant aux espèces monogames au sein des Schistosomatidae. Elle brosse ensuite un état des lieux sur les changements de partenaire à partir de ce qui a été testé expérimentalement avant ce travail de thèse, notamment chez *Schistosoma mansoni*, et propose plusieurs expériences, réalisées en grande partie depuis et qui seront développées dans les prochains chapitres. Enfin, dans cet article, les hypothèses communément évoquées pour expliquer la monogamie chez les animaux libres (dispersion des femelles, soin paternel, absence de variabilité dans la qualité du mâle et /ou de son territoire, agressivité et séquestration), sont testées sur le modèle schistosome par la réflexion et en se basant sur des aspects connus de la biologie des schistosomes.

Ce chapitre I comporte deux parties. La première est un « résumé » de la publication auquel sont ajoutés de nouvelles idées apparues depuis et dans lequel l'état des lieux sur les changements de partenaire n'est pas détaillé, afin d'être particulièrement développé dans le chapitre II du manuscrit. La deuxième partie est constituée d'un travail de synthèse sur des traits morpho-anatomiques des espèces de Schistosomatidae connues (Beltran et al., 2009b). La manipulation expérimentale du système d'appariement dans ce groupe de parasite étant impossible, ce travail permet de réaliser une approche comparative au sein des Schistosomatidae, de mettre en évidence des traits associés aux différents systèmes d'appariement observables dans ce groupe (principalement monogamie et polygynandrie) et de tester certaines hypothèses sur l'évolution de la monogamie chez les Schistosomatidae.

I.1. Publication: « Schistosome monogamy : who, how and why? » Trends in Parasitology, 24, 386-391 (2008) et nouveautés.

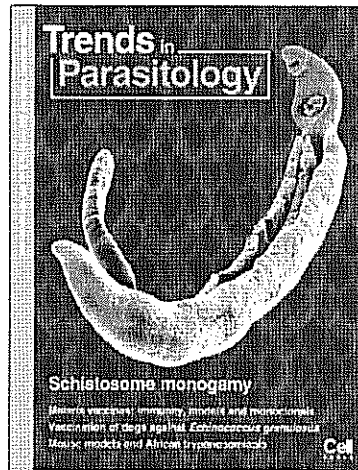


Figure 3: Couverture de Trends in Parasitology 24 (2008) lors de la publication de cet article.

I.1.1. Monogamie au sein des schistosomatidae ?

Il est communément admis que les schistosomes forment des couples, la femelle vivant dans le canal gynéchophore de son mâle (figure 3). En effet, lorsque ce type de couples de vers adultes est observé directement *in vivo* ou après récupération expérimentale (par perfusion hépato-biliaire), l'espèce de schistosome analysée est considérée comme socialement monogame. C'est le cas des genres *Griffithsbilharzia*, *Ornithobilharzia*, *Austrobilharzia*, *Orientobilharzia*, *Schistosoma* et *Bivitellobilharzia*. Cependant, il existe des espèces qui arborent d'autres systèmes d'appariement au sein des schistosomatidae (Figure 1 dans la Box 3 de cet article). Certaines espèces sont polygynes avec des mâles capables de monopoliser plus d'une femelle, c'est le cas d'*Austrobilharzia variglandis* chez qui il a été observé plusieurs mâles dont le canal gynéchophore contenait entre 3 et 8 femelles (Chu and Cutress, 1954), *Heterobilharzia americana* (McKown et al., 1991) et *Macrobilharzia macrobilharzia* (Najim, 1956). Chez d'autres espèces, comme *Gigantobilharzia huronensis* et *Dendrobilharzia pulverulenta*, les mâles et les femelles ne sont jamais observés en couple *in vivo* (Najim, 1956; Nollen, 1983). Dans ce cas, ces espèces sont considérées comme polygynandres (ou promiscuitaires), système d'appariement dans lequel les mâles comme les femelles s'accouplent avec plusieurs partenaires.

D'après la figure 1 de la Box 3 de l'article, phylogénie des Schistosomatidae sur laquelle le système d'appariement des différents genres apparaît, il n'y a aucun lien entre le type d'hôte définitif (reptile, mammifère ou oiseau) et le système d'appariement. Ce qui apparaît par contre, c'est l'origine ancestrale de la monogamie. Le système monogame semble être un état intermédiaire entre l'hermaphroditisme ancestral et la polygamie (plus précisément polygynie) ou la polygynandrie. Cette origine ancestrale de la monogamie va dans le sens de l'hypothèse d'apparition du gonochorisme. Le gonochorisme serait apparu avec la nécessité d'exploiter un habitat particulier, le système porte hépatique (Loker and Brant, 2006). La nécessité de résister au flux sanguin du milieu tout en étant capable de s'insinuer au travers de fines veinules afin d'optimiser le passage des œufs vers l'intestin conduit à la séparation des sexes et des « tâches ménagères » (Loker and Brant, 2006). Le mâle devient musculeux pour transporter et nourrir sa femelle qui devient très fine pour s'insinuer dans les veinules, perdant ainsi des éléments structuraux indispensables à la locomotion et à la nutrition au profit de la reproduction. Ainsi, la séparation des sexes induit obligatoirement une interdépendance entre mâle et femelle et la monogamie serait le seul système d'appariement possible, à ce stade de l'évolution, pour compenser cette interdépendance fonctionnelle coûteuse (cf. 1.2).

1.1.2. Pourquoi l'installation et le maintien de la monogamie chez les schistosomes ?

L'application au modèle schistosome des hypothèses communément proposées pour expliquer la monogamie chez les animaux libres n'est pas forcément aisée, d'autant que dans ce modèle parasite, il est impossible de manipuler le système d'appariement, contrairement aux modèles biologiques libres comme les oiseaux, chez qui la manipulation du système d'appariement est réalisable (Pribil and Searcy, 2001). L'approche comparative est alors souvent la seule solution pour tester ces hypothèses (cf. 1.2). Ce point de départ apporte toutefois une certaine lumière sur l'énigmatique système d'appariement monogame des schistosomes.

La dispersion des femelles

Les femelles schistosomes sont-elles trop dispersées dans l'hôte pour qu'un mâle ne puisse se reproduire avec plusieurs femelles et ainsi expliquer leur système d'appariement monogame ? Chez les schistosomes, la migration, au sein de l'hôte vertébré, du foie aux veines mésentériques représente une phase clé. Parmi les Schistosomatidae, cette migration n'est connue que chez trois espèces : *Heterobilharzia americana*, *Schistosoma mansoni* et *Schistosomatium douthitti* et il existe une différence dans les moyens de la réaliser (Armstrong, 1965). De ce fait, le lien entre dispersion des femelles et monogamie est difficile à tisser, une espèce permettant de confirmer cette hypothèse (*H. americana*), les deux autres allant à son encontre (*S. mansoni* et *S. douthitti*).

Chez *H. americana*, les femelles ne sont pas capables de disperser seules (Armstrong, 1965) ce qui permettrait au mâle, selon l'hypothèse de dispersion des femelles, de monopoliser plusieurs femelles, favorisant ainsi un système polygyne. C'est le cas, cette espèce présente un système polygyne. Chez *S. mansoni*, l'accouplement est également un pré-requis pour la migration vers les veines mésentériques, lieu de ponte. Les femelles *S. mansoni* ne dispersent pas, au contraire, le foie est un véritable lieu de « rendez-vous » dans l'hôte (cf. introduction) (Armstrong, 1965). Chez cette espèce, les mâles pourraient donc monopoliser plus d'une femelle, pourtant, en désaccord avec cette hypothèse, l'espèce est monogame. Enfin chez *S. douthitti*, les femelles dispersent seules ce qui, selon la théorie, impliquerait l'installation d'un système monogame. Là encore, l'hypothèse ne fonctionne pas car cette espèce n'est pas monogame mais polygynandre.

Ces trois observations empêchent une généralisation de l'hypothèse selon laquelle la dispersion des femelles serait un facteur de détermination du système d'appariement au sein des Schistosomatidae. Une analyse de la dispersion des femelles dans d'autres espèces de Schistosomatidae serait nécessaire pour tester plus rigoureusement cette hypothèse.

Le soin paternel

Peut-on identifier chez les schistosomes monogames un soin paternel qui pourrait expliquer leur système d'appariement ? Chez ces parasites, tout soin parental ne

peut être que pré-zygotique. En effet, après la ponte, les œufs traversent la paroi du capillaire sanguin puis celle du tube digestif avant d'être excrétés avec les faeces de l'hôte dans l'environnement. Ils éclosent ensuite dans l'eau douce en larve miracidium, descendance du couple. Il n'y a donc aucun soin parental post-zygotique chez les schistosomes, et les seuls soins parentaux que nous pourrions considérer précèdent la ponte des oeufs. Ces soins pré-zygotiques semblent pour beaucoup être apportés par le mâle. En effet, en plus d'apporter les spermatozoïdes et donc de fertiliser les œufs, le mâle (i) transporte, (ii) conditionne la croissance et la maturité de la femelle et (iii) protégerait sa femelle.

(i) Concernant le transport, le mâle est le seul acteur dans la migration du couple car la femelle n'a plus les éléments structuraux permettant sa locomotion (Basch, 1990). Ainsi, après la formation du couple dans le système porte hépatique, le mâle transporte la femelle vers les veines mésentériques, lieu de ponte. Après avoir été pondus, l'œuf doit traverser la paroi des capillaires mésentériques ainsi que la paroi du tube digestif, à l'aide d'un éperon. Si l'œuf échoue dans sa traversée, il sera piégé par le système immunitaire de l'hôte qui l'enkystera pour isoler cet élément étranger, formant ce que l'on appelle un granulome. Cette structure kystique empêchera tout nouvel œuf de traverser à cet endroit. Le couple doit alors se déplacer pour trouver un nouveau site de ponte. C'est pourquoi, dans les veines mésentériques, le couple est en constant déplacement à la recherche de nouveaux sites de ponte (Pellegrino and Coelho, 1978) et le mâle est le seul acteur de ce déplacement.

(ii) Concernant sa croissance, la femelle est dépendante du mâle pour acquérir sa maturité sexuelle. En effet, une femelle non accouplée est dite immature (plus petite); elle ne deviendra mature et apte à pondre qu'après son accouplement (LoVerde et al., 2004b; Mone and Boissier, 2004). De plus, une femelle désaccouplée redevient immature et est incapable de continuer la ponte malgré la présence d'un réceptacle séminal dans lequel elle pourrait stocker des spermatozoïdes (Clough, 1981). D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que lorsqu'ils sont accouplés, le mâle apporte à sa femelle de nombreux nutriments par voie transtégumentaire: des protéines (Atkinson and Atkinson, 1980), des glycoprotéines (Basch and Nicolas, 1989; Gupta and Basch, 1987), du glucose (Cornford and Fitzpatrick, 1985; Cornford and Huot, 1981) et du cholestérol (Hasseb et al., 1985; Popiel and Basch, 1986; Silveira et al., 1986). Sans mâle, une femelle ne peut donc pas se reproduire, et au-

delà de l'apport des spermatozoïdes, le soin nutritif apporté par le mâle est indispensable à la descendance.

(iii) Le dernier soin apporté par le mâle serait un soin protecteur. En effet, il a été montré que la survie de la femelle augmente en présence du mâle (Boissier and Mone, 2000). Cette augmentation de survie peut être la résultante d'une action mécanique et/ou biochimique. D'un point de vue mécanique, la femelle ne possède pas des structures d'adhésion aussi développées que le mâle (ventouses) (cf. 1.2), mais elle est logée à l'intérieur du canal gynécophore de celui-ci. Ceci pourrait lui éviter d'être emportée par le flux sanguin. D'un point de vue biochimique, le canal gynécophore serait peut-être une structure qui permettrait d'isoler la femelle du système immunitaire de l'hôte. Le fait que les mâles soient plus immunogènes que les femelles (le système immunitaire de l'hôte reconnaît plus les mâles que les femelles) semble étayer cette hypothèse (Boissier et al., 2003).

Chez les schistosomes, il semblerait que le « père » investisse beaucoup de soins dans sa progéniture. Ces soins ne sont pas des soins directs mais plutôt des soins indirects *via* la femelle. C'est donc en apportant des soins à la femelle (transport, nutrition et protection) que le mâle, au-delà de son apport de gamètes, devient un acteur essentiel dans la survie de sa descendance. Cependant, un soin paternel n'est pas nécessairement indicateur de monogamie (Smith et al., 1995) et pourrait, dans le cas des schistosomes, n'être qu'une conséquence de l'apparition du gonochorisme, rendant interdépendants le mâle et la femelle.

Hypothèse inverse du seuil de polygynie en absence de variabilité dans la qualité des mâles et /ou de leur territoire

Peut-on imaginer qu'une absence de variation dans la qualité des mâles et/ou de leur territoire permette le maintien de la monogamie chez les schistosomes ? Autrement dit, le système monogame des schistosomes serait-il le seul système d'appariement possible, tout autre système étant trop coûteux ?

Concernant la variation de qualité intrinsèque entre mâles schistosomes, quelques études supportent l'idée de variations entre mâles (Al-Adhami et al., 2001; Jones and Kusel, 1989). Jusqu'à récemment, aucune étude ne s'intéressait à des variations entre mâles en terme de caractéristiques liées à la reproduction (différence dans le

succès d'accouplement ou de production de descendance), mais en 2009, une étude sur *S. mansoni* a révélé des variations de taille de corps entre mâles, variations liées à leur succès reproducteur, les « grands mâles » engendrant plus de descendants (Steinauer, 2009). De plus, une étude récente, réalisée au laboratoire, a révélé l'existence d'un polymorphisme génétique neutre, protéique et phénotypique entre mâles de *S. mansoni* à l'échelle des génotypes (cf. Chap IV). Concernant le milieu, il n'y a pas de preuve d'existence de territorialité à l'intérieur de l'hôte et *a priori*, ces parasites hématophages ne sont pas limités par la qualité ou la quantité de ressources nutritives (ces ressources sont considérées comme uniformément réparties). Cependant, au moins chez les *Schistosoma* où plus d'informations sont disponibles, les sites de ponte (fines veinules), pouvant être aussi considérés comme une ressource uniformément réparties, pourraient être un facteur limitant. En effet, obtenir un bon site de ponte peut s'avérer difficile en « condition polygyne ». Une femelle de *S. mansoni* pond autour de 300 œufs par jour (Mone and Boissier, 2004; Moore and Sandground, 1956). Si plusieurs femelles pondaient ensemble dans la même veinule, les sites de ponte se verraient plus rapidement « bouchés » par la formation de granulomes autour des œufs agrégés et reconnus par le système immunitaire.

Ainsi, concernant les Schistosomatidae monogames, à cause de ces sites de ponte limitants et selon cette théorie du seuil inverse de polygynie, le système polygyne serait trop coûteux à la fois pour les femelles qui devraient partager cette ressource et pour le mâle qui devrait les transporter plus souvent. Cette hypothèse pourrait donc expliquer le système monogame au sein des Schistosomatidae.

L'agressivité

Cette hypothèse d'agressions intra-sexe pourrait-elle maintenir la monogamie chez les schistosomes ? L'agression intra-sexe pourrait concerner les mâles et/ou les femelles. En effet, les mâles rentreraient en compétition pour l'accès à la femelle et les femelles rentreraient en compétition pour l'espace de ponte : s'il y a moins de femelles, les sites de ponte sont plus nombreux ce qui maximise les chances de passage des œufs. D'un point de vue fonctionnel, l'agression chez les schistosomes est susceptible de prendre deux formes : directe et/ou indirecte. Une agression directe consisterait à une action physique ou chimique dirigée contre les individus du

même sexe et une agression indirecte consisterait à une action médiée par le système immunitaire de l'hôte.

Concernant une éventuelle agression directe, la compétition inter- ou intraspécifique chez les parasites est un phénomène clairement établi (Gower and Webster, 2005; Poulin, 2005). Chez les schistosomes, une étude intraspécifique a cherché à voir si des couples hétérospécifiques, *S. mansoni* + *S. intercalatum*, sont capables de changer de partenaire pour former des couples homospécifiques (Tchuem Tchuente et al., 1995). Ces auteurs montrent que des changements de partenaire ont lieu et que les mâles *S. mansoni* sont plus compétitifs pour l'accès aux femelles que les mâles *S. intercalatum* (quelque soit l'espèce de la femelle). En parallèle, des études *in vitro* portant sur l'attraction inter- ou intra-sexe ont permis de mettre en évidence qu'il y a plus d'attractions hétérosexuelles qu'homosexuelles (Eveland et al., 1982; Imperia et al., 1980), mais aussi que les individus mâles ou femelles sont plus attirés par un individu unique que par deux ou trois individus du sexe opposé (Eveland et al., 1983; Imperia et al., 1980). Ceci semble laisser présager qu'il existe des phénomènes chimio-attractants entre mâles et femelles avec un seuil au-delà duquel, il n'y a plus d'attraction. Ce phénomène pourrait être un facteur maintenant la monogamie. Cependant, cela ne signifie pas pour autant qu'il y ait de l'agressivité directe entre individus du même sexe. Cette hypothèse devrait être testée. Finalement, le fait que les schistosomes présentent un biais de sex ratio en faveur des mâles pourrait favoriser la compétition entre mâles (cf. Chap. III du manuscrit).

Pour ce qui est de l'agressivité indirecte, les individus adultes installés lutteraient contre les nouveaux arrivants (dès le stade schistosomule) pour éviter une future compétition intraspécifique au stade adulte (Brown and Grenfell, 2001). Ce type d'agressivité serait réalisé par l'intermédiaire du système immunitaire de l'hôte. Les adultes installés utiliseraient des antigènes du stade schistosomule pour activer le système immunitaire contre ce stade et empêcheraient ainsi le développement de ces individus en adultes sans en subir les conséquences directes (Smithers and Terry, 1969). C'est ce que l'on appelle l'immunité concomitante, qui représenterait une forme de compétition entre les individus *via* le système immunitaire de l'hôte. Une étude a montré que seulement les mâles déclenchaient cette immunité et que c'est l'ordre d'entrée des différents mâles utilisés dans des infestations successives

qui détermine l'infécondité des différents génotypes, le premier entrant étant plus infécond que le suivant, etc. (Dumont et al., 2007).

Si nous revenons à l'hypothèse de l'agressivité comme facteur de maintien du système monogame chez les schistosomes, à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas réfuter cette hypothèse, même si aucune affirmation n'est possible. L'agressivité directe entre individus reste à tester (1) par la réalisation et l'analyse de vidéos sur des tests *in vitro* et/ou (2) *in vivo*, en faisant varier les densités de prétendants mâles ou femelles et voir s'il y a ou non compétition pour le partenaire sexuel (cf. Chap. III du manuscrit). L'agressivité indirecte *via* le système immunitaire de l'hôte est encore à étayer notamment en contrôlant les génotypes introduits (cf. Chap. IV de ce manuscrit).

La séquestration

Chez les schistosomes, la seule position de la femelle, logée dans le canal gynéchochore du mâle, semble refléter une certaine séquestration (cf. figure 1 de la publication). *A priori*, à la vue du dimorphisme sexuel observable chez cette espèce (le mâle est bien plus gros que la femelle qu'il loge), le mâle pourrait « emprisonner » sa femelle. Vu les soins apportés par le mâle à la femelle en terme de transport et de nutrition, le mâle pourrait séquestrer sa femelle pour « protéger » cet investissement et assurer sa descendance. Le lien entre la taille du canal gynéchochore du mâle et la séquestration semble très probable. Une approche comparative pourrait permettre de tester le lien entre cette taille du canal gynéchochore, associé à de la séquestration, et le système d'appariement (cf. I.2).

Schistosome monogamy: who, how, and why?

S. Beltran and J. Boissier

UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, 52 Avenue Paul Alduy, 66 860 Perpignan, France

Schistosomes represent a unique animal model for comparative analyses of monogamy. Indeed, schistosomes are classified at the lowest taxonomical level of monogamous species and lack complex social interactions, which could alter our understanding of their unusual mating system. Elements discussed here include the fact that monogamy in schistosomes could be an ancestral state between hermaphroditism and polygyny or polygynandry and the occurrence of mate changes. In addition, hypotheses are proposed to explain monogamy in schistosomes (e.g. female dispersion, the need for paternal care, oviposition site limitation or aggressiveness, and mate guarding). We also propose future experimental and analytical approaches to improve our understanding of the schistosomes' mating system.

Schistosome monogamy

Monogamy (see Glossary) is a mating system in which each gender has only a single sexual partner during a particular period of time. The incidence of monogamy seems low in the animal kingdom [1]. Indeed, although >90% of birds are monogamous, only 3% of mammals and very few species of invertebrates present such a mating system. Schistosomes (Trematoda: Schistosomatidae) are certainly among the lowest taxonomical level of species that are monogamous (Box 1). Schistosome monogamy has been partially explored by both experimental [2,3] and theoretical [4–8] approaches. However, confusion between gonochorism, monogamy and mate change makes understanding the schistosomes' mating system difficult. This article aims to improve our understanding of the schistosomes' mating system in the light of recent results and general theories that are commonly proposed to explain the evolution and maintenance of monogamy in free-living animals and to suggest possible future experimental approaches.

Are all schistosomes monogamous?

It is widely accepted that the simple view of a worm pair, with the female living inside the gynaecophoric canal of the male, makes the schistosome monogamous (Figure 1). When worm pairs are observed directly *in vivo* or after experimental recovery, the schistosome species can be defined as a socially monogamous species. This is the case for the majority of the species from the *Griphobilharzia*, *Ornithobilharzia*, *Austrotilharzia*, *Orientobilharzia*,

Schistosoma and *Bivitellobilharzia* genera. However, the occurrence of polygyny, in which some males monopolize more than one female and leave other males without access to any, has been observed in some species such as *Austrotilharzia variglandis* [9], *Heterobilharzia americana* [10] and *Macrobilharzia macrobilharzia* [11]. For instance, it has been reported that in *Austrotilharzia variglandis*, 3–8 females occupy the gynaecophoric canal of most males [9]. In some other species, such as *Gigantobilharzia huronensis* and *Dendrotilharzia pulverulenta*, males and females were never seen in copula *in vivo* [12,13]. This indicates polygynandry (or promiscuity), a mating system whereby both males and females mate with several partners of the opposite sex during a period of time. Finally, some intermediate forms can be found: *Schistosomatium douthitti* worms can be seen in pairs; however, females are able to migrate and lay eggs without the presence of a male [14,15]. If the origin of gonochorism in schistosomes seems to be elucidated today (Box 2), the origin of monogamy needs further consideration. In Box 3, we propose the first

Glossary

Fitness: the relative reproductive success of a genotype as measured by survival, fecundity or other life-history parameters.

Genetic monogamy: the fact that two partners only have offspring with one another. In this case, there is no mate change. The individuals of the pair are recognized as being faithful.

Gonochorism: a reproductive strategy that describes a sexually reproducing species in which there are two distinct sexes. By contrast, hermaphroditism describes a form of sexual reproduction in which the two sexes are not separated into distinct male and female types of individual.

Mating system: the ways in which animal societies are structured in relation to sexual behavior. The mating systems generally recognized in animals are monogamy, polygamy and promiscuity (or polygynandry).

Monogamy: a mating system in which each male has a mating relationship with only one female. Monogamy can be considered at different levels (i.e. lifetime vs sequential, or serial, monogamy) and, independently, can refer or not refer to mate change (i.e. social vs genetic monogamy).

Lifetime monogamy: a pair is formed and individuals in the pair remain together throughout their life.

Sequential or serial monogamy: one individual has no more than one sexual partner at a time but can have multiple partners in a lifetime.

Polygamy: a mating system in which one male has a mating relationship with two or more females (i.e. polygyny) or in which one female has a mating relationship with two or more males (i.e. polyandry).

Polygynandry (or promiscuity): mating system in which any male mates with any female.

Social monogamous: individuals or species in which we can observe pairs formed by only one male and only one female. That does not exclude the potential occurrence of mate changes.

Social monogamy: the observation of a pair formed of only one male and only one female, but cases of mate changes (or divorces) can be observed.

Threshold of polygyny: this is reached when females' reproductive success is greater by mating with an already mated male than with an unmated one.

Corresponding author: Boissier, J. (boissier@univ-perp.fr)

Box 1. Systematics of monogamy: from birds to schistosomes

Among deuterostomes, birds are typically monogamous animals with ~90% being socially monogamous species [1]. In other vertebrates, social monogamy has been reported in mammals [1], fish [36], reptiles [37] and amphibians [38,39]. Among protostomes, fewer cases of monogamy are known. Among Ecdysozoans, however, crustaceans, such as *Alpheus* [40,41]; insects, such as *Nicrophorus* [42]; and nematodes, such as Syngamidae [43,44], are known to be monogamous. Among the crustacean parasites, some cases of cryptogonochorism (seen in the *Sacculina*, *Aphanodorus* and *Gonophysema* genera), in which the two genders are joined or associated to form the appearance of hermaphroditism, could be considered monogamous systems. The Syngamidae presents two monogamous species: *Syngamus trachea* and *Mammomonogamus laryngeus*, which are parasites of the upper respiratory tract of non-aquatic birds and domestic mammals, respectively. In these species, the male is smaller and attached to the copulatory bursa of the female body, giving a characteristic Y-shaped appearance ('forked worm'). Finally, if we consider gonochorism as a prerequisite for monogamy – which excludes the lifetime hermaphroditic pairs, such as the family of Diplozoidae and some Didymozoidae – among the Lophotrochozoan group, two families of Platyhelminths present cases of monogamy: the Didymozoidae and the Schistosomatidae. Some members of Didymozoidae family (Trematoda, Digenea) are gonochoric parasites of marine fishes and freshwater fishes. These parasites are usually encysted in pairs in various tissues or organs, and sexual dimorphism is marked with the male lodged in a hollow of the female. Schistosomatidae (Trematoda, Digenea) are parasites of birds and mammals and include a hundred gonochoric species. In schistosomes, sexual dimorphism varies according to the genera [5].

evolutionary scenario on the origin of monogamy in schistosomes.

Are schistosomes socially and genetically monogamous?

Monogamy can be observed on different levels: social and genetic [1]. Social monogamy reflects the observation of a pair bond with one male and one female without implying sexual exclusivity between the two partners. Therefore, social monogamy does not always correspond to genetic monogamy, which is considered today as exceptionally rare [16]. In the case of genetic monogamy, offspring are the exclusive result of mating between the two partners [16,17]. The classical view of a worm couple (Figure 1) indicates that schistosomes are socially monogamous. The occurrence of mate changes has been demonstrated in *Schistosoma mansoni* [3]; pairs were formed between worms belonging to the same strain, either resistant or sensitive to a drug, then new males from the opposite strain were introduced. Mate changes occurred at 28% and 8%, when the established worm pairs were resistant and sensitive, respectively. However, as the authors pointed out, the use of pharmacological markers induces a bias in the rate of mate change measured. The use of neutral genetic markers such as microsatellites would, then, provide rates of mate change without any bias. Mate change in schistosomes clearly deserves further consideration. First, the way that the two genders promote mate change needs to be elucidated. In birds, the female is the predominant sex initiating or preventing mate change [18]. This is congruent with classical sexual-selection theory, which states that females are the choosy gender [19]. In

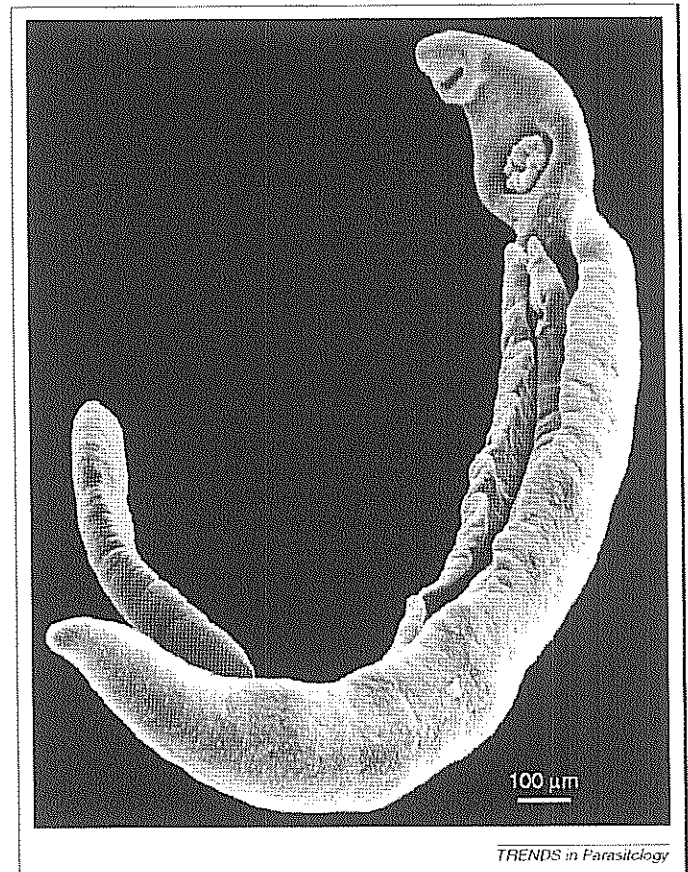


Figure 1. Photograph of a monogamous *Schistosoma mansoni* pair: the muscular male guards its thin female in a groove on its ventral side. Photograph taken by Daniele Estabiet. Scale bar = 100 μ m.

Box 2. Why do schistosomes have separated genders?

The evolutionary causes of gonochorism have been elucidated [5]; the colonization of warm-blooded species by schistosomes would be the origin of the separation of the genders [8]. In a more recent study concerning the origin of schistosome gonochorism [5], the following scenario was proposed: first, schistosomes were derived from hermaphroditic ancestors; second, the potential for gonochorism appeared in the spirorchiids, most notably with *Griphobilharzia*; and third, 'true gonochorism' appeared when schistosomes invaded their endothermic hosts (birds and mammals). The evolution of separate genders was supposedly beneficial in providing optimal genetic diversity against the sophisticated immune system of warm-blooded vertebrate hosts. Another non-exclusive hypothesis is related to the habitat of schistosomes living in the blood flow of their hosts [5]. It considers that the separation of the two genders was driven by the specialization of each gender for a limited set of 'domestic tasks'. Thus, females would benefit from a filiform body form and losing their muscles when laying eggs in the mesenteric veins of their hosts, whereas males would need a muscular body form to enable them to move against the portal vein to reach oviposition sites [5]. This hypothesis of the specialization of each gender in 'domestic tasks' is supported by the interpretation of recent functional analyses comparing male and female transcriptomes [45]. It was concluded that males invest particularly in transport and other 'domestic tasks' compared with females, which concentrate principally on eggs production. This type of functional approach could, as a mechanistic point of view, lead to a description of the specialization of each gender for distinct tasks.

Box 3. Origin of monogamy in schistosomes

Figure 1 maps mating systems on a schistosome phylogeny. The figure shows that the mating system is independent of the vertebrate host group (birds or mammals) and that monogamy should be an ancestral state. Indeed, the more basal gonochoric schistosome, *Griphobilharzia*, is monogamous, and even if we do not know enough about the mating behaviour of schistosomes to conclude that some branches of the schistosome tree were monogamous and some were not, species (except *A. variglandis*) of the ancestral AO clade (*Austrobilharzia* and *Ornithobilharzia* genera) and species of the BSO clade (*Schistosoma*, *Orientobilharzia* and *Bivitellobilharzia* genera) seem to be monogamous, whereas species of the more recent clades, the SH clade (*Schistosomatium* and *Heterobilharzia* genera) and the BTGD clade (*Bilharziella*, *Trichobilharzia*, *Gigantobilharzia* and *Dendritobilharzia* genera), seem to be polygamous or

polygynandrous. The monogamous mating system of schistosomes seems to be an intermediate state between hermaphroditism and polygamy or polygynandry. This ancestral origin of monogamy could corroborate the hypotheses on the origin of gonochorism [5]. Gonochorism would appear when schistosomes have invaded their endothermic hosts (birds and mammals) because of the necessity to exploit a peculiar habitat: the hepatic portal system [5]. The necessity to both resist against portal blood flow and insinuate into the tiniest venules to release eggs results in a division of labour between a muscular male and a thin female [46]. The separation of the genders would obviously induce sexual interdependence (spermatozoide and ovocyte) but would also induce functional interdependence. The monogamous mating system would compensate for this male-female functional interdependence.

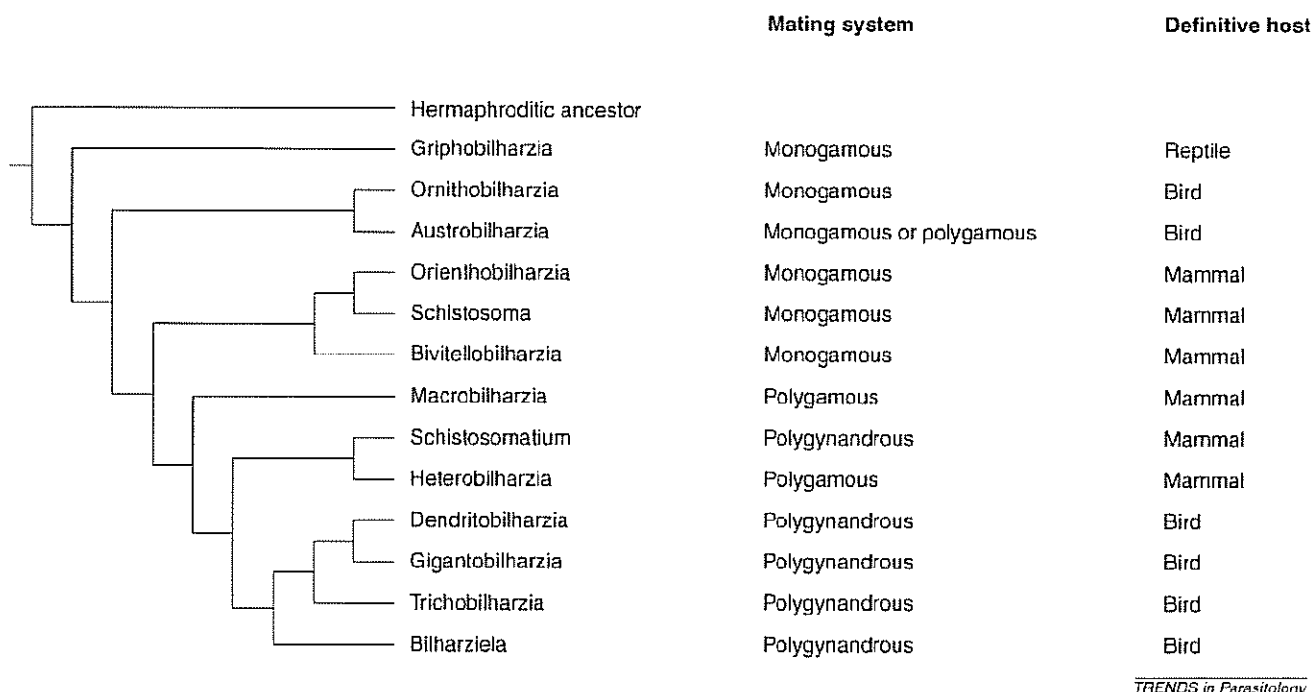


Figure 1. Mapping of the mating system and definitive host on a Schistosomatidae phylogeny. Phylogeny is modified from Ref [5].

schistosomes, the mechanism of mate change could be due to the female worm escaping from one male and joining another (female choice) and/or to the male actively stealing one female from another competitor male (male competition). In a unique intraspecific study on schistosome mate change by Pica-Mattocia *et al.* [3], the authors state that newcomer males can displace males from an established pair, thus giving the male the active role in mate change. This interpretation is founded on previous interspecific works on mating behaviour between distinct species of *Schistosoma* [2,4,20,21]. However, if the competitive implication of the male in mate change is established, a female choice does not have to be excluded. Both inverse experiments of Pica-Mattocia *et al.* [3] that introduce newcomer females to established pairs, realized in an interspecific study [2], and *in vitro* experiments enabling direct observation of mate change need to be performed to clarify the role of each gender in the mate change. Second, genetic monogamy should be discarded only when there is evidence that offspring result from both the first and second mates. The presence of a *receptaculum seminis* in female

schistosomes could provide the potential for females to store sperm and – as in birds, for example – control offspring paternity. DNA analyses on progeny should be performed to confirm that offspring resulted from the mate change and, thus, to establish whether schistosomes are genetically monogamous. Such DNA analyses are possible because multilocus genotyping methods have been developed on individual miracidia [22,23]. Third, several adaptive hypotheses (the ‘genetic incompatibility’ and the ‘better option’ hypotheses) and non-adaptive hypotheses (the ‘accidental loss’, the ‘forced divorce’ and the ‘musical chairs’ hypotheses) have been proposed to explain the mate change in free-living organisms (Box 4). More work is needed to understand the adaptive or non-adaptive significance of schistosome mate change. Finally, mate change has been tested only on *S. mansoni* and should be tested in other monogamous species of schistosomes.

Why are schistosomes monogamous?

Three hypotheses are classically proposed to explain the evolution of monogamy in free-living animals (and these

Box 4. Hypotheses explaining mate change

Incompatibility hypothesis [47,48]

The two members of a pair might not be intrinsically of poor quality but, when together, their combined qualities result in reduced fitness. As a consequence, both members of the pair could benefit from pairing with a new partner.

Better option hypothesis [48,49]

Mate change occurs when one member of a pair is able to improve its reproductive success by obtaining a better-quality mate.

Musical chairs hypothesis [48,50]

In species that exercise choice for territory rather than mate quality and where territorial settlement depends upon arrival sequence from migration, mate change might be a side-effect of the differential arrival of the sexes. Individuals might settle on the best available territory upon arrival (an individual arriving back too late will find its 'chair' occupied), and if the arrival sequence of previous partners differs, they might settle on different territories.

Accidental loss hypothesis [48]

Mate change might occur because of accidental loss of mates (e.g., through temporary separation during migration, poor weather conditions or disturbance), coupled with a need to re-pair quickly to minimize losses.

Forced divorce hypothesis [48,51]

Mate change might not be initiated by either partner but might be caused by the intrusion of a third individual that displaces one member of the pair.

hypotheses are not mutually exclusive): (i) female dispersion, (ii) paternal care, and (iii) the absence of qualitative variation between males and/or their territory (i.e. the reverse polygyny threshold hypothesis) [1].

The dispersion of females

The dispersion of females is often regarded as being fundamental to the evolution of monogamy in mammals. Indeed, if females are too dispersed, males are prevented from monopolizing several of them. This is the case in antelopes [24] and also in some lizards [25]. Inversely, the females' aggregation could promote polygyny by making the monopolization of several females by one male possible. In schistosomes, female dispersion from the liver to the mesenteric vein is a key phase. Variability in the pattern of female dispersion exists among different schistosome species [15]. However, a link between female dispersion and mating system remains unclear; some schistosome species corroborate the hypothesis of female dispersion (e.g. *H. americana*), but others do not (e.g. *S. mansoni* and *S. douthitti*). In *H. americana*, females cannot disperse alone [15]. Here, the absence of female dispersion could make the monopolization of several females by a male possible, and it is a polygynous species; thus, it agrees with the theory. In *S. mansoni*, there is no female dispersion but, rather, a *rendez-vous* in the liver of the host [15]. As such, a male could monopolize more than one female, but this species is monogamous and, therefore, it is not in accordance with the theory. In *S. douthitti*, females disperse alone [15]. However, this species is not monogamous; thus, it also disagrees with the theory. Female dispersion is only known in *H. americana*, *S. mansoni* and *S. douthitti*, which means that generalizing

the female dispersion hypothesis to explain the schistosomes' mating system is difficult. An analysis of female dispersion in the other species of Schistosomatidae would be necessary to challenge this hypothesis.

Paternal care

The need for paternal care is often viewed as the origin of monogamy in birds [1]. Parental care, whether maternal or paternal, can be defined as any investment brought by the parents that will increase the fitness of the offspring. This care can be prezygotic (before fertilization) and/or postzygotic (after fertilization). As in birds, male parental care in schistosomes has been proposed to be the origin of their monogamous mating system [6,7]. In schistosomes, because eggs are discarded in the environment, the only paternal care that could be considered has to be prezygotic. First, the male is fully in charge of the couple's migration because the female is deprived of the structural elements allowing locomotion [8]. Second, the female depends on the male to acquire her sexual maturity. Indeed, an unpaired female is known to be immature (small), and she will become mature and ready to produce eggs only after pairing [26]. Moreover, a disconnected female becomes immature again and is unable to lay despite the presence of a *receptaculum seminis* in which she could store sperm [27]. Third, the presence of the male increases the likelihood of female survival [28]. In summary, by helping females to reach the egg-laying site and attain sexual maturation, and by improving their survival rate, the male takes care of its progeny. However, paternal care is not necessarily indicative of monogamy [29] and could be only a consequence of gonochorism [5]. Indeed, the separation of the sexes led to a separation of 'domestic tasks' [8] and finally made male and female interdependent.

The reverse polygyny threshold hypothesis

The absence of qualitative variation in males and/or their environment (i.e. the reverse polygyny threshold hypothesis) could also be a significant factor in the origin of monogamy. According to the polygyny threshold theory [1,16], females might favour polygyny when a large variation exists between males in their intrinsic quality and/or in the quality of the resources they hold. Indeed, in such a situation, a female might compensate for the costs of polygyny by establishing herself as the second mate of a particularly well-endowed male. However, according to the reverse theory (the reverse polygyny threshold theory), when the resources are uniformly distributed in space and/or when they are limited, it would be impossible for a male to control a sufficient quantity of resources to ensure the reproduction of more than one female. In the same manner, in the absence of variation in quality of males, the female would benefit from joining an unpaired male rather than suffering the costs of polygyny (i.e. sharing the male and the resources he holds with other females). Finally, monogamy would be the only possible mating system as long as the threshold of polygyny is not reached – that is, when resources are rare and are regularly distributed in space [16]. Several studies on birds have demonstrated the relevance of this model. For example, a study of *Agelaius phoeniceus* (a species of pas-

serine bird in which polygyny is generally unfavourable to females, which prefer to place themselves in a territory with an unpaired male) revealed that when the authors manipulated territory quality, females preferred to place themselves in the best territory with a paired male [30]. In schistosomes, qualitative variation of males and/or their environment has never been studied. In relation to the quality of males, some studies support important intra-specific variability in schistosomes [31,32] but nothing is known about variability in the mate quality of different males. Male quality could be measured, for instance, as mobility, the ability to mate with a female, the ability to make a female sexually mature or the ability to fertilize a female (which could be tested by measuring eggs production). In relation to the quality of the territory, in the schistosome environment the parasites are not, *a priori*, limited by the quality or quantity of resources (i.e. the resources seem to be uniformly distributed in the host but not limited). However, at least in the *Schistosoma* genus on which the most information is available, if egg-laying sites as considered as resources, the slender venules on which the eggs are laid seem regularly distributed in the host's space and could be viewed as a limited factor. Indeed, obtaining a good egg-laying site might be a difficult task in a polygynous system. In particular, if all females paired to the same male and laid their eggs on the same venule, there would be a risk that the laying site would be prematurely ruined by the formation of granulomas around the aggregate of eggs produced by multiple females. The fact that resources (i.e. egg-laying sites) are limited and regularly distributed in space agrees with the reverse polygyny threshold hypothesis and could explain monogamy in some schistosome species.

How will the monogamous system be maintained?

The three hypotheses (female dispersion, paternal care and the reverse polygyny threshold theory) could explain the origin of monogamy in the animal kingdom. If these three factors are fundamental to this monogamous mating system, they could also maintain it. But other elements such as (i) intrasex aggressiveness and (ii) mate guarding might be involved in the maintenance of this mating system.

Intrasex aggressiveness

The intrasex aggressiveness towards potential newcomers prevents their access to a partner for reproduction. In monogamous species, aggression between females and between males is found, for example, in Gobiidae [33] and in birds [1,34]. In schistosomes, competition between males for access to females has been shown at the inter-specific level [2]. In a study by Tchuem-Tchuente *et al.* [2], mice were exposed to bisexual conspecific *Schistosoma intercalatum* larvae and after pairing, newcomer male *S. mansoni* were introduced. More heterospecific than homospecific pairs were recovered, indicating that *S. mansoni* males are much more competitive than *S. intercalatum* males at pairing with females. At the intraspecific level, no evidence exists for such competition, but the fact that the sex ratio is male biased [26] would favour such male-male competition.

Mate guarding

Mate guarding (or sequestration) would also enable the maintenance of monogamy by preventing access to other mates. For instance, female Monteiro's hornbills seal themselves into a nest cavity before egg laying and remain sequestered for most of the breeding cycle [35]. In the schistosomes, the fact that the female is found in the gynaecophoric canal of the male, as shown in Figure 1, seems to reflect mate guarding by the male. This male mate guarding could be a consequence of male parental investment. The male helps the female in transport, maturation and survival; thus, the male might sequester her to protect his investment.

Concluding remarks

Here, we have tried to shed light on the enigmatic monogamy in schistosomes and suggest some experiments to investigate the fascinating topic of the schistosomes' mating system. More information about monogamous and non-monogamous schistosomes species needs to be collected. Both an analytical approach using comparative analyses and an experimental approach should be used to provide new information on the mating strategies of these parasites. Schistosomes are a unique animal model for comparative analyses of monogamy. Indeed, they are among the lowest taxonomical level in monogamous species and is stripped of complex social interactions (such as learning, hierarchy or cooperation), which could alter our understanding of this peculiar mating system.

Acknowledgements

We thank Frank Cézilly, Eric S. Loker, Claude Combes and Suzie Mills for valuable discussions and constructive comments on the manuscript.

References

- 1 Reichard, U. and Boesch, C., eds (2003) *Monogamy: Mating Strategies and Partnerships in Birds, Humans and other Mammals*, Cambridge University Press
- 2 Tchuem-Tchuente, L.A. *et al.* (1995) Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology* 110, 45-52
- 3 Piet-Mattoecia, L. *et al.* (2000) Changes of mate occur in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 120, 495-500
- 4 Tchuem-Tchuente, L.A. *et al.* (1996) Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful? *Trends Parasitol.* 12, 231-236
- 5 Loker, E.S. and Brant, S.V. (2006) Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends Parasitol.* 22, 521-528
- 6 Read, A.F. and Nee, S. (1990) Male schistosomes: more than just muscle? *Parasitol. Today* 6, 297
- 7 Morand, S. and Muller-Graf, C.D. (2000) Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. *Parasitology* 120, 45-56
- 8 Basch, P.F. (1990) Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitol. Today* 6, 160-163
- 9 Chu, G.W. and Cutress, C.E. (1954) *Austroilharzia variglandis* (Miller and Northup, 1926) Penner, 1953, (Trematoda: Schistosomatidae) in Hawaii with notes on its biology. *J. Parasitol.* 40, 515-523
- 10 McKown, R.D. *et al.* (1991) New locality record for *Heterobilharzia americana*. *J. Wildl. Dis.* 27, 156-160
- 11 Kohn, A. (1964) On the genus *Macrobilharzia* Travassos 1922 (Trematoda, Schistosomatoidea). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 62, 1-6
- 12 Najim, A.T. (1956) Life history of *Gigantobilharzia huronensis* Najim, 1950. A dermatitis-producing bird blood-fluke (Trematoda: Schistosomatidae). *Parasitology* 46, 443-469
- 13 Nollen, P.M. (1983) Patterns of sexual reproduction among parasitic platyhelminths. *Parasitology* 86, 99-120

- 14 Short, R.B. (1952) Sex studies on *Schistosomatium douthitti* (Cort 1914) Price 1931 (Trematoda: Schistosomatidae). *Am. Midl. Nat.* 47, 1–54
- 15 Armstrong, J.C. (1965) Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *J. Parasitol.* 51, 605–616
- 16 Danchin, E. *et al.* (2005) *Ecologie comportementale*. Dunod
- 17 Hughes, C. (1998) Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology* 79, 383–399
- 18 Cézilly, F. *et al.* (2000) Pair-bonding in birds and the active role of females: a critical review of the empirical evidence. *Behav. Proc.* 51, 83–92
- 19 Trivers, R. (1972) Parental investment and sexual selection. In *Sexual Selection and the Descent of Man. 1871–1971* (Campbell, B., ed.), pp. 136–179, Aldine
- 20 Tchuem-Tchuente, L.A. *et al.* (1993) Choice of mate, a reproductive isolating mechanism between *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni* in mixed infections. *Int. J. Parasitol.* 23, 179–185
- 21 Southgate, V.R. *et al.* (1998) Recent studies on the reproductive biology of the schistosomes and their relevance to speciation in the Digenea. *Int. J. Parasitol.* 28, 1159–1172
- 22 Sorensen, R.E. *et al.* (2006) Genetic filtering and optimal sampling of *Schistosoma mansoni* populations. *Parasitology* 133, 443–451
- 23 Shrivastava, J. *et al.* (2005) Population genetics of multi-host parasites – the case for molecular epidemiological studies of *Schistosoma japonicum* using larval stages from naturally infected hosts. *Parasitology* 131, 617–626
- 24 Brotherton, P.N. and Manser, M.B. (1997) Female dispersion and the evolution of monogamy in the dik-dik. *Anim. Behav.* 54, 1413–1424
- 25 Pereira, H.M. *et al.* (2002) Monogamy, polygyny and interspecific interactions in the lizards *Anolis pogus* and *Anolis gingivinus*. *Carib. J. Sci.* 38, 132–136
- 26 Moné, H. and Boissier, J. (2004) Sexual biology of schistosomes. *Adv. Parasitol.* 57, 89–189
- 27 Clough, E.R. (1981) Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. *J. Parasitol.* 67, 535–539
- 28 Boissier, J. and Moné, H. (2000) Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121, 379–383
- 29 Smith, H.G. *et al.* (1995) Paternal care in the European starling, *Sturnus vulgaris*: incubation. *Anim. Behav.* 50, 323–331
- 30 Pribil, S. and Searcy, W.A. (2001) Experimental confirmation of the polygyny threshold model for red-winged blackbirds. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 268, 1643–1646
- 31 Jones, J.T. and Kusel, J.R. (1989) Intra-specific variation in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Today* 5, 37–39
- 32 Al-Adhami, B.H. *et al.* (2001) A study of some characteristics of individual clones of *Schistosoma mansoni* with emphasis on the biological and metabolic activities. *Parasitology* 123, 563–572
- 33 Harding, J.A. *et al.* (2003) Experimental analysis of monogamy in the Caribbean cleaner goby, *Gobiosoma evelynae*. *Anim. Behav.* 65, 865–874
- 34 Sandell, M.I. (1998) Female aggression and the maintenance of monogamy: female behaviour predicts male mating status in European starlings. *Proc. R. Soc. London Ser. B-Biol. Sci.* 265, 1307–1311
- 35 Stanback, M. *et al.* (2002) Genetic monogamy in Monteiro's hornbill, *Trachurus monteiroi*. *Anim. Behav.* 63, 787–793
- 36 DeWoody, J.A. *et al.* (2000) Genetic monogamy and biparental care in an externally fertilizing fish, the largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Proc. R. Soc. London Ser. B-Biol. Sci.* 267, 2431–2437
- 37 Bull, M.C. (2000) Monogamy in lizards. *Behav. Process.* 51, 7–20
- 38 Gillette, J.R. *et al.* (2000) Social monogamy in a territorial salamander. *Anim. Behav.* 59, 1241–1250
- 39 Prosen, E.D. *et al.* (2004) Sexual coercion in a territorial salamander: females punish socially polygynous male partners. *Anim. Behav.* 67, 85–92
- 40 Mathews, L.M. (2002) Territorial cooperation and social monogamy: factors affecting intersexual behaviours in pair-living snapping shrimp. *Anim. Behav.* 63, 767–777
- 41 Mathews, L.M. (2003) Tests of the mate-guarding hypothesis for social monogamy: male snapping shrimp prefer to associate with high-value females. *Behav. Ecol.* 14, 63–67
- 42 Eggert, A.K. *et al.* (1998) Parental care improves offspring survival and growth in burying beetles. *Anim. Behav.* 55, 97–107
- 43 Nosanchuk, J.S. *et al.* (1995) Case report of and description of parasite in *Mammomonogamus laryngeus* (human syngamiasis) infection. *J. Clin. Microbiol.* 33, 998–1000
- 44 Fernando, M.A. *et al.* (1971) The route of migration, development, and pathogenesis of *Syngamus trachea* (Montagu, 1811) Chapin, 1925, in pheasants. *J. Parasitol.* 57, 107–116
- 45 Hoffmann, K.F. *et al.* (2002) Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. *Genome Biol.* 3, 1–12
- 46 Despres, L. and Maurice, S. (1995) The evolution of dimorphism and separate sexes in schistosomes. *Proc. R. Soc. London Ser. B-Biol. Sci.* 262, 175–180
- 47 Coulson, J.C. (1966) The influence of the pair-bond and age on the breeding biology of the kittiwake gull *Rissa tridactyla*. *J. Anim. Ecol.* 35, 269–279
- 48 Choudhury, S. (1995) Divorce in birds: a review of the hypotheses. *Anim. Behav.* 50, 413–429
- 49 Ens, B.J. *et al.* (1993) Divorce in the long-lived and monogamous oystercatcher, *Haematopus ostralegus*: incompatibility or choosing the better option? *Anim. Behav.* 45, 1199–1217
- 50 Dhondt, A.A. and Adriaensen, F. (1994) Causes and effects of divorce in the blue tit *Parus caeruleus*. *J. Anim. Ecol.* 63, 979–987
- 51 Hatchwell, B.J. *et al.* (2000) Divorce in cooperatively breeding long-tailed tits: a consequence of inbreeding avoidance? *Proc. R. Soc. London Ser. B-Biol. Sci.* 267, 813–819

I.2. Publication « Mating systems and evolutionary trade-offs between morpho-anatomical features in Schistosomatidae », en préparation.

Des caractères morpho-anatomiques sont associés à des systèmes d'appariement chez des animaux comme les oiseaux (Dunn et al., 2001; Pitcher et al., 2005), les primates (Harcourt et al., 1981; Schillaci, 2006), les chauves-souris (Pitnick et al., 2006), les rongeurs (Ramm et al., 2005), et les insectes (Simmons and Emlen, 2006). Dans ces groupes animaux, la taille des testicules mais aussi d'autres caractères pas forcément sexuels sont potentiellement impliqués dans le système d'appariement. Ainsi, le dimorphisme de plumage, la taille du corps, la longueur de la queue et des ailes chez les oiseaux (Dunn et al., 2001), la taille du cerveau chez les primates (Schillaci, 2006) et les chauves-souris (Pitnick et al., 2006), les glandes accessoires (vésicules séminales et prostate) chez les rongeurs (Ramm et al., 2005), la masse de l'épididyme chez des mammifères terrestres carnivores (Iossa et al., 2008), la taille des cornes utilisées pour accéder au partenaire de reproduction chez des scarabés (Simmons and Emlen, 2006) sont des traits morpho-anatomiques potentiellement impliqués et liés à tel ou tel système d'appariement. Il a été montré que les traits morpho-anatomiques liés au sexe (caractères sexuels primaires et/ou secondaires) ne sont pas tous contraints par le système d'appariement à cause de la présence de compromis ou « trade-off » (Pitnick et al., 2006). Ces auteurs montrent chez une chauve-souris promiscuitaire un "trade off" entre deux organes couteux d'un point de vue métabolique : le cerveau et les testicules. Dans cette étude, plus l'intensité de la compétition spermatique est forte (plus la femelle a de partenaires), plus les testicules sont gros et plus le cerveau est petit (Pitnick et al., 2006). Pour tester le lien entre traits sexuels ou non et système d'appariement et observer d'éventuels compromis, les organismes parasites représentent des modèles idéaux. En effet, les parasites sont connus pour avoir certains tissus et organes simplifiés (comme le système digestif par exemple) par rapport à leur système de reproduction amplifié (Combes, 2001).

Au sein des Schistosomatidae, il existe des espèces qui arborent d'autres systèmes d'appariement que le système monogame (cf. figure 1 de la Box 3 de l'article précédent). Les Schistosomatidae monogames correspondent à ~30 espèces, les polygynes à ~4 espèces et les polygynandres à ~66 espèces. Les Schistosomatidae

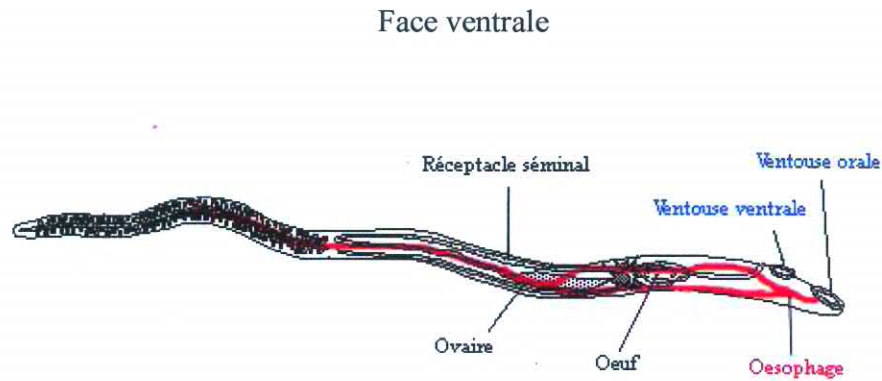
représentent donc un groupe de parasites idéal permettant de tester le lien entre système d'appariement et compromis entre traits morpho-anatomiques. Il est ainsi intéressant de voir s'il existe des traits morpho-anatomiques (liés eux même à des traits de vie) associés à tel ou tel système d'appariement et si des compromis d'investissement sont observables entre traits sexuels et traits somatiques.

Le nombre d'espèces incluses dans cette étude est limité par la disponibilité des séquences ADN nécessaires pour réaliser l'analyse comparative. Au total, 28 espèces (19 espèces provenant de 6 genres monogames et 9 espèces provenant de 6 genres polygynandres) sont incluses dans cette étude. Les espèces polygynes (2 espèces seulement dont les séquences ADN sont accessibles) sont écartées de l'analyse car trop peu de données sont disponibles. Les données de mesure de traits morpho-anatomiques de la femelle et du mâle sur les 28 différentes espèces sont récupérées dans les articles de descriptions d'espèces (voir « Supplementary table online » dans l'article). Nous réalisons ainsi trois groupes de caractères morphologiques (figure 4 et 5):

1. Le « groupe reproduction » contient des traits morpho-anatomiques de la femelle et du mâle impliqués dans la reproduction : la surface relative du réceptacle séminal (i.e par rapport à la surface totale du corps) et la longueur relative de l'ovaire (i.e par rapport à la longueur totale du corps) de la femelle ; le nombre de testicules, la surface relative de la vésicule séminale, la longueur relative du canal gynéchophore et le rapport gonado-somatique des mâles.
2. Le « groupe nutrition » contient des traits morpho-anatomiques de la femelle et du mâle impliqués dans la nutrition : la longueur relative de l'œsophage du mâle et de la femelle.
3. Le « groupe locomotion » contient des traits morpho-anatomiques de la femelle et du mâle qui sont impliqués dans le déplacement : les surfaces relatives des ventouses orales et ventrales de la femelle et du mâle impliquées dans le déplacement du couple dans le système sanguin de l'hôte définitif et leur ratio relatif entre les deux sexes.

NB : le canal gynéchophore du mâle pourrait apparaître dans les trois groupes car ce canal gynéchophore peut être impliqué (en plus de la reproduction) dans la nutrition

par voie transtégumentaire, la maturation, la locomotion et potentiellement dans la séquestration mais aussi dans la protection de la femelle Schistosomatidae.



Face dorsale

Figure 4: Schéma d'une femelle Schistosomatidae.

En noir, les caractères du « groupe reproduction » ; en bleu, les caractères du « groupe locomotion » ; en rouge, les caractères du « groupe nutrition ». Au sein des Schistosomatidae, la taille des femelles est variable ; par exemple, la femelle *S. mansoni* mesure ~ 1.1cm sur 0.2mm, la femelle *S. haematobium* ~ 1cm sur 1mm et la femelle *S. japonicum* ~ 2cm sur 0.4mm.

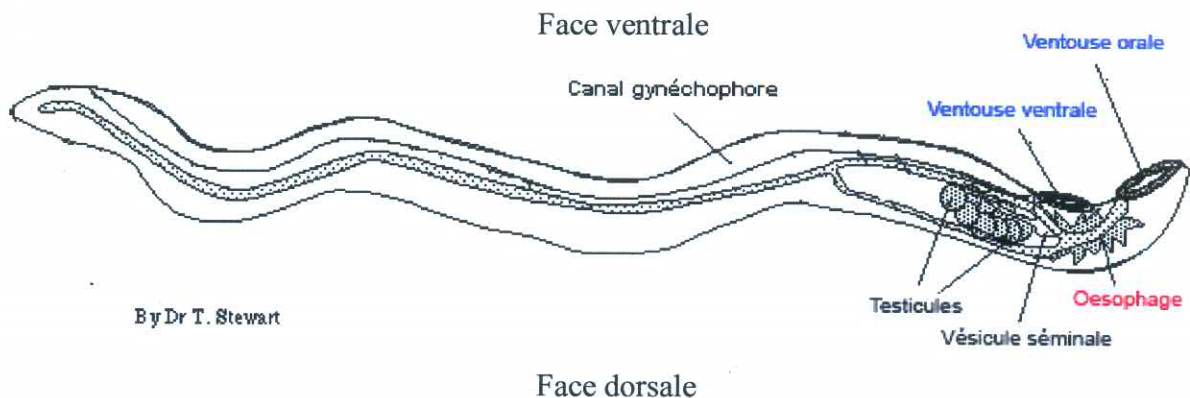


Figure 5: Schéma d'un mâle Schistosomatidae.

En noir, les caractères du « groupe reproduction » ; en bleu, les caractères du « groupe locomotion » ; en rouge, les caractères du « groupe nutrition ». Au sein des Schistosomatidae, la taille des mâles est variable, par exemple les mâles *S. mansoni* et *S. haematobium* mesurent ~ 1cm sur 1mm, alors que chez *S. japonicum*, le mâle est plus long ~ 1.2cm sur 0.5mm.

Une première analyse statistique (test non paramétrique de Mann-Whitney) est réalisée afin de comparer ces différents caractères selon le système d'appariement monogame ou polygynandre (cf. histogrammes de la figure 1 de l'article). Une

deuxième analyse, comparative, est ensuite nécessaire afin de s'affranchir de l'effet de la phylogénie en terme d'évolution de ces traits morpho-anatomiques et donc de distinguer ce qui est le résultat de la phylogénie et ce qui est le résultat du système d'appariement. Cette analyse a été menée par Yves Desdevises (Maître de Conférence à l'Université Pierre et Marie Curie) en tenant compte des traits mesurés sur les espèces dont les séquences ADN pour réaliser la phylogénie sont disponibles. Dans le cas des Schistosomatidae, un problème apparaît car le changement de système d'appariement ne se produit qu'une fois au cours de la phylogénie, passant de la monogamie ancestrale à la polygynandrie (cf. figure 1 de la Box 3 de l'article précédent dans laquelle les polygynes seraient éliminés de l'analyse), ce qui empêche la réalisation d'une analyse comparative « classique ». Deux analyses sont alors réalisées, une au sein du groupe de Schistosomatidae monogames, l'autre au sein du groupe de Schistosomatidae polygynandres, pour éliminer l'effet de la phylogénie au sein de chacun de ces groupes. La part de la phylogénie, du système d'appariement et celle commune entre la phylogénie et le système d'appariement sont évaluées sur les résidus des analyses précédentes. La significativité de cette évaluation est inscrite dans la figure 1 de l'article.

Résultats (figure 1 de l'article)

Concernant le « groupe reproduction » (figure 1.A de l'article), le canal gynéchophore du mâle, expliqué à 100% par le système d'appariement, est plus gros chez le mâle monogame. Le nombre de testicules et leur surface relative apparaissent comme étant par contre moins important chez les Schistosomatidae monogames avec une part de 48% et 42% d'explication du système d'appariement. La vésicule séminale des mâles et le réceptacle séminal des femelles sont également moins importants chez les monogames (même si l'estimation des parts de la phylogénie et du système d'appariement n'est pas significative pour la vésicule séminale et le réceptacle séminal). Concernant la longueur de l'ovaire, il n'y pas de différence entre monogames et polygynandres.

Concernant le « groupe nutrition » (figure 1.B de l'article), les œsophages des mâles et des femelles sont plus courts chez les monogames (expliqué par le système d'appariement à 22% et 46%).

Concernant finalement le « groupe locomotion » (figure 1.C de l'article), le ratio entre ventouses orales du mâle et ventouses orales de la femelle est plus élevé chez les monogames et expliqué par le système d'appariement à 30% ; de même pour le ratio entre ventouses ventrales entre mâle et femelle, expliqué par le système d'appariement à 12%.

Discussion

Il est maintenant bien établi que chez les polygynandres, la compétition spermatique étant très forte, les mâles devraient investir plus dans leurs organes reproducteurs que les mâles monogames (Parker, 1998). Ce lien a été démontré chez les primates, les oiseaux, les rongeurs, les amphibiens et des groupes d'insectes (Parker et al., 1997). Dans cette étude, nous prouvons que les Schistosomatidae peuvent être ajoutés à cette longue liste avec une particularité : les Schistosomatidae appartiennent au groupe de plus bas rang taxonomique et le seul groupe parasite. Dans la littérature, rares sont les études révélant le lien entre organes accessoires et compétition spermatique. Récemment, il a été montré chez les rongeurs que la masse de la vésicule séminale et celle du lobe antérieur de la prostate augmentent avec la masse des testicules (Ramm et al., 2005). Sans le contrôle par la phylogénie, nous avons trouvé un lien semblable entre la surface relative des testicules et la surface relative de la vésicule séminale chez les mâles et le pendant chez les femelles, la surface relative du réceptacle séminal en fonction du système d'appariement. Malheureusement, la taille de l'échantillonnage étant certainement insuffisante, l'analyse comparative n'a pas montré un effet du système d'appariement sur ces organes accessoires. Plus d'espèces doivent être incluses dans les analyses. Si les données sur les traits morpho-anatomiques sont aujourd'hui disponibles, l'information moléculaire nécessaire pour la reconstruction phylogénétique (et donc les analyses comparatives qui pourraient en découler) sont absentes.

Le canal gynéchophore est un caractère sexuel secondaire des mâles chez les Schistosomatidae. C'est un canal en position ventrale dans lequel la femelle réside. Notre étude prouve que les schistosomes monogames présentent un canal gynéchophore sept fois plus grand que les schistosomes polygynandres (90% de toute la longueur de corps chez les mâles monogames vs 12% de toute la longueur de corps chez les mâles polygynandres, entièrement expliqué (100%) par le système

d'appariement). Sans considérer le système d'appariement, une corrélation négative entre la taille du canal gynéchophore et le nombre de testicules a déjà été démontrée (Morand and Muller-Graf, 2000). Le niveau du soin paternel est connu pour être lié au système d'appariement (Moller and Cuervo, 2000). Généralement, le mâle fournit des soins paternels proportionnellement à sa certitude de paternité (Neff, 2003). Ainsi, si le canal gynéchophore est associé à l'investissement paternel, comme cela a déjà été proposé (Morand and Muller-Graf, 2000), il semble logique que les schistosomes mâles monogames, fournissant plus de soins paternels que les polygynandres, présentent un plus grand canal gynéchophore que les schistosomes mâles polygynandres.

Comme prévu, ces organismes parasites présentent des caractères sexuels particulièrement amplifiés comparé aux organismes libres. Chez les Schistosomatidae, le ratio gonado-somatique s'étend de 3% à 24% selon le système d'appariement monogame ou polygynandre respectivement. Pour comparer aux animaux libres, le ratio masse de testicules/masse du corps s'étend de 0,12% à 8,4% et de 0,02% à 0,75% chez les chauves-souris et les primates respectivement (Pitnick et al., 2006). Chez les Schistosomatidae, un tel investissement dans les tissus testiculaires, connu pour être très coûteux (Kenagy and Trombulak, 1986), implique très certainement un compromis énergétique entre l'investissement dans ces tissus testiculaires et celui dans les caractères somatiques. Notre étude montre que les mâles Schistosomatidae monogames présentent un nombre et une surface relative de testicules inférieurs aux mâles Schistosomatidae polygynandres, une surface relative de ventouses plus grande et une longueur relative d'oesophage plus courte. Les ventouses sont des organes très importants chez les digènes. Ils permettent la migration et la fixation du parasite dans l'hôte définitif. D'ailleurs, les Schistosomatidae sont des endoparasites vivants dans le système sanguin des oiseaux ou des mammifères, ainsi ils doivent résister au flux sanguin. Notre étude montre que le dimorphisme relatif de ventouses est plus important chez les schistosomes monogames que chez les schistosomes polygynandres. Cette différence apparaît comme étant une conséquence de la surface relative des ventouses des mâles monogames, plus grande par rapport à celle des mâles polygynandres (aucune différence entre les surfaces relatives de ventouses chez les femelles monogames ou polygynandres n'apparaît). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que chez les monogames, le mâle doit maintenir et transporter sa femelle

jusqu'aux sites de ponte. Inversement, chez les polygynandres, la femelle doit se déplacer et résister seule au flux sanguin.

Les schistosomes ingèrent des globules rouges (régime alimentaire principal) à l'aide d'une contraction des muscles de la ventouse orale et de l'oesophage (Maule and Marks, 2006). Notre étude montre que chez les schistosomes polygynandres (mâle et femelle), l'oesophage est plus long que chez les monogames. En ce qui concerne les mâles polygynandres, nous pourrions présumer que la nécessité de produire de nombreux spermatozoïdes rend nécessaire l'augmentation de l'investissement dans la fonction nutritive. Cela peut également être le résultat d'une différence d'investissement énergétique entre les soins fournis à la femelle et la fonction nutritive. En effet, comme les mâles polygynandres n'ont pas à transporter leur femelle, ils peuvent investir plus d'énergie dans la fonction nutritive. En ce qui concerne les femelles polygynandres, l'oesophage plus long comparé aux femelles monogames peut être une conséquence de l'absence d'un appariement continu. Chez les schistosomes monogames, au moins au sein du genre *Schistosoma*, il est bien établi que le mâle aide la femelle dans la nutrition pour qu'elle atteigne la maturité sexuelle (Basch, 1990; Basch, 1991). Seule, une femelle est immature et ne peut pas produire d'oeuf (Armstrong, 1965). Ainsi, les femelles monogames, aidées par leur mâle, possèdent un oesophage plus court que les femelles polygynandres. De manière générale, notre étude montre que le système d'appariement conduit à des compromis entre caractères sexuels et caractères somatiques. Les mâles schistosomes monogames investissent moins dans les tissus sexuels (testicules et organes associés) mais plus dans les tissus associés aux soins apportés à leur femelle (transport, protection et aide à la nutrition). Inversement, chez les mâles schistosomes polygynandres, un investissement supérieur dans les tissus sexuels et un investissement inférieur dans le soin aux femelles sont observés.

Le scénario évolutif proposé en I.1.1. pourrait être prolongé pour expliquer l'évolution des systèmes d'appariement au sein des Schistosomatidae : comme énoncé précédemment (cf. I.1.1.), le gonochorisme serait apparu avec la nécessité de conquérir un habitat particulier, le système porte hépatique de l'hôte vertébré (Loker and Brant, 2006). La nécessité de résister au flux sanguin du milieu tout en étant capable de s'insinuer au travers de fines veinules afin d'optimiser le passage des œufs vers l'intestin conduit à la séparation des sexes et des « tâches ménagères »

(Loker and Brant, 2006). Le mâle devient musculeux pour transporter et nourrir sa femelle qui devient très fine pour s'insinuer dans les veinules, perdant ainsi des éléments structuraux indispensables à la locomotion et à la nutrition au profit de la reproduction. Ainsi, la séparation des sexes induit obligatoirement une interdépendance entre mâle et femelle et la monogamie serait le seul système d'appariement possible, à ce stade de l'évolution, pour compenser cette interdépendance fonctionnelle coûteuse. Au cours de l'évolution, certains traits pourraient avoir évolués par hasard dans le sens d'un rappetissement du canal gynéchophore et des ventouses chez le mâle, le rendant moins amène à s'occuper de sa femelle dans le déplacement, mais aussi dans la nutrition. La femelle se verrait ainsi contrainte à devoir se déplacer et se nourrir seule, d'où une augmentation de la taille des ventouses et de l'œsophage de la femelle au cours de l'évolution. Investissant moins de soin dans la femelle, le mâle verrait aussi son œsophage se rallonger. Chaque partenaire de reproduction devrait ainsi investir plus d'énergie dans la survie mais aussi dans la reproduction. La diminution du canal gynéchophore rendrait impossible la monopolisation de la femelle par le mâle. Les mâles entreraient en compétition pour l'accès à la femelle. La compétition spermatique serait alors plus intense ; ainsi, le nombre de testicules, la vésicule séminale et le rapport gonado-somatique des mâles augmentent. Du côté des femelles, le réceptacle séminal augmente également, rendant possible le stockage du sperme et le contrôle de la paternité de sa descendance (cf. Chap. II). Ainsi, le système d'appariement polygynandre pourrait se mettre en place au cours de l'évolution des Schistosomatidae.

Mating systems and evolutionary trade-offs between morpho-anatomical features in Schistosomatidae

Beltran S.; Desdevises Y. ; Portela J. and Boissier J.

Introduction

Morpho-anatomical features are known to be associated to mating system in several animal groups such primates (Harcourt *et al.*, 1981; Schillaci, 2006), bats (Pitnick *et al.*, 2006), birds (Dunn, 1999; Moller, Briskie, 1995; Pitcher *et al.*, 2005), rodents (Ramm *et al.*, 2005), fishes (Stockley *et al.*, 1997), amphibians (Jennions, Passmore, 1993) or insects (Gage, 1994; Simmons, Emlen, 2006). Logically, as a consequence of sexual selection, these morpho-anatomical features mainly concern primary or secondary sexual characters. However, it has been shown that no sex-linked morpho-anatomical features could also be constrained by the mating system as a consequence of evolutionary trade-off (Pitnick *et al.*, 2006). These last authors showed that bat species with mating systems based on female promiscuity were associated with smaller brains and larger testes while species with mating systems based on female fidelity were associated with larger brains and smaller testes; this pattern is interpreted as an investment trade-off between two metabolically expensive organs (Pitnick *et al.*, 2006). The 'expensive sexual tissue' hypothesis thus proposes that a more intense sexual selection will constrain the evolution of expensive tissue and associated function as a result of energetic trade-offs with costly sexual organs, ornaments or armaments (Pitnick *et al.*, 2006). To test this hypothesis, parasitic organisms would be of clear interest because as a consequence of their way of life, some tissues are known to be simplified (digestive system, for instance), while other are know to be amplified (reproductive system, for instance) (Combes, 2001).

Schistosomes (Trematoda: Schistosomatidae) are endoparasites of birds and mammals. Among the 18,000 species of digenetic trematodes, the hundred species of schistosomes are unusual because they possess separate sexes (Trematodes being usually hermaphroditic). More importantly, there are the unique parasitic organisms that showed diversity in their mating system. Three mating systems have been identified in schistosomes (Beltran, Boissier, 2008). (i) Monogamous schistosomes correspond to ~30 species where worm pairs with only one female and only one male are observed directly *in vivo* or after experimental recovery. (ii) Polygynous schistosomes correspond to ~4 species where male monopolizes more than one female, other males not having access to any. (iii) Polygynandrous schistosomes correspond

to ~66 species where males and females were never seen *in copula in vivo* (i.e. males and females mate with several partners of the opposite sex during a period of time). Schistosomes are thus unique parasitic organism which allows testing the link between mating system and trade-offs between morpho-anatomical features.

The present paper proposes to test on schistosomes: (i) if development of sexual tissues is dependent on the mating system and (ii) if evolutionary investment trade-offs could be identified between sexual tissues and somatic tissues. Sexual tissues are measured as number of testes and relative testes surface for male and relative ovary length for female. Somatic tissues are classified according to their function: nutrition or locomotion.

Material and methods

Data collection

The number of species included in this study is limited by DNA sequence information needed for the comparative analyses. A total of 28 species are included. Nineteen species from six genera are monogamous and nine species from six genera are polygynandrous. Only two polygynous species present DNA sequence information and thus are not included in the analysis. Data on morpho-anatomical features were collected from published parasite description (Supplementary Table of measurements online). We carry out three groups of morpho-anatomical traits according to their functions:

1. The "reproduction group" contains sexual morpho-anatomical features of the female and male schistosomes. Concerning the female, we have noticed the relative seminal receptacle surface (seminal receptacle surface divided by the total surface of the body) and the relative ovary length (ovary length divided by the overall length of the body). Concerning the male, we have noticed the testes number, the relative seminal vesicle surface (seminal vesicle surface divided by the total surface of the body) and the relative testes surface (total testes surface divided by body surface). We also noticed the relative male gynaechophorical canal length (length of the gynaechophorical canal divided by the overall length of the body). The gynaechophorical canal is a groove on the ventral side of the male in which the female is held during the copulation.

2. The "nutrition group" contains somatic morpho-anatomical features of the female and male schistosomes implied in the nutrition. For male and female, we have noticed the relative oesophagus length (oesophagus length divided by the overall length of the body).

3. The "locomotion group" contains somatic morpho-anatomical features of the female and male schistosomes implied in the locomotion. Schistosomes like all the

digeneans are characterised by an oral sucker around the anterior mouth and by a ventral sucker or acetabulum. Locomotion is performed by alternate attachment of the suckers in internal host surfaces (Basch, 1984). For male and female, we have noticed relative oral and ventral suckers (sucker surface divided by the total surface of the body). We have also calculated male/female relative sucker ratios.

Comparative analyses

First, a statistical analysis using non-parametric Mann-Whitney U tests was carried out in order to compare the morpho-anatomical features according to the monogamous *vs* polygynandrous mating system. Second, we performed variation partitioning (Borcard et al. 1992, Desdevises et al. 2003) of these morpho-anatomical features between historical (phylogeny) and adaptive (mating system) components. The objective of this analysis is, for each parasite's trait examined, to quantify the part of its variation due to the mating system, the part due to phylogeny (i.e. phylogenetic inertia), and the overlap between these two components, i.e. the portion of the variation due to mating system and phylogeny at the same time, usually considered as linked to phylogenetic niche conservatism *sensu* Grafen (1989). Such variation decomposition requires the quantification of trait variation due to the phylogeny alone, precluding the use of classical comparative methods such as independent contrasts (Felsenstein 1985, 2008). Here, the expression of the phylogenetic variance is carried out *via* a principal coordinate analysis on the distance matrix computed from the phylogenetic tree of the species considered. A few principal coordinates were chosen using a broken-stick model (Diniz-Filho et al. 1998) to account for phylogeny. The detail of the partitioning method used can be found in Desdevises et al. (2003) and Cubo et al. (2008). This method is based on the combination of R-squared issued from different regressions, and adjusted R-squared were used here as it was shown that they are more adequate in a variation partitioning context (Peres-Neto et al. 2006). Principal coordinate analyses were performed with DistPCoA (Legendre, P. & M. J. Anderson. 1998. Program DistPCoA. Département de sciences biologiques, Université de Montréal). Variation partitioning and the tests of significance of the fractions were computed using the functions 'varpart' and 'anova.cca' from the 'vegan' library (Oksanen et al. 2007) of the R statistical language (R Development Core Team 2008; *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>). All tests were performed through permutational procedures using 9999 permutations. Mating system was accounted for *via* a binary variable (0/1). Principal coordinates were computed within each

monophyletic group formed by monogamous and polygynandrous species in order not to break up the dichotomy between the two mating systems.

Phylogenetic reconstruction among Schistosomatidae species used was based on DNA sequences from complete 18S and 28S rDNA genes, and partial Cytochrome Oxidase 1 (CO1) mtDNA gene. Sequences were aligned by MAFFT version 5 (Kato et al., 2002, 2005) and improved by eye with Se-AL v2.0a11 (Rambaut, A. 1996. Se-AL: Sequence Alignment Editor. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>). Ambiguous regions were deleted from alignments for final lengths of 1653 bp (18S), 3741 bp (28S) and 1095 bp (CO1). Because not all species investigated were sequenced for all the genes used, we constructed trees from the various datasets and combined these source trees via a supertree with the use of Rainbow (Chen et al. 2004), using matrix representation with parsimony with the Baum (1992) and Ragan (1992) coding scheme (Wiens & Reeder, 1995, see Sanderson et al., 1998). The combined matrix was subjected to a parsimony analysis with the heuristic algorithm implemented in PAUP*, using 10 random addition replicates and the tree bisection-reconnection branch-swapping algorithm. Source trees were built *via* Bayesian analysis with MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). The reconstruction used 4 chains of 10^6 generations with the best evolutionary models chosen via hierarchical likelihood ratio test by MrModelTest 2.2 (Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest 2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University) for the rDNA sequences, and a mixed model applied on the translated sequences for the mtDNA sequences. Burnin value was set to 20 % of the sampled trees (1% of the number of generations). A single supertree was obtained and used for the variation partitioning analysis.

Results

Concerning the 'reproduction group' (Figure 1.A), statistical analyses show that monogamous males display lower number of testes, lower relative testes surface, lower relative seminal vesicle surface but longer relative gynechophorical canal length than polygynandrous males. Variance partitioning among adaptive (mating system) and historical (phylogeny) components shows that relative testes surface, testes number and relative gynechophorical canal length are significantly influenced by the mating system with R^2 higher than 40%. Concerning the female, monogamous species display lower relative *receptaculum seminis* surface than polygynandrous ones; however, variance partitioning analyses is not significant.

Concerning the 'nutrition group' (Figure 1.B), statistical analyses show that male and female polygynandrous species display longer relative oesophagus length than monogamous ones.

Variance partitioning analyses show that this morpho-anatomical feature is significantly influenced by the mating system for both sexes.

Concerning the 'locomotion group' (Figure 1.C), statistical analyses show that male monogamous species display higher relative sucker surface than polygynandrous ones. No difference is found between females whatever monogamous or polygynandrous. Variance partitioning analyses display significant influence of the mating system only for the relative sucker ratio (i.e. sexual dimorphism in the sucker surface is higher in monogamous than in polygynandrous species).

Discussion

It is now well established that, as a consequence of spermatic competition, males having promiscuous sexual behaviour should invest more in their reproductive organs than monogamous males (Parker, 1998). This link has been demonstrated both between species in primate, bird, rodent, amphibian and insect groups, and between populations (see Parker *et al.*, 1997 for synthesis). In this study, we show that Schistosomatidae can be added to this long list. Nevertheless, in this updated list, Schistosomatidae represents group from the lower taxonomical level and the alone parasitic group. In the literature, rarer is found about the link between sex accessory organs and sperm competition level. Recently, it has been shown in rodents that the mass of seminal vesicle and the anterior lobe of the prostates vary positively with testes mass (Ramm *et al.*, 2005). Without controlling for phylogeny, we found similar link between relative testes surface and relative seminal vesicle surface in males and associated relative *receptaculum seminis* surface in females. Unfortunately, surely due to an insufficient sample size, variance partitioning analyses did not show an effect of the mating system on these sex accessory organs. More species need to be included in the analyses. However, if data on morpho-anatomical features are available, molecular information, necessary for phylogenetic construction, and subsequent comparative analyses are missed.

The gynaechophorical canal is a male secondary sexual character specific of Schistosomatidae. This canal is a ventral groove in which the female resides. Our study shows that monogamous schistosomes display a gynaechophorical canal seven times higher than polygynandrous ones (90% vs 12% of the total body length, fully explained by the mating system). Without considering the mating system, a negative trade-off between the size of the gynaechophorical canal and the number of testes has ever been demonstrated (Morand, Muller-Graf, 2000). The level of paternal care is known to be linked to the mating system (Moller, Cuervo, 2000). It is generally expected that the male provides less care when they

have lower paternity insurance (Neff, 2003). Thus, if the gynaechophorical canal represents a paternal investment, as it has been proposed (Morand, Muller-Graf, 2000), it seems logical that male monogamous schistosomes providing more care than male polygynandrous ones, present a larger gynaechophorical canal than male polygynandrous ones.

As expected, parasitic organism displays amplified sexual morpho-anatomical features compared to free living organisms. In Schistosomatidae, the gonado-somatic index ranges from 3% to 24% according to the mating system whatever monogamous or polygynandrous species. For comparison purposes, testes mass ranges from 0.12% to 8.4% and from 0.02% to 0.75% of body mass for bats or primates, respectively (Pitnick et al., 2006). This is an important point because it could be expected that more energy is invested in testicular tissues, which is known to represent a substantive energetic investment (Kenagy, Trombulak, 1986), and thus less energy is available for the other tissues and associated functions. Our study shows that if male monogamous Schistosomatidae display lower relative testes surface than polygynandrous ones, their relative sucker surface is higher and their relative oesophagus length is shorter.

Suckers are very important organs in digeneans because they allow the migration and the fixation of the parasite in the definitive host. Moreover, Schistosomatidae are endoparasite living in the veins of birds or mammals, thus they have to resist against the blood flow. Our study shows that relative sucker dimorphism is higher in monogamous than in polygynandrous species. This difference is a consequence of a higher male relative sucker surface in monogamous compared to polygynandrous species rather than a difference in female relative sucker surface. More precisely, no difference in relative sucker surface exists between monogamous female and polygynandrous parasites whatever male or female (ranging from 0.41% to 0.58% of the body surface for both suckers). Only the monogamous male displays amplified relative sucker surfaces (1.83% and 3.28% of the body surface for the oral and ventral sucker, respectively). This result could be explained by the fact that when it is monogamous, male parasite has to maintain and transport its female to the egg laying sites. At the opposite, when it is polygynandrous, the female parasite has to travel and resist against the blood flow alone. Thus, we could hypothesise that, as a consequence of the mating system, sexual selective pressures only act on monogamous male.

Schistosomes ingest red blood cells (their principal diet) thanks to a negative pressure created by the contraction of the muscle of the oral sucker and the oesophagus (Maule, Marks, 2006). Our study shows that male and female polygynandrous parasites display longer oesophagus than monogamous ones. Concerning polygynandrous males, we could hypothesise that the

need to produce numerous spermatozooids necessitates increasing their nutritive function. It could be also the result of an energetic trade-off between female care vs nutritive function. Indeed, because polygynandrous males do not have to hold and transport the female, they can invest more energy in the nutrition. Concerning polygynandrous females, the longer oesophagus length compared to monogamous ones could be a consequence of the absence of a continuous pairing. In monogamous schistosomes, at least in the *Schistosoma* genus where more information is available, it is well established that male assists the female to pump blood and to reach their sexual maturity (Basch, 1991). A female alone is stunted and unable to produce eggs (Armstrong, 1965). Thus, as a consequence of the mating system, the monogamous females helped by their males possess a shorter oesophagus than polygynandrous female which stand alone.

Overall, our study shows that mating system drive trade-offs of somatic and sexual morpho-anatomical features. Monogamous males display low investment in sexual tissues (testis and associated organs) but high investment in tissues allocated to female care (transport, protection and feeding assistance). At the opposite, polygynandrous male display higher investment in sexual tissues and lower investment in female care compare to monogamous ones. Sexual selection therefore select for primary and secondary sex organs but also indirectly (by trade-offs) in somatic organs that are beneficial in a given mating system whatever mono- or polygynandrous.

References

- Armstrong JC (1965) Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *Journal of Parasitology* 51, 605-616.
- Basch PF (1984) Development and behavior of cultured *Schistosoma mansoni* fed on human erythrocyte ghosts. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33, 911-917.
- Basch PF (1991) *Schistosomes. Development, reproduction, and host relations* Oxford University Press, New-York.
- Baum BR. 1992. Combining trees as a way of combining data sets for phylogenetic inference, and the desirability of combining gene trees. *Taxon* 41: 3-10
- Beltran S, Boissier J (2008) Schistosome monogamy: who, how, and why? *Trends in Parasitology* 24, 386-391.
- Borcard, D., Legendre, P., and Drapeau, P. 1992. Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology* 73: 1045-1055.
- Chen D, Eulesnstein O, Fernandez-Baca D. 2004. Rainbow: a toolbox for phylogenetic supertree construction and analysis. *Bioinformatics* 16: 2872-2873
- Combes C (2001) *Parasitism : The Ecology and Evolution of Intimate Interactions* The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Cubo J, Legendre P, de Ricqles A, Montes L, de Margerie E, Castanet J, Desdevises Y. 2008. Phylogenetic, functional, and structural components of variation in bone growth rate of amniotes. *Evolution and Development* 10 (2): 217-227
- Desdevises, Y., Legendre, P., Azouzi, L., and Morand, S. 2003. Quantifying phylogenetically structured environmental variation. *Evolution* 57: 2647-2652.
- Diniz-Filho, J. A. F., de Sant' Ana, C. E. R., and Bini, L. M. 1998. An eigenvector method for estimating phylogenetic inertia. *Evolution* 52: 1247-1262.
- Dunn PO (1999) Forced copulation results in few extrapair fertilizations in Ross's and lesser snow geese. *Animal Behaviour* 57, 1071-1081.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125, 1-15.
- Felsenstein, J. 2008. Comparative methods with sampling error and within-species variation: contrasts revisited and revised. *The American Naturalist* 171: 713-725.
- Gage MJG (1994) Association between body size, mating pattern, testis size and sperm length across butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 258, 247-254.
- Grafen A. 1989. The phylogenetic regression. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 326: 119-157.
- Harcourt AH, Harvey PH, Larson SG, Short RV (1981) Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature* 293, 55-57.
- Jennions MD, Passmore NI (1993) Sperm competition in frogs: testis size and a 'sterile male' experiment on *Chiromantis xerampelina* (Rhacophoridae). *Biological Journal of the Linnean Society* 50, 211-220.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511-518
- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*. 67, 1-22.
- Maule AG, Marks NJ (2006) in *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*. Edited by Queen's University, Belfast, Northern Ireland.

- Moller AP, Briskie JV (1995) Extra-paternity, sperm competition and the evolution of testis size in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36: 357–365
- Moller P.A, Cuervo JJ (2000) The evolution of paternity and paternal care in birds. *Behavioral Ecology* 11, 472-485.
- Morand S, Muller-Graf CD (2000) Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. *Parasitology* 120, 45-56.
- Neff BD (2003) Decisions about parental care in response to perceived paternity. *Nature* 422, 716-719.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., and O'Hara, R. B. 2007. *vegan: Community Ecology Package version 1.8-5*. URL <http://cran.r-project.org/>.
- Parker GA (1998) Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: Birkhead T.R, Møller A.P, editors. *Sperm competition and sexual selection*, Academic Press; London, 3-54.
- Parker GA, Ball MA, Stockley P, Gage MJ (1997) Sperm competition games: a prospective analysis of risk assessment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 264, 1793-1802.
- Peres-Neto, P. R., Legendre, P., Dray, S., and Borcard, D. 2006. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* 87: 2614-2625.
- Pitcher TE, Dunn PO, Whittingham LA (2005) Sperm competition and the evolution of testes size in birds. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 557-567.
- Pitnick S, Jones KE, Wilkinson GS (2006) Mating system and brain size in bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 719-724.
- Ragan MA. 1992. Phylogenetic inference based on matrix representation of trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 53-58
- Ramm SA, Parker GA, Stockley P (2005) Sperm competition and the evolution of male reproductive anatomy in rodents. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272, 949-955.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Sanderson MJ, Purvis A, Henze C. 1998. Phylogenetic supertrees: assembling the trees of life. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 105-109
- Schillaci MA (2006) Sexual selection and the evolution of brain size in primates. *PLoS ONE* 1, e62.
- Simmons LW, Emlen DJ (2006) Evolutionary trade-off between weapons and testes. *PNAS* 103, 16346-16351.
- Stockley P, Gage MJ, Parker GA, Moller AP (1997) Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *The American Naturalist* 149, 933-954.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4d10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Wiens JJ, Reed Jr TW. 1995. Combining data sets with different numbers of taxa for phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 44: 548-549

Legends

Figure 1: Results from statistical analyses on the share of phylogeny, the share of mating system and the common share of phylogeny and mating system (monogamy or polygynandry) on morpho-anatomical features implied on reproduction (1.A), on nutrition (1.B) and on locomotion (1.C).

Histograms: morpho-anatomical characters according to the mating system; Grey=Monogamous Schistosomatidae, White= Polygynandrous Schistosomatidae. Camembert cheeses: share of phylogeny in white, share of the mating system in grey, common share in black. The P value of the shares evaluation appears under Camembert cheese.

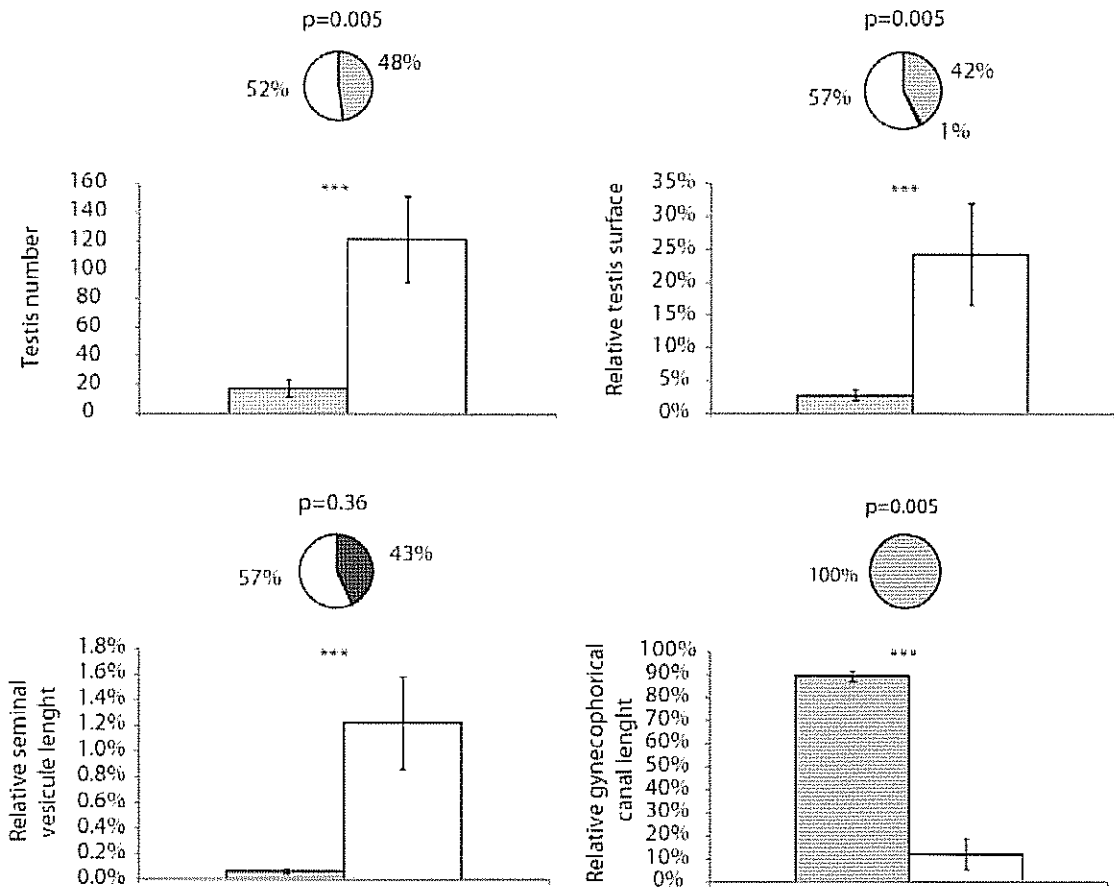
Supplementary table online: Morpho-anatomical features noticed for each Schistosomatidae species.

M for Monogamous; P for Polygynandrous; ND for Non Determined; NA for Non Available

Surface of each organ was calculated considering the length (l) and the width (w) of the organ in the ellipsis surface formula ($l*w*\pi/4$). Relative organ length is the length of the organ divided by the body length. Relative organ surface is the surface of the organ divided by the body surface.

Figure 1. A

Male morpho-anatomical features



Female morpho-anatomical features

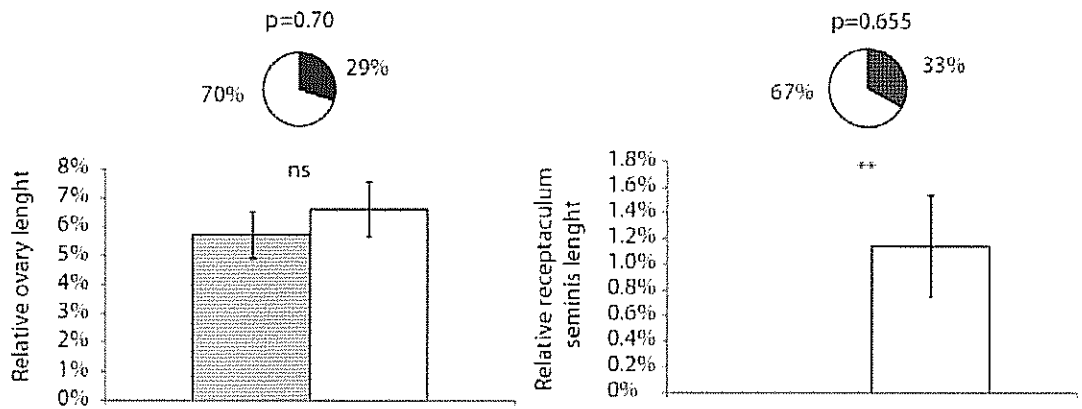
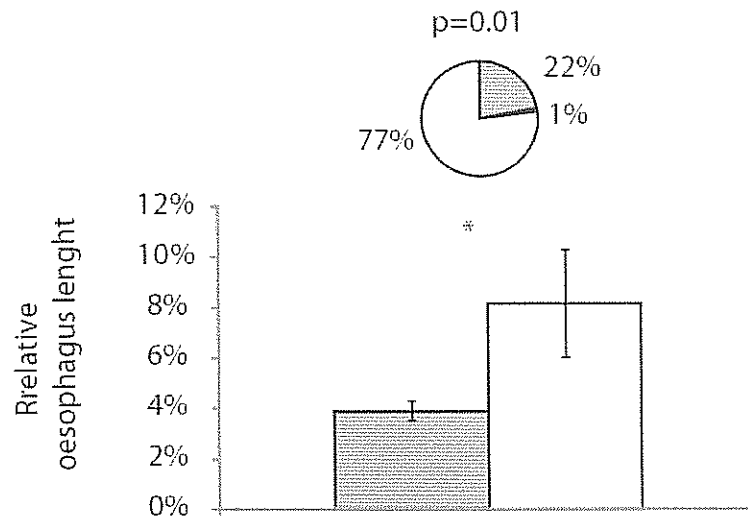


Figure 1. B

Male morpho-anatomical features



Female morpho-anatomical features

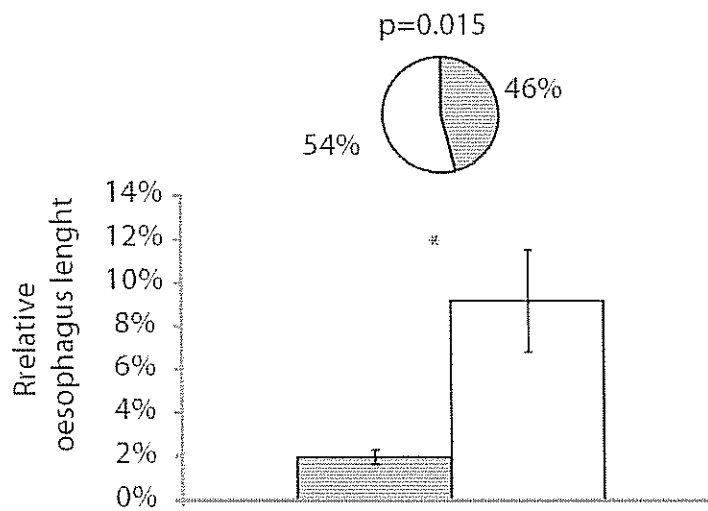
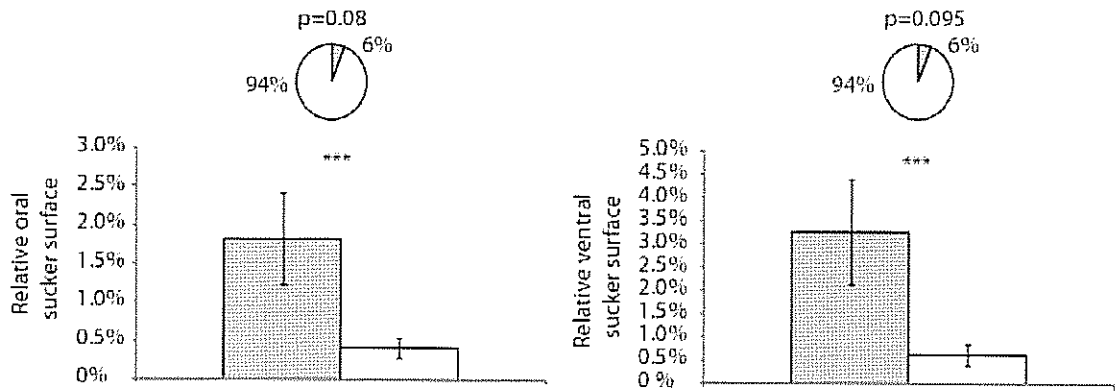
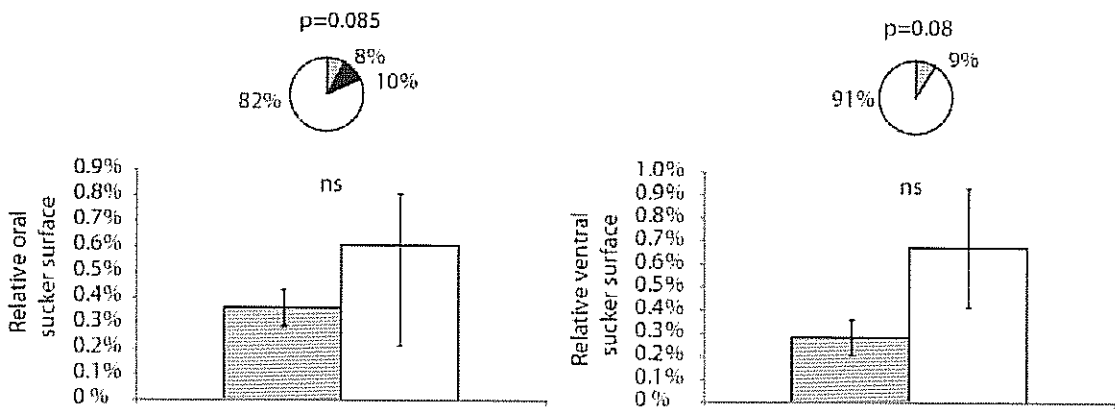


Figure 1. C

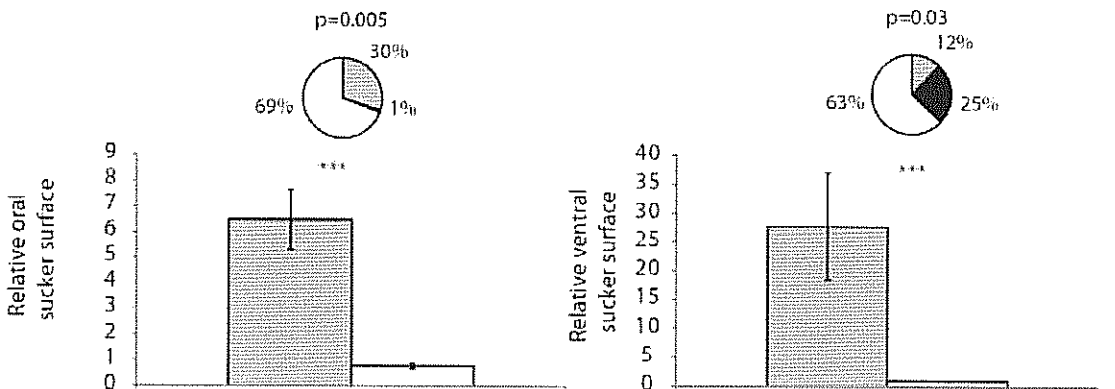
Male morpho-anatomical features



Female morpho-anatomical features



Male/female morpho-anatomical features ratio



Supplementary table online: Morpho-anatomical features noticed for each Schistosomatidae species.

Species number	Species name	Mating system	Reference	Male length (µm)	Male width (µm)	Male surface (µm ²)	Testis number	Testis length (µm)	Testis width (µm)	Testis surface
1	<i>Griphobilharzia imoena</i>	M	[1]	2487	167	326199	1	86	68	4593
2	<i>Ornithobilharzia canaliculata</i>	M	[2]	9700	700	5332854	86	90	90	547108
3	<i>Austrobilharzia terrigalenis</i>	M	[3]	3030	318	756763	23	31	31	17360
4	<i>Austrobilharzia variglandis</i>	M	[4]	5000	420	1649336	23	150	81	219480
5	<i>Bivitellobilharzia nairi</i>	M	[5]	16230	820	10452550	63	95	95	446558
6	<i>Schistosoma mekongi</i>	M	[6]	15000	410	4830199	7	105	95	54840
7	<i>Schistosoma bovis</i>	M	[7-8]	17000	1070	14286393	4	175	135	74220
8	<i>Schistosoma incognitum</i>	M	[9]	5800	296	1348372	6	80	60	22619
9	<i>Schistosoma sinensium</i>	M	[10]	3670	210	605306	6	73	47	16168
10	<i>Schistosoma malayensis</i>	M	[11]	6820	320	1714053	7	147	95	76777
11	<i>Schistosoma edvardiense</i>	M	[12]	4400	140	483805	4	60	40	7540
12	<i>Schistosoma guineensis</i>	M	[13]	11133	368	3217732	4	166	98	51107
13	<i>Schistosoma hippopotami</i>	M	[14]	5700	200	895354	4	ND	ND	ND
14	<i>Schistosoma curassoni</i>	M	[15]	13000	600	6126106	4	177	100	55606
15	<i>Schistosoma rodhaini</i>	M	[16]	6500	400	2042035	7	ND	ND	ND
16	<i>Schistosoma indicum</i>	M	[17]	11975	445	4185289	10	81.5	61.5	39366
17	<i>Schistosoma spindale</i>	M	[17]	9550	349	2617693	5	55	47	10151
18	<i>Schistosoma nasale</i>	M	[17]	8650	442.5	3006210	5	86.5	48.5	16474.71
19	<i>Orientobilharzia turkestanicum</i>	M	[17]	6100	525	2515238	79	22	26	35491
20	<i>Schistosomatium douthitti</i>	P	[18]	3073	335	808532	26	39	43	34245
21	<i>Bilharziella polonica</i>	P	[19]	3600	550	1555088	85	126	28	235525
22	<i>Trichobilharzia regenti</i>	P	[20]	11000	49	423330	120	39	28	102919
23	<i>Trichobilharzia ocellata</i>	P	[21]	2880	32	72382	67	16	30	25258
24	<i>Trichobilharzia szidati</i>	P	[22]	3050	34	81446	70	20	20	21991
25	<i>Trichobilharzia franki</i>	P	[23]	4400	126	435425	ND	ND	ND	ND
26	<i>Dendrobilharzia puberulenta</i>	P	[24]	6650	1010	5275127	135	106	71	797972
27	<i>Gigantobilharzia huonensis</i>	P	[25]	9600	54	407150	300	35	35	288634
28	<i>Allobilharzia visceralis</i>	P	[26]	25000	257	5046183	170	51	26	177044

Species number	Relative testis surface	Male oral sucker length (μm)	Male oral sucker sucker width (μm)	Male oral sucker surface (μm^2)	Male relative oral sucker surface	Male ventral sucker length (μm)	Male ventral sucker width (μm)	Male ventral sucker surface (μm^2)
1	1,41%	83	60	3911	1,20%	94	81	5980
2	10,26%	260	260	53093	1,00%	360	360	101788
3	2,29%	134	134	14103	1,86%	170	170	22698
4	13,31%	270	270	57256	3,47%	360	360	101788
5	4,27%	380	380	113411	1,09%	519	519	211556
6	1,14%	150	120	14137	0,29%	310	300	73042
7	0,52%	250	170	33379	0,23%	400	400	125664
8	1,68%	150	120	14137	1,05%	160	160	20106
9	2,67%	112	96	8445	1,40%	165	168	21771
10	4,48%	212	214	35632	2,08%	269	274	57889
11	1,56%	120	120	11310	2,34%	28	28	616
12	1,59%	213	213	35633	1,11%	271	271	57680
13	ND	370	370	107521	12,01%	510	510	204282
14	0,91%	240	240	45239	0,74%	440	440	152053
15	ND	50	50	1963	0,10%	250	250	49087,4
16	0,94%	236	180	33364	0,80%	278,5	278,5	60917
17	0,39%	256	233	46847	1,79%	268,5	198,5	41859,6
18	0,55%	177,5	210	29276	0,97%	277,5	277,5	60480,6
19	1,41%	214	180	30254	1,20%	240,5	236,5	44672
20	4,24%	109	105	8989	1,11%	135	135	14314
21	15,15%	124	136	13245	0,85%	174	174	23779
22	24,31%	37	30	872	0,21%	34	29	774
23	34,90%	22	16	276	0,38%	33	33	855
24	27,00%	28	18	396	0,49%	19	19	284
25	ND	64	56	2815	0,65%	49	63	2425
26	15,13%	absent	absent	0	0,00%	absent	absent	0
27	70,89%	absent	absent	0	0,00%	absent	absent	0
28	3,51%	57	48	2149	0,04%	107	95	7984

Species number	Male relative ventral sucker surface	Male oesophagus length (μm)	Male relative oesophagus length (μm)	Seminal vesicule length (μm)	Seminal vesicule width (μm)	Seminal vesicule surface (μm^2)	Relative seminal vesicule surface	Gynecophoral canal length (μm)
1	1,83%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1674
2	1,91%	470	4,85%	ND	ND	ND	ND	8639
3	3,00%	87,5	2,89%	ND	ND	ND	ND	2604
4	6,17%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4500
5	2,02%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1,51%	500	3,33%	ND	ND	ND	ND	14300
7	0,88%	360	2,12%	80	80	5027	0,04%	16200
8	1,49%	257	4,43%	39	26	796	0,06%	5000
9	3,60%	128	3,49%	44	22	760	0,13%	3505
10	3,38%	273	4,00%	50	66	2592	0,15%	6512
11	0,13%	300	6,82%	ND	ND	ND	ND	3680
12	1,79%	ND	ND	29	59	1344	0,04%	10133
13	22,82%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	2,48%	425	3,27%	ND	ND	ND	ND	12550
15	2,40%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	1,46%	ND	ND	63	40	1979	0,05%	11075
17	1,60%	316	3,31%	30	68	1602	0,06%	ND
18	2,01%	413,5	4,78%	32	32	804	0,03%	ND
19	1,78%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	1,77%	490	15,95%	83	125	8149	1,01%	1760
21	1,53%	484	13,44%	157	44	5426	0,35%	118
22	0,18%	265	2,41%	244	28	5366	1,27%	280
23	1,18%	295	10,24%	210	12	1979	2,73%	375
24	0,35%	ND	ND	12	200	1885	2,31%	220
25	0,56%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	0,00%	620	9,32%	290	90	20499	0,39%	0
27	0,00%	478	4,98%	750	28	16493	ND	1084
28	0,16%	240	0,96%	717	46	25904	0,51%	831

Species number	Relative gynecophoral canal length	Female length (μm)	Female width (μm)	Female surface (μm ²)	Receptaculum seminis length (μm)	Receptaculum seminis width (μm)	Receptaculum seminis surface (μm ²)	Relative receptaculum seminis	Female oral sucker length (μm)
1	67.31%	1440	120	135717	ND	ND	ND	ND	53
2	89.06%	5100	190	761051	ND	ND	ND	ND	36
3	85.94%	3180	126	314693	Present	Present	ND	ND	49
4	90.00%	5000	250	981748	ND	ND	ND	ND	90
5	ND	22700	483	8611184	Present	Present	ND	ND	147
6	95.33%	12000	230	2167699	ND	ND	ND	ND	30
7	95.29%	15200	170	2029469	Present	Present	ND	ND	40
8	86.21%	5720	110	494173	ND	ND	ND	ND	78
9	95.50%	4320	120	407150	0	0	0	0.00%	61
10	95.48%	9160	210	1510792	0	0	0	0.00%	72
11	83.64%	4200	47	155038	ND	ND	ND	ND	37.5
12	91.02%	11668	202	1851133	0	0	0	0.00%	41
13	ND	4100	100	322013	ND	ND	ND	ND	50
14	96.54%	15500	300	3652101	0	0	0	0.00%	55
15	ND	9750	200	1531526	ND	ND	ND	ND	52
16	92.48%	15675	193	2376045	0	0	0	0.00%	106.5
17	ND	11690	147.5	1354242	ND	ND	ND	ND	65
18	ND	9000	153	1081493	ND	ND	ND	ND	75
19	ND	5600	99	435425	ND	ND	ND	ND	62.5
20	57.27%	2480	134	261004	37	37	1075	0.41%	70
21	3.28%	2780	150	327511	111	37	3226	0.98%	73
22	2.55%	7110	62	346219	93	38	2776	0.80%	37
23	13.02%	2560	30	60319	72	10	565	0.94%	37
24	7.21%	3000	36	84823	170	13	1736	2.05%	28
25	ND	4400	126	435425	ND	ND	ND	ND	51
26	0.00%	6730	1000	5285730	200	90	14137	0.27%	0
27	11.29%	2900	51	116160	136	38	4059	3.49%	0
28	3.32%	25000	99	1943860	143	36	4043	0.21%	54

Species number	Female oral sucker width (µm)	Female oral sucker surface (µm ²)	Female relative oral sucker surface	Female ventral sucker length (µm)	Female ventral sucker width (µm)	Female ventral sucker surface (µm ²)	Female relative ventral sucker surface	Female oesophagus length (µm)
1	37	1540	1,13%	0	0	0	0,00%	ND
2	36	1018	0,13%	32	32	804	0,11%	144
3	49	1886	0,60%	45	45	1590	0,51%	118
4	90	6362	0,65%	120	120	11310	1,15%	ND
5	147	16972	0,20%	173	173	23506	0,27%	ND
6	30	707	0,03%	110	35	3024	0,14%	220
7	40	1257	0,06%	56	56	2463	0,12%	short
8	50	3063	0,62%	50	50	1963	0,40%	98,6
9	41	1964	0,48%	16	17	214	0,05%	51
10	49	2771	0,18%	18	22	311	0,02%	123
11	37,5	1104	0,71%	46,5	46,5	1698	1,10%	152,5
12	41	1320	0,07%	26	26	531	0,03%	ND
13	50	1963	0,61%	50	50	1963	0,61%	ND
14	55	2376	0,07%	92,5	92,5	6720	0,18%	200
15	52	2123,7	0,14%	50	50	1963,5	0,13%	ND
16	45	3764	0,16%	53	53	2206	0,09%	ND
17	45,5	2322,8	0,17%	42,5	16	534,1	0,04%	134
18	42,5	2503,5	0,23%	39,5	39,5	1225,4	0,11%	143
19	57	2798	0,64%	47	47	1735	0,40%	ND
20	65	3574	1,37%	76	76	4536	1,74%	166
21	73	4185	1,28%	82	101	6505	1,99%	380
22	30	872	0,25%	34	29	774	0,22%	242
23	30	872	1,45%	34	29	774	1,28%	272
24	18	396	0,47%	16	16	201	0,24%	ND
25	61	2443	0,56%	43	54	1824	0,42%	ND
26	0	0	0,00%	0	0	0	0,00%	690
27	0	0	0,00%	0	0	0	0,00%	549
28	44	1866	0,10%	72	67	3789	0,19%	186

Species number	Female relative oesophagus length (µm)	Ovary length (µm)	Relative ovary length (µm)
1	ND	102	7,08%
2	2,82%	ND	ND
3	3,71%	387,5	12,19%
4	ND	ND	ND
5	ND	2650	11,67%
6	1,83%	760	6,33%
7	ND	560	3,68%
8	1,72%	357	6,24%
9	1,18%	456	10,56%
10	1,34%	533	5,82%
11	3,63%	107	2,55%
12	ND	653	5,60%
13	ND	131	3,20%
14	1,29%	625	4,03%
15	ND	ND	ND
16	ND	463	2,95%
17	1,15%	386	3,30%
18	1,59%	195	2,17%
19	ND	257,5	4,60%
20	6,69%	225	9,07%
21	13,67%	184	6,62%
22	3,40%	317	4,46%
23	10,63%	195	7,62%
24	ND	340	11,33%
25	ND	ND	ND
26	10,25%	430	6,39%
27	18,93%	123	4,24%
28	0,74%	810	3,24%

References

[1-26]

1. Platt, T.R., et al., *Griphobilharzia amoena* N. Gen., N. Sp (Digenea: Schistosomatidae), a parasite of the freshwater crocodile *Crocodylus Johnstoni* (Reptilia: Crocodylia) from Australia, with the erection of a new subfamily, *Griphobilharziinae*. *Journal of Parasitology*, 1991. **77**: p. 65-68.
2. Witenber, G. and J. Lengy, *Redescription of Ornithobilharzia canaliculata* (Rud.) Odhner, with notes on classification of the genus *Ornithobilharzia* and the subfamily *Schistosomatinae* (Trematoda). *Israel Journal of Zoology*, 1967. **16**: p. 193-204.
3. Rohde, K., *The bird schistosome Austrobilharzia terrigalensis from the great barrier reef, Australia*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1977. **52**: p. 39-51.
4. Chu, G.W.T.C. and C.E. Cutress, *Austrobilharzia variglandis* (Miller and Northup, 1926) Penner, 1953, (Trematoda: Schistosomatidae) in Hawaii with notes in its biology. *Journal of Parasitology*, 1954. **40**: p. 515-524.
5. Sundaram, R.K., et al., *On Bivitellobilharzia nairi* (Mudaliar and Ramanujachari, 1945) Dutt and Srivastava, 1955 (Trematoda: Schistosomatidae) parasitic in indian elephants (*Elephas maximus*), with a redescription of the species. *Indian Veterinary Journal* 1972. **49**(1): p. 1-10.
6. Voge, M., D. Bruckner, and J.I. Bruce, *Schistosoma mekongi* sp. n. from man and animals, compared with four geographic strains of *Schistosoma japonicum*. *Journal of Parasitology*, 1978. **64**(4): p. 577-84.
7. Lengy, J., *Studies on Schistosoma bovis* (Sonsino, 1876) in Israel. *Bulletin of the Research Council of Israel*, 1962. **10E**: p. 1-36.
8. Khalil, M., *On the morphology of Schistosoma bovis*. *Journal of Helminthology*, 1924. **11**(2): p. 81-86.
9. Sinha, P.K. and H.D. Srivastava, *Studies on Schistosoma incognitum* Chandler, 1926. I. *On the synonymy and morphology of the blood-fluke*. *Parasitology*, 1956. **46**(1-2): p. 91-100.
10. Greer, G.J., V. Kitikoon, and C. Lohachit, *Morphology and life cycle of Schistosoma sinensium* Pao, 1959, from northwest Thailand. *Journal of Parasitology*, 1989. **75**(1): p. 98-101.
11. Greer, G.J., C.K. Ow-Yang, and H.S. Yong, *Schistosoma malayensis* n. sp.: a *Schistosoma japonicum*-complex schistosome from Peninsular Malaysia. *Journal of Parasitology*, 1988. **74**(3): p. 471-80.
12. Thurston, J.P., *Schistosomes from Hippopotamus amphibius* L. II. *The morphology of Schistosoma edwardiense* sp. nov. *Parasitology*, 1964. **54**: p. 67-72.
13. Combes, C. and J. Jourdane, *Taxonomie, écologie et évolution des métazoaires parasites. Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites. (Livre hommage à Louis Evr et). Volume 2. Etudes. Vol. 2. 2003, Perpignan: PUP.*
14. Thurston, J.P., *Schistosomes from Hippopotamus amphibius* L. I. *The morphology of Schistosoma hippopotami* sp. nov. *Parasitology*, 1963. **53**: p. 49-54.
15. Gretillat, S., *Etude du cycle évolutif du schistosome des ruminants domestiques de l'ouest africain et confirmation de l'espèce Schistosoma curassoni* Brumpt. 1931. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1962. **37**: p. 556-568.
16. Brumpt, E., *Description de deux bilharzies de mammifères africains : Schistosoma curassoni* sp. inq. et *S. rodhaini* n. sp. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1931. **9**: p. 325.

17. Chauhan, A.S., C.B. Srivastava, and B.S. Chaun, *Studies on the trematode fauna of India. Part 6. Digenea : Schistosomatidae. A monographic aid to the identification of indian schistosomes.* Journal of the Zoological Society of India, 1974. **25**(1/2): p. 83-127.
18. Price, E.W., *A synopsis of the trematode family Schistosomatidae with descriptions of new species.* Proceedings of the United States National Museum, 1929. **75**: p. 1-39.
19. Khalifa, R., *Studies on Schistosomatidae Looss, 1899 (Trematoda) of aquatic birds of Poland. 1. On the life cycle of Bilharziella polonica Kowalewski, 1895, with a discussion of the subfamily Bilharziellinae Price, 1929.* Acta Parasitologica Polonica, 1972. **20**(27): p. 343-365.
20. Horak, P., L. Kolarova, and J. Dvorak, *Trichobilharzia regenti n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe.* Parasite, 1998. **5**(4): p. 349-57.
21. Bourns, T.K.R., J.C. Ellis, and M.E. Rau, *Migration and development of Trichobilharzia ocellata (Trematoda : Schistosomatidae) in its duck hosts.* Canadian Journal of Zoology, 1973. **51**(10): p. 1021-1030.
22. Neuhaus, W., *Biology and development of Trichobilharzia szidati N. Sp. (Trematoda, Schistosomatidae), a parasite causing dermatitis in man.* Z Parasitenkd, 1952. **15**(3): p. 203-66.
23. Müller, V. and P. Kimmig, *Trichobilharzia franki n. sp. - Die Ursache für Badermatiden in südwestdeutschen Baggerseen.* Applied Parasitology, 1994. **35**: p. 12-31.
24. Ulmer, M.J. and F.J. Vande Vusse, *Morphology of Dendritobilharzia pulverulenta (Braun, 1901) Skrjabin, 1924 (Trematoda: Schistosomatidae) with notes on secondary hermaphroditism in males.* Journal of Parasitology, 1970. **56**(1): p. 67-74.
25. Najim, A.T., *Life history of Gigantobilharzia huronensis Najim, 1950. A dermatitis-producing bird blood-fluke (Trematoda-Schistosomatidae).* Parasitology, 1956. **46**: p. 443-469.
26. Kolarova, L., et al., *Allobilharzia visceralis gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae-Trematoda) from Cygnus cygnus (L.) (Anatidae).* Parasitology International, 2006. **55**(3): p. 179-86.

Chapitre II

Monogamie sociale et génétique chez *Schistosoma mansoni* ?



sal le bol, ja me casse...

°
FRO|SSARD

Chapitre II. Monogamie sociale et génétique chez *Schistosoma mansoni* ?

Quelques soient les causes évolutives ayant conduit à un tel régime d'appariement, *Schistosoma mansoni* est socialement monogame. Or la monogamie sociale, celle que nous devinons en observant le couple de schistosome (figure 2 Introduction), n'est pas forcément génétique (la descendance est, dans le cas de la monogamie génétique, uniquement issue d'un couple dit « fidèle ») et comme nous avons pu le préciser précédemment, les changements de partenaire ne sont pas rares dans le monde animal (cf. Introduction).

Pour étudier *in vivo* les changements de partenaire chez *Schistosoma mansoni*, il est nécessaire de réaliser une étape préliminaire de détermination du sexe et du profil génétique microsatellite (neutre) des populations clonales de cercaires (figure 6).

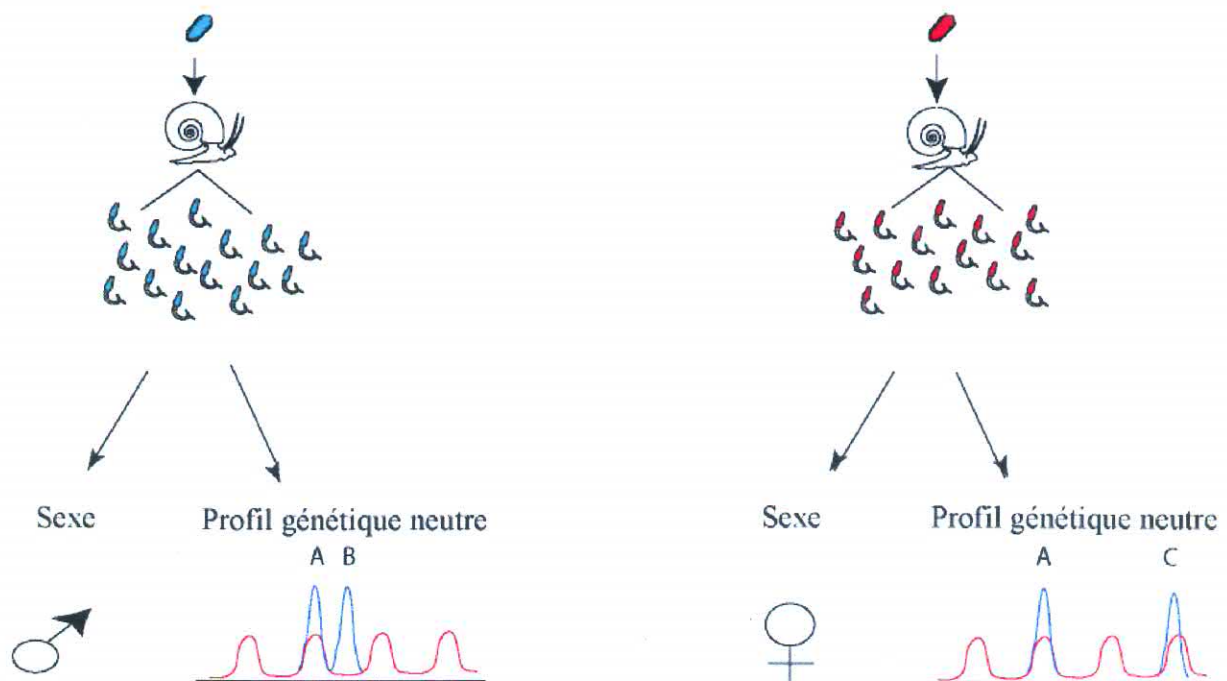


Figure 6: Schéma de l'étape préliminaire de sexage et de génotypage (profil génétique neutre) des populations clonales de cercaires

L'ensemble de la partie expérimentale utilise des populations clonales de cercaires émises par des mollusques monomiracidialement infestés : chaque mollusque contient un seul sexe et génotype du parasite. Nous avons mis au point une technique d'extraction d'ADN qui rend possible la détermination du profil génétique des populations clonales de cercaires en utilisant une seule cercaire (Beltran et al.,

2008b). Les cercaires ne présentent aucun dimorphisme sexuel visible, la seule méthode de sexage des individus est donc l'utilisation d'un marqueur moléculaire du sexe. Les schistosomes présentent une hétérogamétie femelle, c'est à dire que la femelle est hétérozygote ZW alors que le male est homozygote ZZ (Short, 1983). Ainsi, certains auteurs ont localisé des séquences spécifiques d'ADN, uniquement présentes sur le chromosome W des femelles (Webster et al., 1989). Parmi ces séquences, la séquence W1 est une séquence répétée qui permet de sexer ces parasites. D'autres séquences sexe-spécifiques ont récemment été mises en évidence par une approche comparative entre les génomes complets de mâle et de femelle, approche à laquelle j'ai eu l'occasion de participer. La publication est actuellement soumise (cf. Annexe 1) (Portela et al., 2009).

L'ensemble des expériences qui suivent respecte le schéma suivant (figure 7) :

1- Primo-infestation de souris, avec une population de cercaires mâles et une population de cercaires femelles dont les profils génétiques (microsatellites) sont connus. Lors de cette primo-infestation, un sexe est mis en excès afin de s'assurer que tous les individus du sexe opposé soient accouplés. En effet, chez les schistosomes, il n'existe jamais d'individus célibataires des deux sexes en même temps. En d'autre terme, si 10 mâles et 10 femelles sont présents, ils formeront 10 couples (cela est testé avec un lot contrôle de souris, primo-infestées mais non ré-infestées).

2- Ré-infestation des mêmes souris, avec une population clonale de cercaire du même sexe mais de profil génétique différent du parasite introduit en excès lors de la primo-infestation. Si, après complet développement de cette deuxième infestation, ces nouveaux individus sont retrouvés, accouplés avec des individus du sexe opposé de la primo-infestation, cela constituera un cas de changement de partenaire.

3- Récupération et typage génétique de tous les parasites du sexe en excès. Ce typage permet d'obtenir : le nombre d'individus célibataires et le nombre d'individus accouplés de la primo-infestation et de la ré-infestation.

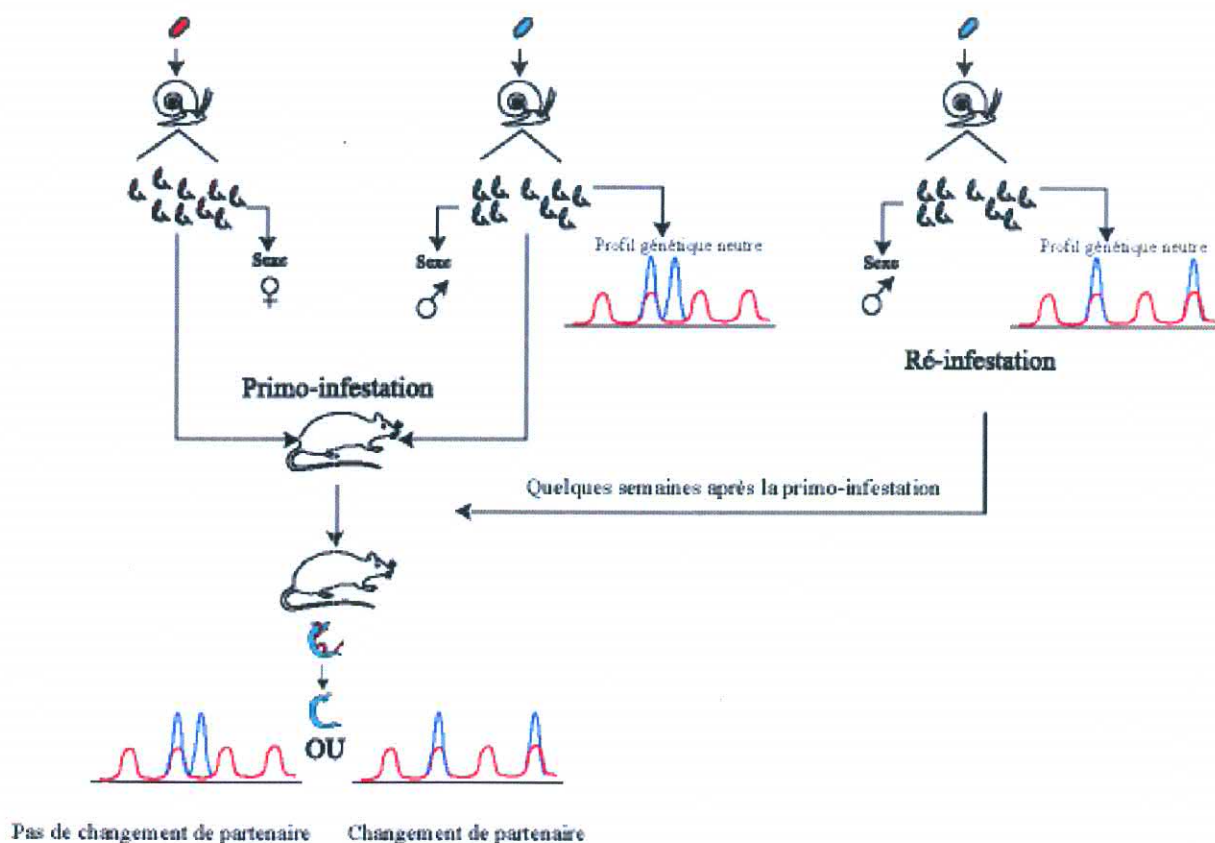


Figure 7: Schéma du protocole expérimental en condition d'excès de mâles. Le même protocole peut être réalisé en condition d'excès de femelles

Ce chapitre II comporte trois parties : trois articles publiés, précédés de leur résumé.

II.1. Publication: « Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages ». Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103, 501-503 (2008).

L'évaluation de la diversité génétique de parasite est essentielle pour comprendre les patterns de transmission de la maladie. Cette diversité génétique a très longtemps été évaluée sur le stade adulte du parasite (Theron et al., 2004), stade sur lequel l'extraction d'ADN ne pose aucun problème. Cependant, l'utilisation du stade adulte pour quantifier la diversité génétique du parasite n'est judicieuse que lorsque l'on s'intéresse à la diversité génétique de ces vers adultes dans un hôte rongeur naturellement infesté (Theron et al., 2004), il est alors possible de sacrifier l'hôte définitif, de récupérer directement les vers adultes et d'en extraire l'ADN. S'il est indispensable d'utiliser les vers adultes pour accéder à la diversité génétique du

parasite, le passage par des hôtes de laboratoire est nécessaire si l'on s'intéresse à la diversité génétique du parasite à l'intérieur de l'hôte humain (que l'on n'imagine mal sacrifier) (Brouwer et al., 2001; Curtis et al., 2002; Stohler et al., 2004) ou encore à l'intérieur du mollusque (Dabo et al., 1997; Eppert et al., 2002; Sire et al., 2001). Ce passage expérimental peut introduire un biais dans l'évaluation de la diversité génétique du parasite, biais dû à la pression de sélection exercée par les hôtes expérimentaux (Loverde et al., 1985) et/ou aux méthodes de maintien des souches de laboratoire (Theron et al., 2008). Afin d'éviter ce biais expérimental, des méthodes de génotypage sur stades larvaires de schistosome ont été récemment proposées (Gower et al., 2007; Shrivastava et al., 2005; Sorensen et al., 2006; Steinauer et al., 2008; Valentim et al., 2009).

La publication qui suit présente une nouvelle méthode d'extraction d'ADN efficace, permettant l'accès rapide, à faible coût, à la diversité génétique de tous les stades du parasite. Cette technique s'avère plus « puissante » que celles récemment développées, rendant possible 60 000 réactions d'extractions d'ADN pour un euro, quelque soit le stade du parasite, et en un temps record (seulement 15 minutes d'incubation et 5 étapes de manipulation). 40 µL de produit d'ADN sont obtenus en fin d'extraction permettant, d'après notre protocole PCR, l'amplification de 40 marqueurs microsatellites pour un seul individu extrait. Depuis, nous avons optimisé cette technique en diluant au 20^{ème} l'ADN extrait. Ainsi le passage d'un plus grand nombre de marqueurs moléculaires sur un seul individu peut être envisagé.

A l'aide de cette nouvelle technique d'extraction d'ADN sur stade larvaire (Beltran et al., 2008b) et l'utilisation de marqueurs microsatellites neutres, il est possible de proposer différents mâles à une femelle et/ou différentes femelles à un mâle dans les différents protocoles de test de changements de partenaire (Beltran and Boissier, 2009a; Beltran et al., 2008a) et d'analyser la descendance des couples (Beltran and Boissier, 2009a).

Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages

S Beltran, R Galinier, JF Allienne, J Boissier/*

UMR 5244 CNRS-EPHE, Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, Biologie et Ecologie Tropical et Méditerranéenne, Université de Perpignan Via Domitia, 52 Av. Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

Schistosomes are endoparasites causing a serious human disease called schistosomiasis. The quantification of parasite genetic diversity is an essential component to understand the schistosomiasis epidemiology and disease transmission patterns. In this paper, we propose a novel assay for a rapid, low costly and efficient DNA extraction method of egg, larval and adult stages of Schistosoma mansoni. One euro makes possible to perform 60,000 DNA extraction reactions at top speed (only 15 min of incubation and 5 handling steps).

Key words: *Schistosoma mansoni* - DNA extraction - microsatellites

Schistosomes (Platyhelminth, Digenea) are endoparasites causing a serious human disease called schistosomiasis. Schistosomiasis ranks second only to malaria in terms of parasite-induced human morbidity and mortality, with more than 200 million people infected (Crompton 1999, Chitsulo et al. 2000). The quantification of parasite genetic diversity is an essential component to understand schistosomiasis epidemiology and disease transmission patterns. This genetic diversity could be assessed either at the adult stage (Theron et al. 2004) or, more recently, at the larval stage (Shrivastava et al. 2005, Sorensen et al. 2006). The use of adult worms to quantify the genetic diversity in the definitive host is only relevant when worms can be directly recovered from naturally infected rodents (Theron et al. 2004). The quantification of parasite genetic diversity from intra-human (Brouwer et al. 2001, Curtis et al. 2002, Stohler et al. 2004) or intra-mollusk stages (Dabo et al. 1997, Eppert et al. 2002, Sire et al. 2001) requires a long time for a passaging through experimental hosts. However, mollusk or vertebrate experimental host may induce a bias due to this host selective pressure. Indeed, such laboratory passage may be predicted to result in genetic bottlenecking of the parasite population and impose selection pressures not encountered in field conditions. Firstly, exposure of individual snails to single miracidia results in only 5-50% of successful infections, depending on the parasite strain used (Theron et al. 1997), thus between 50% and 95% of the parasite genetic diversity is lost. Secondly, as far as the vertebrate host is concerned, it has been shown that passaging through experimental models decreases the parasite genetic diversity in comparison to

field isolates (Loverde et al. 1985). To circumvent ethical, technical and epidemiological disadvantages of the use of experimental hosts, methods for genotyping larvae have been recently proposed (Shrivastava et al. 2005, Sorensen et al. 2006). Due to their small size (450 µm for cercariae and 150 µm for miracidia), the main technical limitations of these studies were the available quantity of DNA to perform PCR amplifications. In 2005, Shrivastava et al. proposed a DNA extraction protocol allowing sufficient DNA for only one PCR reaction by larvae, thus for only one locus analyses. In 2006, Sorensen et al. proposed a more complex protocol, only tested on eggs and that required liquid nitrogen to disrupt the eggshell by heat shock and Instagen Matrix (Bio-Rad) to capture DNA. This last protocol permits multi-locus analyses but it requires a particular material and finally, the resulting analysis have been performed only on eggs. In this paper, we propose a novel assay for a very rapid, very low costly and efficient DNA extraction method of adult and free larval stages from individual *Schistosoma mansoni*.

To investigate the efficiency of the method, we have performed DNA extraction of individual schistosome from all life cycle stages (except intra-mollusk stages) and used five microsatellite markers of various sizes (i) on 10 individual eggs derived from faeces of infected mice, (ii) on 10 individual miracidia obtained from eggs purified from the livers of infected mice, (iii) on 10 individual cercariae derived from monomiracidially infected mollusks, (iv) and finally, on 10 adults obtained from infected mice.

The *S. mansoni* strain was isolated from naturally infected mollusks collected in Guadeloupe (French West Indies) in December 2002. The intermediate host used was a Guadeloupean strain of *Biomphalaria glabrata* and the definitive host was the Swiss OF1 mouse strain. Detailed methods for the mollusk and mouse infections were previously described (Boissier & Moné 2000). *S. mansoni* eggs were recovered from faeces of two experimentally infected mice: 10 eggs were individually isolated in 5 µl of NaCl 8% and transferred in a PCR reaction tube using a 20 µl micropipette. Miracidia were hatched from eggs purified from the liver of one infected mouse;

Financial support: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, CNRS

* Corresponding author: boissier@univ-perp.fr

Received 18 September 2007

Accepted 28 July 2008

10 miracidia were individually isolated in 5 µl of spring water and transferred in a PCR reaction tube using a 20 µl micropipette. Mollusks were individually exposed to individual miracidium which all originated from the same mouse. Five weeks later, mollusks were individually placed in spring water and exposed to artificial light to stimulate cercarial release; 10 cercariae derived from mollusks were individually isolated in 5 µl of purified spring water and transferred in a PCR reaction tube using a 20 µl micropipette. The presence of only one egg, one miracidium or one cercariae in each respective tube was checked under a binocular microscope. One mouse was infected using 120 cercariae. Seven weeks later, the mouse was sacrificed and 10 worms were recovered and individually isolated.

The same DNA extraction procedure was used, for either adult or larval stages. Before DNA extraction, individual eggs, miracidium, cercariae or adult worms were individually vacuum-dried for 15 min in a Speedvac evaporator. Next, 20 µl of NaOH (250 mM) was added to each tube. After a 15 min incubation period at 25°C, the tubes were heated at 99°C for 2 min. Then, 10 µl HCl (250 mM), 5 µl of Tris-HCl (500 mM) and 5 µl Triton X-100 (2%) were added and a second heat shock at 99°C for 2 min was performed. The products were stored at -20°C. The PCR amplifications were performed in duplicate using five microsatellite markers (Table I). The PCR reactions were carried out in a total volume of 20 µl containing 4 µl of 5X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0 at 25°C, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 0.2 µM of each oligonucleotide primer, 200 µM of each dNTP (Promega), 1 unit of GoTaq polymerase (Promega, Madison, Wisconsin), 1 µl of extracted DNA and DNase-free water q.s.p. 20 µl. The PCR programme consisted in an initial denaturation phase at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, annealing temperature for 20 s

(Table I), 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 10 min in a thermocycler (Bio-Rad, Hercules, USA). For each marker, the forward PCR primer was 5' fluorescein labelled (Prologo, Cambridge, UK) allowing a precise analysis in an automated DNA sequencer. The microsatellite PCR products were diluted in sample loading solution (Beckman Coulter, Villepinte, France) with a red labeled size standard (CEQ™ DNA size standard kit, 400 Beckman Coulter), and electrophoresed using an automatic sequencer (CEQ™ 8000, Beckman Coulter) with CEQ™ 8000 sequence analysis software. The sizes of the alleles were calculated with the fragment analyzer package.

From the 10 eggs, we obtained, during the first amplification, 52% of success. A second amplification on the same extracted DNA gave 92% of success. From the 10 miracidia, we obtained, during the first amplification, 90% of success. A second amplification on the same extracted DNA gave 100% of success. From the 10 cercariae, during the first PCR amplifications performed, we obtained 98% of success. A second amplification of the same extracted DNA gave 100% of success. From the 10 adults, during the first PCR amplifications performed, we obtained 98% of success. A second amplification of the same extracted DNA gave 100% of success. The amplification failures were independent from the locus tested. Furthermore, it is likely that 100% of DNA had been extracted because after one or two PCR reactions, all expected PCR products gave at least one result in one microsatellite marker. DNA extraction methods are generally complex and time consuming, or quick and usually more expensive due to the use of commercial kits. Table II shows a comparison between our method and the two previous ones (Shrivastava et al. 2005, Sorensen et al. 2006). Our DNA extraction protocol is efficient on all parasite stages and makes it possible to obtain an ex-

TABLE I
Microsatellite markers used to test the extraction procedure

Locus	Genbank accession number	Annealing temperature	Amplicon size (bp)	Alleles detected n	Reference
SMD011	AF325698	60°C	351-383	7	Curtis et al. (2001)
SMC1	AF325694	56°C	287-303	5	Curtis et al. (2001)
SMD57	AF202967	52,5°C	278-300	11	Durand et al. (2000)
R95529	R95529	52,5°C	229-274	3	Durand et al. (2000)
SMBR16	LO4480	59,5°C	337-341	4	Rodriguez et al. (2007)

TABLE II
Comparison of *Schistosoma mansoni* DNA extraction procedures

Protocol	References		
	Sorensen et al. (2006)	Shrivastava et al. (2005)	Present study
Tested parasite stages	egg	miracidium, cercaria	egg, miracidium, cercaria, adult
Incubation time	20 min	2:25 h	15 min
Number of steps	8	6	5
Number of reactions with 1 euro	7	300	60.000
Number of allowed PCR reactions	25	1	40

tracted DNA for PCR amplification at top speed (15 min incubation), with few handling steps (5) and at a very low cost (1 euro is sufficient to perform more than 60,000 DNA extraction reactions). This extraction procedure yields 40 µl of DNA from individual egg, miracidium, cercaria or adult that allows for 40 PCR amplifications, according to our protocol. This method could be performed in 96-well microplates allowing several hundreds DNA extractions in one hour.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Valérie Bech, for reading the manuscript and helpful comments, and Bernard Dejean and Pierre Tisseyre, for technical assistance. The experiments comply with the current French laws.

REFERENCES

- Boissier J, Moué H 2000. Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121: 379-383.
- Brouwer KC, Ndhlovu P, Munatsi A, Shiff CJ 2001. Genetic diversity of a population of *Schistosoma haematobium* derived from schoolchildren in east central Zimbabwe. *J Parasitol* 87: 762-769.
- Chitsulo L, Engels D, Moutressor A, Savioli L 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 77: 41-51.
- Crompton DWT 1999. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol* 85: 397-403.
- Curtis J, Sorensen RE, Kristen Page L, Minchella DJ 2001. Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for other schistosome species. *Mol Ecol Notes* 1: 143-145.
- Curtis J, Sorensen RE, Minchella DJ 2002. Schistosome genetic diversity: the implications of population structure as detected with microsatellite markers. *Parasitology* 125 (Suppl.): S51-S59.
- Dabo A, Durand P, Morand S, Diakite M, Langand J, Imbert-Establet D, Doumbo O, Jourdaue J 1997. Distribution and genetic diversity of *Schistosoma haematobium* within its bulinid intermediate hosts in Mali. *Acta Trop* 66: 15-26.
- Durand P, Sire C, Theron A 2000. Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. *Mol Ecol* 9: 997-998.
- Eppert A, Lewis FA, Grzywnac C, Coura-Filho P, Caldas I, Minchella DJ 2002. Distribution of schistosome infections in molluscan hosts at different levels of parasite prevalence. *J Parasitol* 88: 232-236.
- Loverde PT, De Wald J, Minchella DJ, Bosshardt SC, Damian RT 1985. Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 71: 297-301.
- Rodrigues NB, Silvia MR, Pucci MM, Minchella DJ, Sorensen R, Loverde PT, Romanha AJ, Oliveira G 2007. Microsatellite-enriched genomic libraries as a source of polymorphic loci for *Schistosoma mansoni*. *Mol Ecol Notes* 7: 263-265.
- Shrivastava J, Gower CM, Balolong EJ, Wang TP, Qian BZ, Webster JP 2005. Population genetics of multi-host parasites—the case for molecular epidemiological studies of *Schistosoma japonicum* using larval stages from naturally infected hosts. *Parasitology* 131: 617-626.
- Sire C, Langand J, Barral V, Theron A 2001. Parasite (*Schistosoma mansoni*) and host (*Biomphalaria glabrata*) genetic diversity: population structure in a fragmented landscape. *Parasitology* 122: 545-554.
- Sorensen RE, Rodrigues NB, Oliveira G, Romanha AJ, Minchella DJ 2006. Genetic filtering and optimal sampling of *Schistosoma mansoni* populations. *Parasitology* 133: 443-451.
- Stohler RA, Curtis J, Minchella DJ 2004. A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 34: 595-601.
- Theron A, Pages JR, Rognon A 1997. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Exp Parasitol* 85: 1-9.
- Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P 2004. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology* 129: 571-585.

II. 2. Publication : « Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes » Plos One, 3, e3328. doi:10.1371/journal.pone.0003328 (2008).

D'après la théorie de la sélection sexuelle, les mâles entrent en compétition pour être choisis par les femelles. Cependant, une inversion des rôles peut être observée chez certaines espèces ou chez certaines populations de certaines espèces, les femelles entrant par exemple en compétition pour être choisies par les mâles (Gwynne, 1991; Matsumoto and Yanagisawa, 2001). Pour tenter de comprendre, chez le schistosome, le « rôle » de chacun des sexes en terme de sélection sexuelle, nous utilisons expérimentalement le changement de partenaire, critère pouvant être considéré comme un second choix (Choudhury, 1995).

Nous proposons dans la première expérience de cette publication, plusieurs mâles à une femelle et plusieurs femelles à un mâle. Ce dernier cas est improbable en milieu naturel car les schistosomes présentent un biais de sex-ratio en faveur des mâles (cf. Chap. III). Cependant, cette expérience permet de manipuler les deux sexes indépendamment et donc de mieux comprendre le « rôle » de chacun des sexes. Un changement de partenaire significativement plus fréquent est observé lorsque différents mâles sont proposés à une femelle (33% à 50% de changements de partenaire) qu'inversement, lorsque plusieurs femelles sont proposées à un mâle (0% à 10% de changements de partenaire). Même si des changements de partenaire sont observés lorsque plusieurs femelles sont proposées à un mâle, ce résultat va dans le sens attendu par la théorie de la sélection sexuelle, les mâles entrant potentiellement en compétition pour être choisis par les femelles.

Des études corrélationnelles suggèrent que l'hétérozygotie des mâles et la similarité génétique entre les membres du couple sont deux facteurs qui peuvent influencer les femelles dans leur choix pour leur partenaire sexuel. En effet, concernant l'hypothèse d'hétérozygotie, la femelle devrait préférer un mâle présentant une plus forte hétérozygotie car cela lui permettrait d'obtenir une descendance plus hétérozygote donc possédant une meilleure valeur sélective par rapport à ce qu'elle obtiendrait d'un accouplement aléatoire (Brown, 1997; Weatherhead et al., 1999). L'expression de la vigueur, de l'ornementation, de la symétrie des mâles... pourrait être, dans ce cas, un reflet direct, non pas de bons gènes, mais de l'hétérozygotie individuelle sur un locus clé ou sur plusieurs loci (Brown, 1997). Concernant la similarité génétique,

une hypothèse prédit qu'une femelle devrait préférer s'accoupler avec un mâle qui présente une forte dissimilarité génétique par rapport à elle afin d'augmenter l'hétérozygotie de sa descendance. Contrairement à la première hypothèse, celle-ci tient compte du génotype du mâle et de celui de la femelle (Tregenza and Wedell, 2000). Si l'effet de l'hétérozygotie des mâles et de la similarité génétique entre les membres du couple sur le choix du partenaire sexuel a été mis en évidence, l'influence de ces deux facteurs a souvent été testée indépendamment (Roberts et al., 2006). La possibilité qu'ils (hétérozygotie et similarité) soient confondus a ainsi rarement été prise en compte, si ce n'est par une approche corrélative (Roberts et al., 2006). Dans tous les cas, aucune approche expérimentale n'a jamais testé cette possibilité.

Dans cette publication, nous tentons, dans une deuxième expérience, de déterminer expérimentalement l'influence de la similarité génétique (en utilisant le coefficient de similarité génétique « r » de Wang (Wang, 2002)) et de l'hétérozygotie sur les changements de partenaire chez *Schistosoma mansoni*. A partir des résultats expérimentaux de la première expérience, nous proposons ainsi différents mâles à une femelle dans nos différents réplicats. Concernant l'hétérozygotie propre aux mâles proposés, il semblerait que la femelle ne change pas plus de partenaire pour un mâle plus hétérozygote que ne l'est le partenaire initial. Par contre, le taux de changements de partenaire augmente significativement lorsqu'il est donné à la femelle l'opportunité de changer de partenaire pour un mâle plus dissimilaire à elle d'un point de vue génétique que ne l'est le partenaire initial. Dans cette étude, la densité en prétendants mâles disponibles (et donc la compétition entre mâles) a un effet mineur sur ces changements de partenaire.

Les changements de partenaire, associés à la préférence de la femelle pour un mâle plus dissimilaire à elle que ne l'est le partenaire initial, pourraient optimiser l'hétérozygotie de la descendance. La diversité génétique étant un facteur clé dans les interactions « hôte-parasite », ce changement de partenaire pourrait être considéré comme un facteur adaptatif jouant un rôle dans la « course aux armements » entre le schistosome et son hôte (Dawkins and Krebs, 1979).

Genetic Dissimilarity between Mates, but Not Male Heterozygosity, Influences Divorce in Schistosomes

Sophie Beltran¹, Frank Cézilly², Jérôme Boissier^{1*}

1 Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, Université de Perpignan, Perpignan, France, **2** Equipe Ecologie Evolutive, UMR CNRS 5561 Biogéosciences, Université de Bourgogne, Dijon, France

Abstract

Background: Correlational studies strongly suggest that both genetic similarity and heterozygosity can influence female mate choice. However, the influence of each variable has usually been tested independently, although similarity and heterozygosity might be correlated. We experimentally determined the relative influence of genetic similarity and heterozygosity in divorce and re-mating in the monogamous endoparasite *Schistosoma mansoni*.

Methodology/Principal Findings: We performed sequential infections of vertebrate hosts with controlled larval populations of parasites, where sex and individual genetic diversity and similarity were predetermined before infection. Divorce rate increased significantly when females were given the opportunity to increase genetic dissimilarity through re-mating with a new partner, independently of the intensity of male-male competition. We found however no evidence for females attempting to maximize the level of heterozygosity of their reproductive partner through divorce.

Conclusions/Significance: Female preference for genetically dissimilar males should result in more heterozygous offspring. Because genetic heterozygosity might partly determine the ability of parasites to counter host resistance, adaptive divorce could be an important factor in the evolutionary arms race between schistosomes and their hosts.

Citation: Beltran S, Cézilly F, Boissier J (2008) Genetic Dissimilarity between Mates, but Not Male Heterozygosity, Influences Divorce in Schistosomes. PLoS ONE 3(10): e3328. doi:10.1371/journal.pone.0003328

Editor: Robert Brooks, The University of New South Wales, Australia

Received: June 4, 2008; **Accepted:** September 4, 2008; **Published:** October 8, 2008

Copyright: © 2008 Beltran et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported financially by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS and the Agence Nationale de la Recherche (Program Monogamix).

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

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

Introduction

Both heterozygosity and genetic similarity have been predicted to influence female mate preferences. According to the good-genes-as-heterozygosity hypothesis [1,2], females should choose mates with a high level of overall heterozygosity. Mating with such males would be beneficial for females because highly heterozygous males should produce offspring which are more heterozygous than the offspring of males chosen at random. This hypothesis predicts that given a choice between two males, females should prefer the more heterozygous one. Alternatively, the disassortative mating hypothesis [3] states that females should prefer to mate with genetically dissimilar males in order to produce offspring with high levels of heterozygosity. This hypothesis differs from the previous one in emphasizing the importance of male and female genotypes in determining offspring fitness. The disassortative mating hypothesis predicts that given a choice between two males, females should choose the one which is the most genetically dissimilar to themselves. Although these hypotheses have attracted a large attention, most studies to date are correlational, tend to focus on one effect in isolation, and are biased towards vertebrate species. Recent evidence for an inter-correlation between these two forms of genetic quality [4] suggests however that both kinds of effect should be simultaneously studied in analyses of mate choice [5–7].

Direct evidence of adaptive female mate choice based on genetic quality can be difficult to obtain. First, evidence for an

effect of genetic quality on mate choice critically depends on the availability of a sufficient number of genetic markers [8], as a large number of loci is likely to give more accurate estimates of genome-wide individual heterozygosity and genetic dissimilarity between mates [9]. Second, evidence for adaptive mate choice critically relies on the possibility of complete sampling of all mating alternatives, what is often difficult to obtain in the field. Studies of re-mating provide an interesting alternative, however [10]. Divorce can be considered as an extension of mate choice after initial pairing [11], and comparisons between the qualities of old and new mates may then provide a reliable cue as to which factor influences mate choice. Although a large literature exists on divorce in monogamous bird species [12,13,14], little is known about the causes and consequences of divorce in other monogamous species, especially among invertebrates.

We investigated the influence of genetic dissimilarity and heterozygosity on re-mating in the endoparasite *Schistosoma mansoni*. *S. mansoni* is unique in the sense that it uses both sexual reproduction in the vertebrate definitive host and asexual multiplication in the mollusc intermediate host. The sexual reproduction ensures the production of new genotypes, whereas the asexual multiplication enables genotype proliferation (i.e. clonal expansion). We were therefore able to perform experimental infections of vertebrate hosts with controlled clonal populations, with sex and individual genetic diversity being predetermined before infection.

Schistosomes are an ideal biological model to test the influence of genetic quality on re-mating. Indeed, the mating system of *Schistosoma mansoni* is best described as sequential monogamy [15,16]. Pairs form in the vertebrate definitive host, with the muscular male keeping its thin female in a groove on its ventral side called the gynaecophoral canal (Fig. 1). Divorce has been previously observed in *S. mansoni* [15], although its functional significance remains elusive.

Results

Experiment 1

Previous studies have shown that divorce regularly occurs in *S. mansoni*, but did not provide any information about the proximate factors promoting divorce. One important factor might be the male-biased sex ratio that is typically observed in schistosome infrapopulations [17]. A male-biased sex ratio may promote male-male competition and, hence, “forced” divorce, i.e. displacement of a paired male by an unpaired rival [11,12,13], but also favour female choice of a better mating option [11,12,19]. Likewise, divorce might also be facilitated by a female-biased sex-ratio (although this is unlikely to occur under natural conditions) through female-female competition and/or males abandoning their current mate for a better mating option. We therefore conducted a first series of experiments to assess whether divorce rate was equally likely to occur whether the sex-ratio was male- or female-biased.

To that end, we performed multiple infections of definitive hosts with a first infection using parasites of both sexes followed by either male or female re-infection. Divorce rate per host ranged between

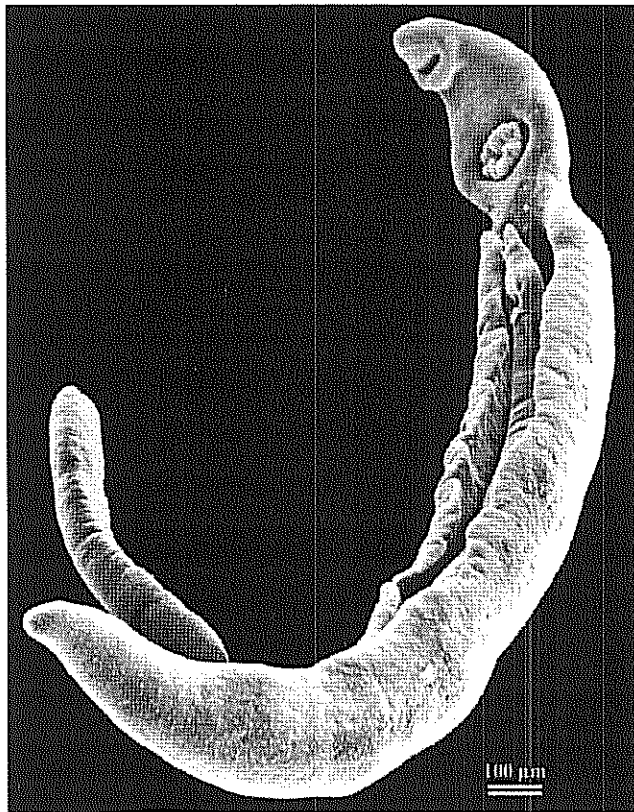


Figure 1. A schistosome pair, with the thin female located in the male gynaecophoral canal.
doi:10.1371/journal.pone.0003328.g001

33% and 50% when mice were re-infected with males (experiment 1a), whereas it varied between 0% and 11% when mice were re-infected with females (experiment 1b) (permutation test for two independent samples, $m=n=4$, $P=0.0143$). After correcting for the numerical ‘pressure’ (i.e. the male-male or female-female competition measured as the number of individuals introduced during the second infection divided by the number of individual of the same sex introduced on the first one), divorce rate per host ranged between 10% and 20% when mice were re-infected with males (experiment 1a) whereas it varied between 0% and 9% when mice were re-infected with females (experiment 1b). However, the difference between the two treatments remained significant after correcting for the numerical ‘pressure’ (Fig. 2; permutation test for two independent samples, $m=n=4$, $P=0.0143$).

Experiment 2

A second series of multiple infections, following the same procedure as the used in experiment 1 and using a single different clonal population for each sex, was performed to assess the relative influence of both male heterozygosity and genetic dissimilarity between mates on divorce rate. Given the results obtained in the first series of experiments, we used a male-biased sex ratio (experiment 1a), thus providing females with opportunities to re-mate with newcomers male of a different genotype than that of their first mate. For each combination of one female and one male clonal population, two or three different male genotypes were independently offered as alternative mating options. Newcomer males could be either less or more heterozygous and less or more genetically dissimilar to females than their first mates.

Overall, five different female clones and nine different male clones were used in the experiments (Table 1). ΔD varied between -0.60 to 0.88 , while ΔH varied between -42% to $+33\%$. Divorce rate, corrected by the intensity of male-male competition, ranged from 0 to 29% (Fig. 3), and differed significantly between tests (logistic regression, $\chi^2=98.11$, d.f. = 11, $P<0.0001$). Results from

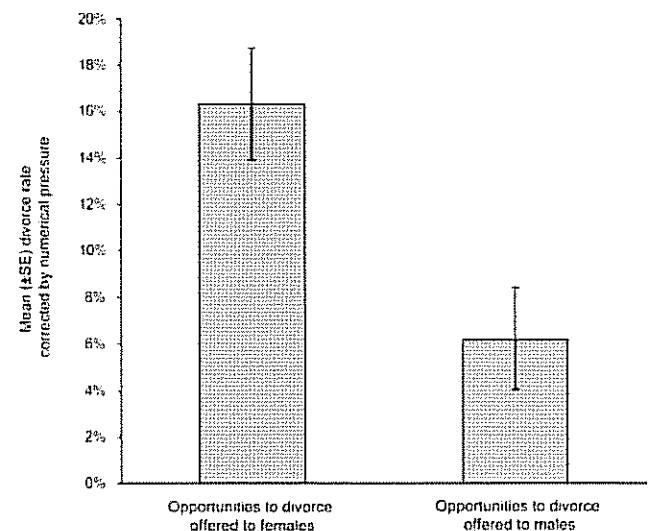


Figure 2. Differences in mean divorce rate corrected by numerical ‘pressure’ (\pm SE), according to which sex is given opportunities to divorce. The numerical ‘pressure’ is measured as the number of individuals introduced during the second infection divided by the number of individual of the same sex introduced on the first one.
doi:10.1371/journal.pone.0003328.g002

Table 1. Experimental protocol used in tests of divorce.

	First male heterozygosity	Newcomer male heterozygosity	ΔH	Genetic similarity between the female and the first male	Genetic similarity between the female and the newcomer male	ΔD	Number of replicates
Female 1	0.58	0.70	0.12	0.394	0.763	-0.369	4
	0.58	0.55	-0.03	0.394	-0.169	0.563	4
Female 2	0.42	0.63	0.21	0.235	0.075	0.160	4
	0.42	0.55	0.13	0.235	-0.094	0.329	4
	0.42	0.75	0.33	0.235	-0.645	0.880	4
Female 3	0.55	0.67	0.12	-0.094	-0.543	0.449	3*
	0.55	0.83	0.28	-0.094	0.056	-0.150	4
	0.55	0.70	0.15	-0.094	0.235	-0.329	3*
Female 4	0.63	0.83	0.20	-0.135	0.049	-0.184	4
	0.63	0.42	-0.21	-0.135	-0.443	0.308	4
Female 5	0.83	0.42	-0.42	-0.288	0.212	-0.500	4
	0.83	0.42	-0.42	-0.288	0.309	-0.597	3*

Male heterozygosity was calculated for each clone as the number of heterozygous loci divided by the total number of loci. Genetic similarity was estimated using the r coefficient of Wang [20]. ΔH represents the difference between the heterozygosity of the newcomer male and the heterozygosity of the first male. ΔD represents the difference between the genetic similarity between the first male and the female and the genetic similarity between the newcomer male and the female.

* indicates that one mouse died before the end of the experiment.

doi:10.1371/journal.pone.0003328.t001

a logistic regression indicated that genetic dissimilarity had the larger influence on divorce rate ($\chi^2 = 24.79$, d.f. = 1, $p < 0.0001$), whereas the intensity of male-male competition ($\chi^2 = 5.44$, d.f. = 1, $p = 0.020$) and female clone ($\chi^2 = 10.16$, d.f. = 4, $p = 0.038$) had only a marginal effect. By contrast, male heterozygosity had no significant influence on divorce rate ($\chi^2 = 0.64$, d.f. = 1, $p = 0.424$). Overall, females were more likely to switch mates when the newcomer male was more dissimilar to themselves than their first mate. When ΔD was positive, the mean divorce frequency corrected by the intensity of male-male competition ($20.2\% \pm 4.3\%$) was about ten times higher than for negative values of ΔD ($2.11\% \pm 0.9\%$).

Discussion

Male and female schistosomes were assumed to form stable monogamous pairs until it was shown that divorce could occur among pairs of *S. mansoni* in vivo [15]. However, until now, the adaptive function of divorce in schistosomes remained elusive. Only a few studies have used molecular markers to infer mating patterns in parasite species [21]. Although it has been suggested that *S. mansoni* paired randomly according to their genetic relatedness [22], the empirical evidence was based on paired individuals recovered from only three rats, and failed to take into account the genotype of unpaired individuals present inside the definitive host [23]. In the present study, divorce rate was significantly higher when the sex-ratio was experimentally male-biased rather than female-biased. In addition, genetic dissimilarity, but not male heterozygosity, had a positive influence on divorce rate.

Basically, divorce in schistosomes could come about in two different ways [12]: i) one partner may abandon the other or ii) one partner may be chased by an usurper. The role of each sex in either case might depend on the costs associated with divorce. Results from the first experiment suggest both that males rarely initiate divorce, even when alternative mating options are available, and that the role of female-female competition is negligible. This might be explained by the fact that the female can

only grow and mature once she has paired with a male [17]. One direct consequence of that is that pairing is particularly costly for males in terms of energy and nutrients transferred to the female during her growth. Such a large investment would irremediably be lost by males who initiate divorce, thus limiting their interest in doing so. A second consequence is that immature females of tiny size are probably unable to dislodge larger, paired females. We are thus left with the possibility that male-male competition is the main cause of divorce, or with the possibility that female directly initiate divorce when they perceive a better mating option [11,12,19]. Abandoning a male might be costly to a female too as she may regress to an immature stage. However, regression to an immature state takes from 3 to 6 days [24], a period of time that might be sufficient to pair with another male, especially under a male-biased sex-ratio.

Contrary to previous observations [15], the intensity of male-male competition (i.e. the number of males from the second infection over the number of males from the first infection in each mouse in our second series of experiments) had only a marginal influence on divorce rate in the present study. This seems contrary to what is expected if mate change correspond to "forced divorce" [18,25,26], i.e. paired female being taken over by single males. By contrast, genetic dissimilarity had a strong influence on divorce rate, suggesting that monogamous female schistosomes enhance outbreeding by divorcing for males that are less related to themselves than their first mate. A comparable phenomenon has been previously observed in the monogamous long-tailed tit, *Agithalus caudatus*, where optimal outbreeding provided a better explanation than the "forced divorce" hypothesis to patterns of mate-switching [26]. It is however possible that both the "forced divorce" hypothesis and the "better option" hypothesis contribute to explain our results. Indeed the behaviour of females may influence the success of take-over attempts. Depending on the perceived quality of the usurper, female may choose to help its current mate to resist a take-over attempt or not, a form of passive female choice [27,28]. The relevance of passive female choice in schistosomes remains to be assessed through direct observations *in vitro*.

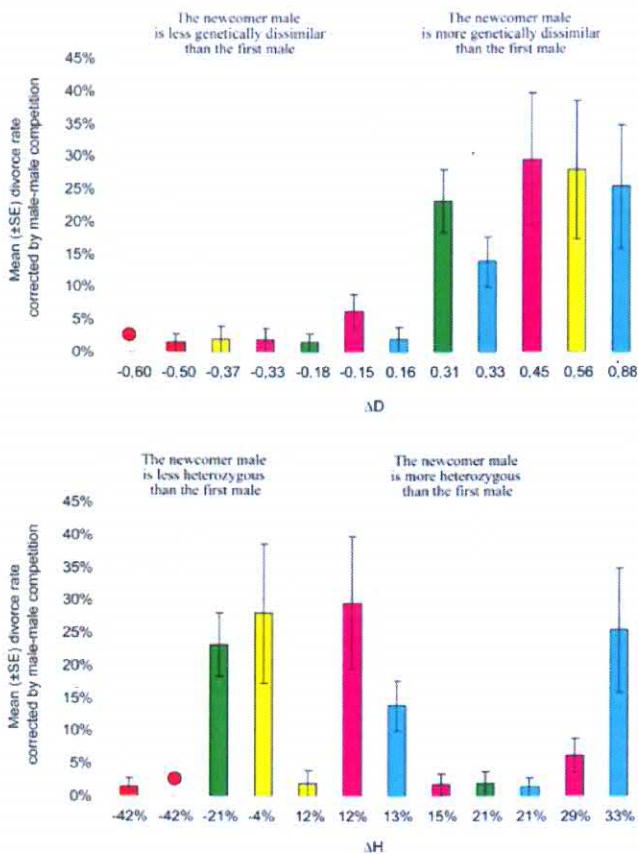


Figure 3. Influence of genetic dissimilarity between mates and male heterozygosity on divorce rate corrected by male-male competition in schistosomes. Genetic dissimilarity was estimated using the r coefficient of Wang [20] and heterozygosity was calculated for each male clone as the number of heterozygous loci divided by the total number of loci. We defined ΔH as the difference in overall heterozygosity between the newcomer male and the first male, and ΔD as the difference in genetic dissimilarity to the female between the first male and the newcomer male (Table 1). When positive, ΔH and ΔD indicate increased heterozygosity in females' progeny. Each colour represents a different female clone. The intensity of male-male competition is measured as the number of individuals introduced during the second infection divided by the number of individual of the same sex introduced on the first one. A total of 528 pairs was analysed. doi:10.1371/journal.pone.0003328.g003

While female preference for genetic dissimilarity is likely to result in increased offspring heterozygosity, male mating success does not appear to be dependent on individual heterozygosity at microsatellite loci since differences in heterozygosity between males had no influence on the rate of divorce. We are confident that the absence of effect of heterozygosity was not due to an insufficient number of microsatellite loci [8]. First, we used 12 microsatellite loci with a satisfactory average level of polymorphism, whereas most studies investigating mate choice based on microsatellite heterozygosity have used between five to nine loci [7,8]. Second, an insufficient number of genetic markers would have equally affected our ability to estimate genetic dissimilarity between mates. The highly significant and strong effect of genetic dissimilarity between mates on the divorce rate suggests however that we used a large enough number of microsatellites.

So far, the influence of female choice on re-mating has been essentially studied in monogamous bird species [11,13]. Our results provide for the first time evidence of adaptive divorce in an invertebrate monogamous species. Female preference for geneti-

cally dissimilar males may contribute to explain both the heterozygous excess found in both male and female schistosome natural populations [29,30], and the fact that mean relatedness measured between male and female pairs in vertebrate hosts is always negative [29]. It may also have important consequences in terms of genetic population structure and transmission strategy of the parasite. Schistosomes cause a serious human disease called schistosomiasis. Schistosomiasis ranks second only to malaria in terms of parasite-induced human morbidity and mortality, with over 200 million people infected and 600 million at risk worldwide [31]. Because genetic heterozygosity might partly determine the ability of parasites to counter host resistance, adaptive divorce could be an important factor in the evolution of drug resistant strains of *Schistosoma* [32].

Materials and Methods

Parasite Life cycle

Schistosoma mansoni is a human and rodent parasite. Parasite sexual reproduction occurs between male and female adult worms in the vertebrate definitive host. Sex determination is syngamic, i.e. one egg produces either one male or one female larva (called miracidium). The aquatic larva actively infects a mollusc intermediate host from *Biomphalaria* genus, transforms into intramolluscan larval stages (called sporocysts) and produces, by clonal multiplication, many unisexual larvae (called cercariae) that will actively infect the vertebrate definitive host and transform into adult worms. In this study, we used a *Schistosoma mansoni* strain isolated in December 2004 from naturally infected molluscs from Guadeloupe (French West Indies), a Guadeloupean strain of *Biomphalaria glabrata* as intermediate hosts and the Swiss OF1 mouse strain as final hosts. Methods for mollusc, mouse infections and parasite recovery have been previously described [30].

Heterozygosity and genetic dissimilarity estimations

Heterozygosity was calculated for each clone as the number of heterozygous loci divided by the total number of loci, and genetic dissimilarity was estimated using the r coefficient of Wang [20], which considers the probability for two individuals to share an allele, given the estimated allele frequencies in the population. In the present study, the population considered consisted of all clonal populations obtained following mollusc infection. To compute the r coefficient of Wang we check for the absence of both departure from Hardy-Weinberg distribution and linkage disequilibria using Genepop version 3.4 [33]. The r coefficient was then calculated using the program SPAGeDi 1.0 [34]. We defined ΔH as the difference in overall heterozygosity between the newcomer male (or female) and the first mate and ΔD as the difference in genetic similarity to the female (or to the male) between the first mate and the newcomer male (or the newcomer female). When ΔH or ΔD negative, the newcomer sexual partner is less heterozygous or less genetically dissimilar than the first one. At the opposite, when ΔH or ΔD positive, the newcomer sexual partner is more heterozygous or more genetically dissimilar than the first male.

Experiment 1: Initiating sex on divorce

Production, sexing and genotyping parasite clones. Four hundred and fifty six molluscs were individually exposed to one miracidia. Five weeks later, from these 456 exposed molluscs, 39 were infected and emitted cercariae. Two cercariae of each infected mollusc were sexed and genotyped using W1 marker, a female specific sequence only present on the W chromosome [35] and 10 microsatellite markers, R95529, Smd57, Smd28, L46951 [36], SmCl, SmDO11[37], SmBr3, SmBr13, SmBr14, SMBr16

[38]. From the 39 infected molluscs, 18 emitted female clonal cercarial populations, and 21 emitted male clonal cercarial populations.

Experimental protocol. A first group of four mice (experiment 1a) were individually infected, using 20 female cercariae from a single clone and 30 male cercariae from a single clone. The excess of males ensured that all females would have been mated. At five weeks post infection, mice were infected again with 45 cercariae from another clonal population of males. This provided females with opportunities to re-mate with newcomer males of a different genotype than that of their first mate. The different clonal populations used in this first experiment were chosen to avoid any influence of genetic dissimilarity and/or heterozygosity on either male or female divorce rate. The genetic dissimilarity between the female and its first mate, and between the female and its second mate was 0.2345 and 0.0655 respectively ($\Delta D = 0.1690$). The number of heterozygous (6/10) loci did not differ between the first and second male ($\Delta H = 0$). A second group of four mice (experiment 1b) were individually infected using 30 female cercariae from a single clone and 20 male cercariae from a single clone. The excess of females ensured that all males would have been mated. At five weeks post infection, mice were infected again with 45 cercariae from another clonal population of females. This provided males with opportunities to re-mate with newcomer females of a different genotype than that of their first mate. The genetic dissimilarity between the male and its first mate, and between the male and its second mate was 0.3585 and 0.1343 respectively ($\Delta D = 0.2242$). The number of heterozygous loci (7/10) did not differ between the first and the second female ($\Delta H = 0$). The paired and unpaired male of the first group and female of the second group were isolated and counted. The DNA of all these worms was extracted and the microsatellite profile was determined.

Experiment 2: Relative influence of male heterozygosity and genetic dissimilarity between mates on female choice to re-mate

Production, sexing and genotyping parasite clones. Four hundred and thirty six molluscs were individually exposed to one miracidium. Five weeks later, from these 436 exposed molluscs, 37 were infected because they emitted cercariae. Two cercariae of each infected mollusc were sexed and genotyped using W1 marker [35] and 12 microsatellite markers, R95529, SmD57, SCMSMOXII, SmD89, SMXIP25 [36], SmC1, SmDO11 [37], SmBR8, SmBR13, SmBR14, SmBR16 [38], SMS7 [39]. From

the 37 infected molluscs, 17 emitted female clonal cercarial populations, and 20 emitted male clonal cercarial populations.

Experimental protocol. Tests of divorce were performed in five separate series of tests. Each test consisted in individually infecting four mice using 45 male cercariae from a single clone and 30 female cercariae from a single clone. The excess of males ensured that all females would be mated after four weeks. Indeed, one control group of three mice infected using 45 male cercariae from a single clone and 30 female cercariae from a single clone showed that all females were mated after four weeks. At five weeks post infection, each mouse was independently infected again with 67 cercariae of a new male clonal population genetically distinct from that of the first male. Each female clone was tested with two or three newcomer male clones, with various genetic dissimilarities with the female and various levels of heterozygosity (i.e. different ΔH and ΔD) (Table 1). Seven weeks after the second infection, all mice were sacrificed and worms were recovered [40]. From all the re-infected mice, the paired and unpaired adult worms were isolated and counted. The DNA of all male worms was extracted and their microsatellite profile was determined.

Parameters measured and statistical analyses. Divorce rate was measured as the number of re-mated pairs on the total number of pairs. The intensity of competition (equivalent to the availability of alternative mating options to females), was measured as the number of individuals introduced during the second infection divided by the number of individual of the same sex introduced on the first one. As re-mating was defined as a binomial variable, the influence of male-male competition, male heterozygosity, and genetic dissimilarity on divorce rate, was analysed using a logistic regression model, controlling for female genotype.

Ethical note. Our laboratory has received the permit N° A 66040 for experiments on animals from both French Ministère de l'Agriculture et de la Pêche and French Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie. Housing, breeding and animal care of the mice followed the ethical requirements of our country. The experimenter possesses the official certificate for animal experimentation delivered by both ministries (Décret n° 87-348 du 19 octobre 1987; number of the authorization 007033).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SB JB. Performed the experiments: SB JB. Analyzed the data: SB FC JB. Contributed reagents/materials/analysis tools: SB JB. Wrote the paper: SB FC JB.

References

- Brown JL (1997) A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behav Ecol* 8: 60–65.
- Weatherhead PJ, Dufour KW, Lougher SC, Eckerl CG (1999) A test of the good-genes-as-heterozygosity hypothesis using red-winged blackbirds. *Behav Ecol* 10: 619–625.
- Tregenza T, Wedell N (2000) Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited Review. *Mol Ecol* 9: 1013–1027.
- Roberts SC, Hale ML, Perie M (2006) Correlations between heterozygosity and measures of genetic similarity: implications for understanding mate choice. *J Evol Biol* 19: 559–569.
- Mays Jr HL, Hill GE (2004) Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends Ecol Evol* 19: 554–559.
- Roberts SC, Gosling LM (2003) Genetic similarity and quality interact in mate-choice decisions by female mice. *Nat Genet* 35: 103–106.
- Bishop JM, O'Ryan C, Jarvis JCM (2007) Social common mole-rats enhance outbreeding via extra-pair mating. *Biol Lett* 3: 176–179.
- Smith SB, Webster MS, Holmes RF (2005) The heterozygosity theory of extra-pair mate choice in birds: a test and a cautionary note. *J Avian Biol* 36: 146–154.
- Amos W, et al. (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proc R Soc Lond B* 268: 2021–2027.
- Kempemaers B, Adriaenssens E, Dhondt AA (1998) Inbreeding and divorce in blue and great tits. *Anim Behav* 56: 737–740.
- Chouhury S (1995) Divorce in birds: a review of the hypothesis. *Anim Behav* 50: 413–420.
- Black J, ed (1996) Partnerships in Birds. The Study of Monogamy. Oxford: Oxford University Press.
- Cézilly F, Prévaut M, Dubois F, Faivre B (2000) Pair-bonding in birds and the active role of females: a critical review of the empirical evidence. *Behav Proc* 51: 83–92.
- Dubois F, Cézilly F (2002) Breeding success and mate retention in birds: A meta-analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52: 367–364.
- Pica-Mattoccia L, Moroni R, Tchern Tchernate LA, Southgate VR, Ciofi D (2000) Changes of mate occur in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 120: 495–500.
- Beltran S, Boissier B (2008) Schistosomes monogamy: who, how, and why? *Trends in parasitol* 24: 386–391.
- Mone H, Boissier J (2004) Sexual biology of schistosomes. *Adv Parasitol* 57: 89–189.
- Taborsky R, Taborsky M (1999) The mating system and stability of pairs in kivi *Apteryx* spp. *J Avian Biol* 30: 143–151.
- Ens BJ, Salfried UN, Harris MP (1993) Divorce in the long-lived and monogamous oystercatcher, *Haematopus ostralegus*: incompatibility or choosing the better option? *Anim Behav* 45: 1199–1217.

20. Wang J (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203–1215.
21. Criscione CD, Poulin R, Blouin MS (2005) Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol Ecol* 14: 2247–2257.
22. Prugnolle F, Theron A, Durand P, De Mees T (2004) Test of panmixia by genetic analysis of *Schistosoma mansoni* pairs within its natural murine host in Guadeloupe. *J Parasitol* 90: 507–509.
23. Prugnolle F, personal communication.
24. Clough ER (1981) Morphology of reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. *J Parasitol* 67: 535–539.
25. Jeschke JM, Wanless S, Harris MP, Kokko H (2007) How partnerships end in gullmoms: *Uma ulge* chance events, adaptive change, or forced divorce? *Behav Ecol* 18: 460–466.
26. Hatchwell BJ, Russell AF, Ross DJ, Fowle MK (2000) Divorce in cooperatively breeding long-tailed tits: a consequence of inbreeding avoidance? *Proc R Soc Lond B* 267: 813–819.
27. Dhondt AA (2002) Changing mates. *Trends Ecol Evol* 17: 55–56.
28. Heg D, Bruinzeel LW, Ens B (2003) Fitness consequences of divorce in the oystercatcher, *Haematopus ostralegus*. *Anim Behav* 66: 175–184.
29. Prugnolle F, De Mees T, Durand P, Sire C, Theron A (2002) Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Mol Ecol* 11: 1231–1238.
30. Boissier J, Mone H (2000) Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121: 379–383.
31. CDC. Schistosomiasis fact sheet (2004). Available: http://www.cdc.gov/ncidod/dpdx/parasites/Schistosomiasis/factsht_schistosomiasis.htm. Accessed 2008 Jun 3.
32. Castillo-Chavez C, Feng Z, Xu D (2008) A schistosomiasis model with mating structure and time delay. *Math Biosci* 211: 333–341.
33. Raymond M, Rousset F (1995) GenePop (version 1.2), a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86: 248–249.
34. Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2: 618–620.
35. Boissier J, Durand P, Mone H (2001) PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: application for sexing clonal cercarial population. *Mol Biochem Parasitol* 112: 139–141.
36. Durand P, Sire C, Theron A (2000) Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. *Mol Ecol* 9: 997–998.
37. Curtis J, Sorenson RE, Page LK, Minchella DJ (2001) Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for other schistosome species. *Mol Ecol Notes* 1: 143–145.
38. Rodrigues NB, Loverde PT, Romanha AJ, Oliveira G (2002) Characterization of new *Schistosoma mansoni* microsatellite loci in sequences obtained from public DNA databases and microsatellite enriched genomic libraries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 71–75.
39. Blair L, Webster JP, Barber GC (2001) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schistosoma mansoni* from Africa. *Mol Ecol Notes* 1: 93–95.
40. Duvall RH, DeWitt WB (1967) An improved perfusion technique for recovering adult Schistosomes from laboratory animals. *Am J Trop Med Hyg* 16: 483–486.

II. 3. Publication : «Are schistosomes socially and genetically monogamous?» *Parasitology Research*, 104, 481-483 (2009).

Les changements de partenaire ne donnent pas toujours lieu à une descendance, surtout chez des espèces où les femelles peuvent stocker le sperme. Chez certaines espèces d'oiseaux, la monogamie génétique coïncide avec des changements de partenaire intenses (Hunter et al., 1992; Schwartz et al., 1999; Sodhi, 1991; Warkentin et al., 1994). Un réceptacle séminal, présent chez les femelles schistosomes (Clough, 1981; Erasmus, 1973; Neves et al., 2005), pourrait permettre le stockage de sperme et ainsi le contrôle de la paternité de la descendance par la femelle. Pour définir si, chez les schistosomes, la monogamie est « sociale et génétique » ou « sociale et non génétique », il est nécessaire d'évaluer la présence ou non d'une descendance issue des changements de partenaire.

Des analyses d'ADN sont réalisées sur des miracidia de *Schistosoma mansoni* issus de faeces d'hôtes vertébrés infestés de la manière suivante : une première infestation de l'hôte vertébré est réalisée avec un couple dont le profil microsatellite du clone mâle et celui du clone femelle sont prédéterminés avant infestation ; puis une seconde infestation est réalisée 4 semaines plus tard, avec un clone mâle différent du premier. Les miracidia éclos des œufs (obtenus à partir des faeces des hôtes vertébrés) sont récupérés et génotypés chaque semaine, dès la 6^{ème} semaine jusqu'à la 16^{ème} semaine post primo-infestation. Connaissant le profil génétique des parents, nous pouvons déduire les miracidia issus du couple de la primo-infestation et ceux issus du couple de la ré-infestation, cas de descendance issue d'un changement de partenaire.

La première descendance apparaît dès la 7^{ème} semaine post primo-infestation. La période pré-patente (temps entre l'infestation et la production d'œufs) est donc de 7 semaines. Lors de la 7^{ème} et 8^{ème} semaine, seuls des descendants issus du premier couple sont obtenus. Nous obtenons une descendance du deuxième couple (issue d'un changement de partenaire) dès la 9^{ème} semaine, soit 5 semaines seulement après la ré-infestation. La période pré-patente est ainsi réduite de deux semaines. Cette accélération de ponte pourrait résulter de deux choses : une accélération du développement des mâles nouveaux entrants (Standen, 1953b) à laquelle s'ajouterait l'accès pour le mâle à des femelles déjà matures. Ce résultat montre que

malgré la présence, chez les femelles schistosomes, d'un réceptacle séminal qui pourrait permettre le stockage de sperme, une descendance rapide issue de changements de partenaire est obtenue. D'après notre définition de la monogamie, cela rend la monogamie du schistosome sociale mais non génétique (Beltran and Boissier, 2009a).



Are schistosomes socially and genetically monogamous?

Sophie Beltran · Jérôme Boissier

Received: 16 September 2008 / Accepted: 26 September 2008 / Published online: 23 October 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Monogamy is a mating system with pairs made of only one male and only one female. But social monogamy cannot inevitably imply the sexual exclusivity between mates, which is yet the case in genetic monogamy on which the offspring results only from the observed pair. The genetic monogamy is today considered as an exception in monogamous animals but the possibility to store sperm for females in some monogamous species makes co-occurrence of genetic monogamy with extensive mate changes possible. Schistosome is a socially monogamous endoparasite with female living inside the gynecophoric canal of its male. If mate changes have been demonstrated in this parasite, resulting offspring needs to be proven, especially if we consider the presence of a *receptaculum seminis* in female schistosomes. In this paper, we show the first evidence of rapid offspring production resulting from mate change in a monogamous invertebrate despite the potential ability for the female schistosome to store sperm. Thus, we conclude that schistosomes are socially but not genetically monogamous.

Introduction

Monogamy is one of the several mating systems observed in animals. In this mating system, each gender has only one

mate in a relationship, forming a pair during a particular period of time. Different levels can be observed: the social and the genetic monogamy (Reichard and Boesch 2003). In the social monogamy, a pair bond with one male and one female without implying sexual exclusivity between the two partners is observed. However, in many socially monogamous species, one or both members of the pair could engage in mate changes; therefore, social monogamy does not always correspond to genetic monogamy. Indeed, in genetic monogamy, offspring is the exclusive result of mating between the two partners (Hughes 1998; Danchin et al. 2005). This genetic monogamy is considered today as exceptionally rare (Westneat and Sherman 1997; Griffith et al. 2002) and cases of offspring resulting from mate change has been demonstrated in several monogamous vertebrate species, in birds (Birkhead and Moller 1995), reptilians (Bull 2000), or mammals (Goossens et al. 1998). Nevertheless, mate changes do not obligatory imply offspring resulting from species where female can store sperm. In birds, where females can store sperm in specialized storage tubules, genetic monogamy co-occurs with extensive mate changes in merlins, *Falco columbarius* (Sodhi 1991; Warkentin et al. 1994), in northern fulmars, *Fulmaris glacialis* (Hunter et al. 1992), or in Humboldt penguins, *Spheniscus humboldti* (Schwartz et al. 1999). Among invertebrates, monogamy is extremely rare and the occurrence of offspring resulting from mate changes has never been demonstrated. In *Nicrophorus orbicollis*, a monogamous necrophilic macrocoleoptera, mate change has been observed but an eventual resulting offspring has not been tested (Robertson 1995). Schistosomes, a platyhelminth endoparasite, are classified at the lowest taxonomical level of monogamous species (Beltran and Boissier 2008). The simple view of a schistosome pair makes the schistosome socially monogamous. Mate changes have been demon-

S. Beltran · J. Boissier (✉)
Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Tropicale et
Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-EPHE-LPVD,
Université de Perpignan,
52 Avenue Paul Alduy,
66860 Perpignan, France
e-mail: boissier@univ-perp.fr

S. Beltran
e-mail: sophie.beltran@univ-perp.fr

stated in *Schistosoma mansoni* (Pica-Mattoecia et al. 2000). However, resulting offspring needs to be proven in order to answer the recently asked question “are schistosomes socially and genetically monogamous?” (Beltran and Boissier 2008). It is not an obvious question if we consider the presence of a *receptaculum seminis* in female schistosomes (Erasmus 1973; Neves et al. 2005) that could provide the potential to store sperm and control offspring paternity. Here, DNA analyses were performed to ensure that schistosomes’ offspring can result from the induced mate change and thus to establish whether or not schistosomes are genetically monogamous.

Material and methods

Parasite and host strains

In this study, we used a *S. mansoni* strain isolated from naturally infected molluscs from Guadeloupe (French West Indies), a Guadeloupean strain of *Biomphalaria glabrata* as intermediate hosts and the Swiss OF1 mouse strain as final hosts. Parasitological (mollusc and mouse infections and parasite recovery) and molecular methods (DNA extraction and polymerase chain reaction amplification) have been previously described by Boissier and Mone (2000) and Beltran et al. (2008), respectively.

Production, sexing, and genotyping parasite

Four hundred and thirty-six molluscs were individually exposed to one miracidium. Five weeks later, from these 436 exposed molluscs, 37 were infected because of emitted cercariae. Two cercariae of each infected mollusc were sexed and genotyped using W1 marker, a female-specific sequence only present on the W chromosome (Boissier et al. 2001) and 12 microsatellite markers, R95529, Smd57, Smimp25, SemsmoXII, Smd89 (Durand et al. 2000), SmC1, SmDO11 (Curtis et al. 2001), SmBr8, SmBr13, SmBr14, SmbR16 (Rodrigues et al. 2002), and Sims7 (Blair et al. 2001). From the 37 infected molluscs, 17 emitted female clonal cercarial populations, and 20 emitted male clonal cercarial populations.

Induced mate changes

Nine mice were individually exposed to 20 female cercariae from the same clonal population and 30 male cercariae from the same clonal population. The excess of males ensured that all females would have been mated. At 4 weeks postinfection, mice were infected again with 45 cercariae from another clonal population of males. This provided females with opportunities to remate with newcomer males

of a different genotype than that of their first mate and, subsequently, to discriminate offspring paternity of the first mate from offspring paternity of the second mate.

Paternity identification of offspring

Usually, DNA fingerprinting to assess parentage is performed in field populations and only give putative parents (Griffith et al. 2002). Here, in an experimentally controlled situation, we know the genetic profile of all parents (mother and fathers) and, thus, considering Mendelian inheritance of the microsatellite markers, an exact offspring genetic profile is expected. To identify offspring paternity, schistosomes’ eggs were recovered from mice feces once a week from 6 to 16 weeks after the first infection (i.e., from 2 to 13 weeks after the reinfection). The nine mice were placed in metabolism cages and feces were collected in saline solution (NaCl 8.5‰). Eggs from feces were then isolated through a set of wire screens (425-, 180-, 106-, and 45- μ m mesh) and placed in spring water stimulating hatching miracidia. Individual miracidium was collected in 5- μ l spring water using a micropipette; DNA was extracted and microsatellite profile was determined. The rate of offspring resulting from mate change was measured as the number of offspring of newcomer father on the total number of genotyped offspring.

Results and discussion

The first eggs were recovered at 7 weeks after the first infection. The time from infection until female starts to produce eggs (prepatent period) is thus from 43 to 49 days. From 7 to 16 weeks postinfection, a total of 516 eggs (offspring) were collected and genotyped. At 7 and 8 weeks postinfection, all offspring came from the male of the first

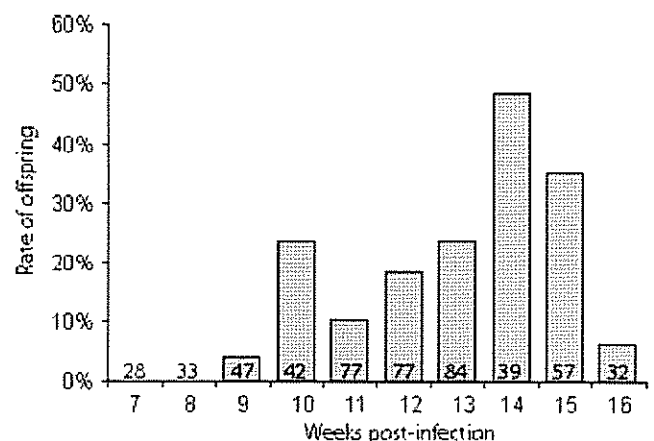


Fig. 1 Rate of offspring resulting from mate change in *S. mansoni* during the course of the parasite infection. The numbers in each histogram represent the numbers of genotyped offspring

pair (Fig. 1). Offspring from the second male appears, for the first time, at 9 weeks after the first infection, thus at 5 weeks after the second male infection. The prepatent period of the second mate is thus between 29 and 35 days. This 2-week acceleration of laying, resulting from the mate change, should be a consequence of a development acceleration of the newcomer males (Standen 1953). From the 9 to the 17 weeks postinfection, the rate of offspring resulting from mate change varies from 4% to 49%. Overall rate of offspring resulting from mate change is 21% (95 young resulting from mate change on 455 offspring; 95% confidence interval 17–25%). Here, we show the first evidence of rapid offspring production resulting from mate change in a monogamous invertebrate. Despite the fact that female schistosomes can store sperm in their *receptaculum seminis* (Erasmus 1973; Neves et al. 2005), mate change induces offspring and thus argues that schistosomes are socially but not genetically monogamous.

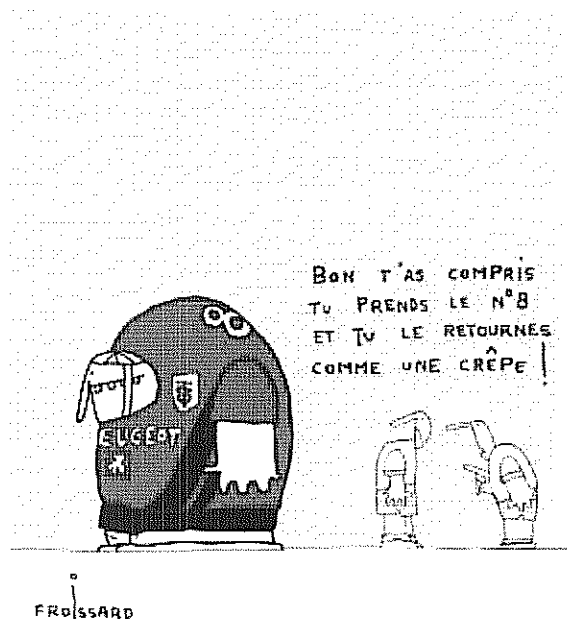
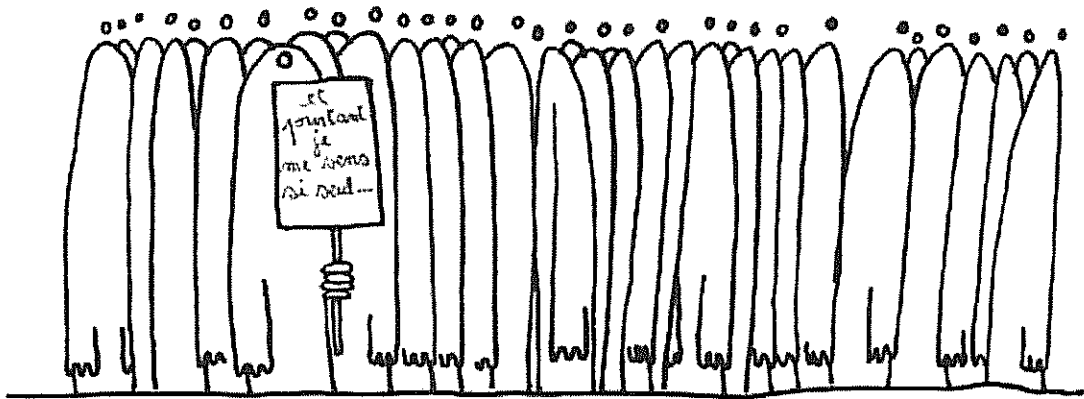
Acknowledgments This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the CNRS (Program Monogamix). We thank Bernard Dejean and Jean-François Allienne for technical assistance. The experiments comply with the current French laws.

References

- Beltran S, Boissier J (2008) Schistosome monogamy: who, how, and why? *Trends Parasitol* 24:386–391
- Beltran S, Galinier R, Allienne JF, Boissier J (2008) Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:501–503
- Birkhead TR, Moller AP (1995) Extra-pair copulation and extra-pair paternity in birds. *Anim Behav* 49:843–848
- Blair L, Webster JP, Barker GC (2001) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schistosoma mansoni* from Africa. *Mol Ecol Notes* 1:93–95
- Boissier J, Mone H (2000) Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121:379–83
- Boissier J, Durand P, Moné H (2001) PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: application for sexing clonal cercarial population. *Mol Biochem Parasitol* 112:139–141
- Bull MC (2000) Monogamy in lizards. *Behav Process* 51:7–20
- Curtis J, Sorensen RE, Page LK, Minchella DJ (2001) Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for other schistosome species. *Mol Ecol Notes* 1:143–145
- Danchin E, Giraldeau LA, Cézilly F (2005) *Ecologie comportementale*. 1st edn. Dunod, Paris
- Durand P, Sire C, Theron A (2000) Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. *Mol Ecol* 9:997–998
- Erasmus DA (1973) A comparative study of the reproductive system of mature, immature and “unisexual” female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 67:165–183
- Goossens B, Graziani L, Waits L, Farand E, Magnolon S, Coulon J, Bel MC, Taberlet P, Allainé D (1998) Extra-pair paternity in the monogamous alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behav Ecol Sociobiol* 43:281–288
- Griffith SC, Owens JPF, Thuman K (2002) Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Mol Ecol* 11:2195–2212
- Hughes C (1998) Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology* 79:383–399
- Hunter FM, Burke T, Watts SE (1992) Frequent copulation as a method of paternity assurance in the northern fulmar. *Anim Behav* 44:149–156
- Neves RH, de Lamare Biolchini C, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Branquinho TB, Lenzi HL, Hulstijn M, Gomes DC (2005) A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitol Res* 95:43–49
- Pica-Mattocchia L, Moroni R, Tehuem Tehuente LA, Southgate VR, Cioli D (2000) Changes of mate occur in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 120:495–500
- Reichard U, Boesch C (2003) *Monogamy: mating strategies and partnerships in birds, humans and other mammals*. Cambridge University Press, Cambridge
- Robertson IC (1995) Extra-pair copulations in burying beetles (Coleoptera, Silphidae). *J Kansas Entom Soc* 67:418–420
- Rodrigues NB, Loverde PT, Romanha AJ, Oliveira G (2002) Characterization of new *Schistosoma mansoni* microsatellite loci in sequences obtained from public DNA databases and microsatellite enriched genomic libraries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:71–75
- Schwartz MK, Boness DJ, Schaeff CM, Majluf P, Perry EA, Fleischer RC (1999) Female-solicited extrapair matings in Humboldt penguins fail to produce extrapair fertilizations. *Behav Ecol* 10:242–250
- Sodhi NS (1991) Pair copulations, extra-pair copulations, and intraspecific nest intrusions in Merlin. *Condor* 93:433–437
- Standen OD (1953) The relationship of sex in *Schistosoma mansoni* to migration within the hepatic portal system of experimentally infected mice. *Ann Trop Med Parasitol* 47:139–145
- Warkentin IG, Curzon AD, Carter RE, Wetton JH, James PC, Parkin DT, Oliphant LW (1994) No evidence for extra-pair fertilizations in the Merlin revealed by DNA fingerprinting. *Mol Ecol* 3:229–234
- Westneat DE, Sherman PW (1997) Density and extra-pair fertilizations in birds: a comparative analysis. *Behav Ecol Sociobiol* 41:205–215

Chapitre III

Biais de sex ratio en faveur des mâles chez les schistosomes, monogamie et changements de partenaire



Chapitre III. Biais de sex ratio en faveur des mâles chez les schistosomes, monogamie et changements de partenaire

Le rapport entre le nombre de mâles et le nombre de femelles dans une population (i.e. le sex ratio) est un paramètre démographique clé dans l'étude des populations. Il représente un concept évolutif central permettant de prédire la 'direction' et l'intensité de la compétition dans la sélection sexuelle, c'est-à-dire, de prédire le sexe qui entre en compétition et avec quelle intensité (Jirotkul, 1999; Kvarnemo and Ahnesjö, 1996). Suivant le principe de Fisher (Hamilton, 1967), généralement, le sex ratio fluctue autour d'un ratio équilibré 1:1 (un mâle: une femelle). Ce principe est le suivant : si l'on suppose que, dans une population donnée, les descendants mâles sont moins nombreux que les descendants femelles, la population présente un biais en faveur des femelles (les femelles sont plus nombreuses que les mâles). Les mâles (moins nombreux) ont alors plus de chance de trouver un partenaire sexuel que les femelles et ont un plus grand nombre de descendants potentiels. Ainsi, les parents qui produisent plus de mâles ont tendance à avoir plus de « petits enfants » que la moyenne. Les gènes qui tendent à produire plus de mâles s'étendent alors à la population et le nombre de descendants mâles augmente. Lorsque le sex ratio approche l'équilibre, l'avantage donné à la production de mâles disparaît complètement (le raisonnement inverse, avec plus de descendants femelles produits, fonctionne également). Ainsi, le sex ratio équilibré 1:1 est la stratégie évolutivement stable. Cependant, le principe de Fisher ne fonctionne que lorsque, dans la population considérée, l'investissement est égal entre la production de descendants mâles et celle de descendants femelles (Hamilton, 1967). Un sex ratio équilibré 1:1 est considéré comme « Fisherien », un sex ratio déséquilibré comme « extraordinaire », ce dernier ayant lieu lorsque l'hypothèse d'égal investissement à la production des deux sexes, faite par le modèle de Fisher, ne fonctionne pas (Hamilton, 1967). Chez certaines populations animales, il existe ainsi des cas de sex ratios biaisés (i.e. déséquilibrés ou « extraordinaires »), soit en faveur des mâles (plus de mâles que de femelles), soit en faveur des femelles (plus de femelles que de mâles) (Hardy, 2002).

D'un point de vue écologique, le biais mâle de sex ratio est plus intrigant que le biais femelle. En effet, dans les populations animales qui réalisent une reproduction sexuée, il y a un coût à la production de mâles car contrairement aux femelles, les mâles n'ont pas la capacité de « se remplacer ». Cela ne signifie pas que les mâles ne contribuent en rien à la production de la descendance. Dans une population de taille donnée, s'il y a plus de mâles que de femelle (cas du biais de sex ratio en faveur des mâles), moins de descendants sont produits que si le sex ratio était équilibré car les mâles en excès ne possèdent pas leurs propres descendants (Maynard Smith, 1978). Malgré cela, des cas de biais de sex ratio en faveur des mâles, avec des conséquences majeures sur les caractéristiques des populations, sont communément observés dans le monde animal, des invertébrés aux vertébrés (Allaine et al., 2000; Poulin and Fitzgerald, 1989; Wapstra et al., 2009).

Dans le genre *Schistosoma*, le sex ratio est connu pour être biaisé en faveur des mâles (plus de mâles que de femelles adultes) dans l'hôte définitif (Morand et al., 1993) (cf. Introduction). Ce biais de sex ratio en faveur des mâles intrigue les scientifiques depuis plusieurs années. Un grand nombre d'études expérimentales (Boissier and Mone, 2000; Evans and Stirewalt, 1951; Liberatos, 1987; Mitchell et al., 1990; Rowntree and James, 1977; Stirewalt and Fregeau, 1968) ou analytiques (Boissier et al., 2004; Boissier and Mone, 2001b; Boissier et al., 1999; Dietz, 1975; May, 1977; Morand et al., 1993) ont été réalisées pour expliquer (i.e facteurs proximaux) ce biais, mais les conséquences (i.e. facteurs ultimes) de ce biais de sex ratio en faveur des mâles ont rarement été explorées. La première partie de ce chapitre III est un article de réflexion soumis dans la revue « Trends in Parasitology », se basant à nouveau sur des aspects connus de la biologie en général et celle des schistosomes (principalement *Schistosoma mansoni*, l'espèce la plus connue au sein des schistosomes), pour tenter de comprendre les facteurs proximaux et ultimes de ce biais de sex ratio en faveur des mâles chez les schistosomes (Beltran and Boissier, 2009b). La deuxième partie présente une étude, cette fois expérimentale, publiée, menée sur l'effet de ce biais de sex ratio en faveur des mâles sur le taux de changements de partenaire (Beltran et al., 2009a), hypothèse jusqu'alors jamais testée expérimentalement dans le monde animal.

III. 1. Publication : « Male Biased Sex Ratio: Why and What Consequences for *Schistosoma* Genus? » Trends in Parasitology, submitted.

Les schistosomes sont gonochoriques (cf. Introduction) alors que les autres espèces de trématodes sont hermaphrodites, leur système d'appariement est considéré comme monogame (cf. Chap I) comme seulement 1% des êtres vivants, et ils présentent un biais de sex ratio en faveur des mâles (cf. III.1). Les deux premières « énigmes » (gonochorisme et monogamie) ont récemment été débattues (Beltran and Boissier, 2008; Loker and Brant, 2006). Cette publication va ainsi tenter de mieux comprendre les causes et conséquences évolutives de la troisième énigme, le biais de sex ratio en faveur des mâles. Gonochorisme, monogamie et biais de sex ratio sont intégrés dans un schéma évolutif final (figure 2 de cette publication), repris en synthèse de ce manuscrit (figure 12).

Facteurs proximaux du biais de sex ratio en faveur des mâles

Stade auquel le biais de sex ratio en faveur des mâles apparaît

Le biais de sex ratio peut apparaître à différents stades du cycle de vie d'un animal : durant la fertilisation (sex ratio primaire), à la naissance (sex ratio secondaire) et à la maturité (sex ratio tertiaire) (Mayr, 1939). Les sex ratios primaire et secondaire sont difficiles à distinguer et sont souvent regroupés sous le nom de sex ratio primaire. Le biais de sex ratio primaire en faveur des mâles est observable dans plusieurs groupes animaux, chez les oiseaux (Paul F, 2007), les mammifères (Toro et al., 2006), les poissons (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008) et les insectes (De Menten et al., 2005). Concernant le biais de sex ratio tertiaire (acquis à la maturité) en faveur des mâles, il est également observé dans plusieurs groupes animaux (Allaine et al., 2000; Le Galliard et al., 2005; Poulin and Fitzgerald, 1989; Wapstra et al., 2009).

Chez les Schistosomes, le cycle de vie est dit complexe (cf. figure 1 de cette publication) et inclut des stades libres (cercaire et miracidium) et parasites (schistosomule, adulte, sporocyste). **Le sex ratio primaire du schistosome** correspond au ratio entre le nombre d'œufs mâles par rapport au nombre d'œufs femelles. Des auteurs ont utilisé des approches moléculaires sexe spécifiques et ont observé le même nombre de miracidia mâles et femelles après éclosion (Gasser et

al., 1991; Liberatos and Short, 1983). Pour éviter un biais dû à une différence d'efficacité dans l'éclosion entre les deux sexes, d'autres auteurs ont utilisé une méthode d'hybridation histochimique sur une section de foie de souris (lieu où les œufs qui ne sont pas émis à l'extérieur de l'hôte *via* les faeces de l'hôte s'enkystent) et ont révélé un nombre approximativement égal d'œufs mâles et femelles (Penschow et al., 1993). Ces deux études semblent suggérer que le sex ratio primaire des schistosomes est équilibré. Au contraire, le **sex ratio tertiaire des adultes schistosomes** est biaisé en faveur des mâles. La liste des publications reportant un biais en faveur des mâles dans les expérimentations est trop grande pour être exhaustive mais une base de données révèle que, sur 616 expériences indépendantes, 75% des expériences présentent un biais de sex ratio en faveur des mâles (Boissier and Mone, 2001b). En milieu naturel, des observations révèlent également un biais de sex ratio en faveur des mâles chez différentes espèces, dans différentes zones d'étude et sur différents hôtes (Mone and Boissier, 2004). Par exemple, pour *Schistosoma mansoni*, le sex ratio varie de 1:1 à 3.21:1 avec une moyenne de 1.44:1. Notons que certains papiers révèlent un effet des hôtes mollusques et/ou vertébrés sur le biais de sex ratio (Boissier and Mone, 2001a; de Souza et al., 1996; Mone, 1997; Mone and Boissier, 2004; Nino Incani et al., 2001; Zavodna et al., 2008).

Pourquoi le biais de sex ratio adulte chez les schistosomes est-il biaisé en faveur des mâles ?

Dans le monde animal, un biais de sex ratio peut avoir des origines environnementales et/ou génétiques. Le sex ratio est connu pour être contrôlé par des facteurs environnementaux comme la température chez des reptiles (Wapstra et al., 2009). Une différence de sensibilité aux prédateurs et aux maladies entre mâles et femelles peut également induire un biais de sex ratio (Poulin and Fitzgerald, 1989; Zuk, 2009). Pour ce qui est des facteurs génétiques, des mécanismes pré- ou post-zygotiques prédéterminés génétiquement pourraient contrôler, *in utero*, le succès de chaque sexe et donc le sex ratio (Davison and Ward, 1998). Des différences entre les sexes dans le développement ou dans le comportement pourraient également avoir une base génétique et influencer le sex ratio (Poulin and Fitzgerald, 1989).

Des différences mâle/femelle dans l'expression de certains traits de vie sexuels du schistosome au cours de son cycle de vie pourraient expliquer le biais de sex ratio tertiaire en faveur des mâles. Les études réalisées en conditions de laboratoire sur ces traits de vie ont été synthétisées et la seule différence apparente en faveur des mâles au cours du cycle de vie est une différence dans le succès de développement de la cercaire, les cercaires mâles se développant mieux que les cercaires femelles (Boissier et al., 1999). Un modèle a permis également l'estimation du sex ratio des adultes en tenant compte des valeurs issues des expériences publiées sur ces différences entre mâles et femelles au cours du cycle de vie du parasite (Boissier et al., 2004). Ce modèle confirme que c'est à l'intérieur de l'hôte définitif que le biais de sex ratio en faveur des mâles est induit (Boissier et al., 2004).

Une autre étude compare le succès de développement entre mâle et femelle aux différents temps de l'infestation de l'hôte définitif (Rowntree and James, 1977). Aucune différence de succès de développement entre les sexes n'est observée au temps 0 (habilité à pénétrer au travers du tégument de l'hôte), au 6^{ème} jour (arrivée dans les poumons) ou au 14^{ème} jour (arrivée dans le foie). Cependant, une différence significative est observée au 28^{ème} jour (survie des adultes) avec plus de mâles que de femelles (Rowntree and James, 1977).

Le dimorphisme sexuel entre mâle et femelle apparaît autour du 25^{ème} jour (Basch, 1990). La différence morphologique entre les sexes, la femelle plus fine que le mâle plus musculeux, pourrait expliquer la différence de taux de survie entre les deux sexes et donc le biais de sex ratio en faveur des mâles schistosomes, la femelle étant moins capable de résister au flux sanguin (cf. Migration dans l'hôte définitif en Introduction) (Morand and Muller-Graf, 2000). Selon cette hypothèse, un retour à l'équilibre impliquerait un changement morphologique de la femelle entraînant une augmentation de sa taille et ainsi une diminution de son efficacité dans la ponte des oeufs dans les fines veinules. Aucun retour à un sex ratio équilibré ne serait alors possible.

L'origine du dimorphisme sexuel des schistosomes a été débattue (Loker and Brant, 2006). Les auteurs montrent une grande variation dans le dimorphisme sexuel selon le genre de Schistosomatidae. Si le biais de sex ratio en faveur des mâles est dépendant du dimorphisme sexuel, un sex ratio équilibré pourrait être attendu chez les espèces de Schistosomatidae qui ne présentent pas de dimorphisme sexuel. Une analyse comparative du dimorphisme sexuel et du sex ratio pourrait permettre de

tester ce lien. Malheureusement, à l'heure actuelle, les données de sex ratio ne sont pas présentes dans la bibliographie pour tous les Schistosomatidae.

Facteurs ultimes du biais de sex ratio en faveur des mâles

Effet du biais de sex ratio en faveur des mâles sur la sélection sexuelle et les changements de partenaire

Un excès de mâles par rapport aux femelles dans une population peut avoir deux effets en terme de sélection sexuelle (Kokko and Jennions, 2008). En effet, un biais de sex ratio peut (1) augmenter la variabilité et la compétition entre les individus du sexe le plus abondant (dans notre cas entre les mâles) et (2) donner au sexe « rare » (dans notre cas, les femelles) l'opportunité de choisir son partenaire sexuel. Chez les schistosomes, ces deux effets du biais de sex ratio en faveur des mâles peuvent être observés. **Concernant la compétition entre mâles schistosomes**, à un niveau inter spécifique, elle a été proposée comme étant une conséquence du biais de sex ratio en faveur des mâles (Morand and Muller-Graf, 2000; Tchuem Tchuente et al., 1993; Tchuem Tchuente et al., 1995). A un niveau intraspécifique, une étude récente a montré que la taille des mâles était positivement liée au succès reproducteur ce qui va dans le sens d'une compétition entre mâles et d'un choix des femelles pour les mâles les plus gros (Steinauer, 2009). Un autre élément est intéressant : comme prédit par la théorie de la sélection sexuelle, il existe plus de variations génétiques (à partir de marqueurs moléculaires neutres) entre les mâles schistosomes qu'entre les femelles schistosomes (Prugnolle et al., 2002). **Concernant le choix des femelles schistosomes**, une préférence des femelles a été démontrée pour les mâles les plus dissimilaires (d'un point de vue génétique) à elles après un second choix, avec peu d'effet de la densité en mâles donc de la compétition entre mâles (cf. Chap II) (Beltran et al., 2008a). Ce résultat suppose un choix de la femelle.

Les changements de partenaire, perçus comme étant le résultat d'un second choix (Choudhury, 1995), peuvent augmenter dans des conditions de sex ratio biaisé en faveur des mâles (Maness and Anderson, 2007). La première étude expérimentale de changements de partenaire chez les schistosomes révèle que peu de changements de partenaire ont lieu jusqu'à ce que le nombre de mâles rivaux soit

supérieur au nombre de mâles déjà accouplés, suggérant un rôle de la compétition entre mâles dans les changements de partenaire (Pica-Mattoccia et al., 2000). L'étude expérimentale, détaillée en III.2, permet de tester le lien entre biais de sex ratio et changements de partenaire et révèle que plus le biais de sex ratio est en faveur des mâles, plus il y a de changements de partenaire (Beltran et al., 2009a) (cf. III.2 pour plus de détails).

Effet du biais de sex ratio en faveur des mâles sur la séquestration

La séquestration empêche l'accès par des rivaux au partenaire de reproduction (Buss, 1988). Cette stratégie peut aller de la simple vigilance à une réelle violence et a été reconnue pour être une force majeure de la sélection sexuelle, au même titre que la compétition entre les mâles et le choix des femelles (Clutton-Brock and Parker, 1995). La séquestration a principalement lieu lorsque le sex ratio est biaisé en faveur des mâles et peut se manifester de diverses manières : par un mâle maintenant sa femelle par une garde physique, des copulations forcées, du harcèlement ou des punitions (Clutton-Brock and Parker, 1995). Les conséquences de cette séquestration peuvent être une diminution de la valeur sélective des femelles et/ou de leur descendance. Par exemple, chez le lézard, *Lacerta vivipara*, les agressions des mâles lors de l'accouplement avec les femelles diminuent la viabilité des descendants et des femelles adultes et la fécondité de ces femelles (Le Galliard et al., 2005).

Chez les schistosomes, la séquestration a été proposée comme étant une stratégie de maintien de la monogamie (cf. Chap. I) (Beltran and Boissier, 2008) et pourrait diminuer la valeur sélective de la femelle. Cette séquestration pourrait être le résultat de la compétition entre les mâles schistosomes et donc le résultat du biais de sex ratio en faveur des mâles. Une diminution du succès de développement des femelles (mesuré par l'infectivité des cercaires femelles) a été observée chez les schistosomes et était liée à des conditions d'excès de mâles, l'optimum d'infectivité des cercaires femelles étant observé pour un sex ratio adulte équilibré (Boissier and Mone, 2000). D'autres études ont révélé des diminutions de production d'œufs en présence d'un excès de mâles (Boissier et al., 1999; Damian and Chapman, 1983; Damian et al., 1985; Harrison et al., 1982). La séquestration *via* des changements de partenaire fréquents pourrait expliquer la baisse du nombre d'œufs produits par

femelle. Le fait que le taux de changements de partenaire augmente lorsque le biais de sex ratio en faveur des mâles augmente va dans le sens de cette hypothèse (Beltran et al., 2009a) (cf. III.1).

Effet du biais de sex ratio en faveur des mâles sur l'origine de la monogamie

L'association entre biais de sex ratio en faveur des mâles et système d'appariement monogame a été observée dans quelques groupes animaux comme les insectes (Monnin and Peeters, 1998), les araignées (Fromhage et al., 2008), les mollusques (Hoagland, 1978) et les poissons (Vollrath, 1998).

Les schistosomes présentent ces deux caractéristiques: monogamie et biais de sex ratio en faveur des mâles. Trois hypothèses ont été proposées pour expliquer l'origine du système monogame de ce parasite (cf. Chap I) (Beltran and Boissier, 2008). Plus récemment, un lien intéressant a été découvert entre monogamie et biais de sex ratio en faveur des mâles en utilisant un modèle de théorie des jeux (Fromhage et al., 2008). Ces auteurs suggèrent que la monogamie apparaît lorsque les mâles sont en excès et doivent faire face à une compétition intense avec d'autres mâles afin d'assurer leur succès de paternité. Comme l'investissement paternel et l'assurance de paternité vont souvent de pair (Kvarnemo, 2006), le biais de sex ratio en faveur des mâles peut donc fournir une explication complémentaire à l'apparition de la monogamie chez les schistosomes.

Male Biased Sex Ratio: Why and What Consequences for *Schistosoma* Genus?

Sophie Beltran and Jérôme Boissier *

UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD. Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, CBETM. Université de Perpignan. France.

*Corresponding author:

J. Boissier

*Laboratoire de Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, Centre de Biologie et d'Écologie Tropicale et Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

Email: boissier@univ-perp.fr

Tel: +33 4 68 66 20 50

Fax: +33 4 68 66 22 81

Abstract

Schistosomes cause the most significant helminth disease, and are intriguing because its sexual biology is quite unusual. They are gonochoric, instead of hermaphroditic, as is the rule in the other species of trematodes; their mating system is considered monogamous like only 1% of the living species and their sex ratio is male-biased. The first two enigma, gonochorism and monogamy, have recently been debated in this journal. So this paper aims to improve our understanding on the causes and consequences of the schistosome male-biased sex ratio. Schistosome gonochorism, monogamy and biased sex ratio are finally integrated in an evolutionary scheme.

An intriguing male-biased sex ratio

The ratio of males to females in a population (the sex ratio) is a key demographic parameter, and a central concept of evolution under sexual selection, predicting the intensity and direction of mate competition [1, 2]. In general, the sex ratio fluctuates around an equilibrium 1:1 (one male: one female) because of feedbacks when the ratio gets biased either way [3] (Box 1). However, several cases of non-equilibrated sex ratio, either male or female-biased, are commonly found in animal populations [4]. From an ecological point of view, a male-biased sex ratio is certainly more intriguing than a female-biased sex ratio. Indeed, in sexual populations, the female carries the capacity to replace herself but the male does not. Hence, there is a cost to the male. This does not mean that males contribute nothing to the production of offspring; it simply means that, for a given population size, if there are more males than females present, there are fewer offspring produced than in an equilibrium or in a female-biased sex ratio condition because the males in excess don't bear their own offspring [5]. Yet several cases of male-biased sex ratio, with significant consequences on populations' characteristics, are commonly reported in living animals from invertebrates to vertebrates [6-8].

Schistosoma genus includes 21 endoparasite species defined as socially monogamous [9, 10]. The distribution patterns of worms among their host and the pairing of adult schistosomes are of considerable importance in understanding the transmission dynamics of this parasite. In *Schistosoma* genus, sex ratio is known to be male-biased (Box 2). Practically all field studies have shown that naturally infected host present such bias whatever the *Schistosoma* and the host species examined (see Ref. [11] for synthesis). This bias has puzzled scientists for several years. A number of experimental [12-17] and analytical [18-23] studies have been proposed to try to explain (i.e proximal factors) this pattern, but the consequences (i.e. ultimate factors) of this male-biased sex ratio have rarely been explored. The present Opinion article proposes to improve our understanding of the causes and consequences of schistosomes' male-biased sex ratio in the light of recent results on the schistosome mating system and general theories on sex ratios. This manuscript focus on *Schistosoma* genus, and mainly *S. mansoni*, the most studied species in the genus.

Proximal factors of male-biased sex ratio in schistosomes

When does the schistosome sex ratio become male-biased?

A biased sex ratio may arise at different stages in the animal life cycle, including fertilisation (primary sex ratio), birth (secondary sex ratio) and maturity (tertiary sex ratio) [24]. Because it is difficult to tell them apart, primary and secondary sex ratio are often mixed up and usually called 'primary sex ratio. Male-biased primary sex ratio has been observed in several animal groups, including birds [25], mammals [26], fish [27] and insects [28]. Male-biased tertiary sex ratio is also observed in several animal groups [6-8, 29].

Schistosomes possess a complex life cycle including two free living stages and two parasitic stages (Figure 1). Primary sex ratio in schistosome corresponds to the ratio of male to female eggs. Using sex-specific DNA probes, some authors observed the same number of male and female miracidia after hatching [30, 31]. To avoid any bias due to the performance in differential male vs female egg hatching, one study showed, using hybridisation histochemistry in a section of infected mouse liver, approximately an equal number of male and female eggs [32]. All these elements suggest that the primary sex ratio in schistosome is equilibrated. Conversely, tertiary adult sex ratio in schistosome is male-biased. The list of publications reporting experimental male-biased sex ratios are too many to be exhaustive. A database constituted by 616 independent experiments has reported that 75% of these experiments present male-biased schistosome sex ratio [33]. Natural observations also showed that adult sex ratios of schistosomes are male-biased in different species, different localities and different host species [11]. For instance, for *Schistosoma mansoni*, sex ratio varies from 1:1 to 3.21:1 with an average of 1.44:1. It is worth noting that several papers report influences of parasite and/or host on the magnitude of the bias (Box 3).

Why is the sex ratio of the schistosomes male-biased?

In animal kingdom, a bias in sex ratio may have originated because of environmental and/or genetic factors. Sex ratio is well known to be controlled by environmental factors, such as the temperature in reptiles [7]. A difference in the susceptibility to predators and disease between male and female could also induce a bias in sex ratio [6, 34]. As far as genetic factors are concerned some pre- or post-fertilisation genetically determined mechanisms are known to control, in utero, the success of each sex and thus the sex ratio [35]. Sex differences in development or in behaviour are also genetic factors which could have an influence in the occurrence of biased sex ratio [6].

Several different sexual life-history traits, from egg hatching to adult maturation, could explain the schistosome male-biased tertiary sex ratio. These life history traits have been reviewed in laboratory-controlled conditions and only the higher male to female cercarial development success could explain the male-biased adult sex ratio [20]. Later, the same authors, using discrete time model, have estimated adult sex ratio, taking into account all the experimental published values on differential male and female life-history traits all along the parasite life cycle, and have confirmed that male-biased sex ratio originates inside the vertebrate host [11]. An interesting study compared male and female development success at different times after host exposure [14]. The authors did not detect any difference between male and female development success at Day 0 (ability to penetrate skin), Day 6 (arrival to the lung) or Day 14 (arrival in the liver). However, they found significantly more males than females at Day 28 (survival of adult stage). Male and female sexual dimorphism appears around Day 25 [33]. It has been hypothesised that the difference in size between sexes, the female being thinner than the male and thus less able to resist blood flow, could explain their difference in survival rate, and thus the male-biased sex ratio found in schistosomes [36]. Under this assumption, a return to equilibrated sex ratio would imply morphological changes to the female, whereas the female size is presumably functionally constrained by ovipositioning in small venules. Consequently, no return to equilibrated sex ratio would be possible. The origin and the magnitude of the sexual dimorphism in schistosomes have been extensively debated [37]. Authors showed a great variation in the sexual dimorphism according to the genera of schistosomatidae [37]. If the male-biased sex ratio is dependent upon sexual dimorphism, it would be expected to have an equilibrated sex ratio in species where sexual dimorphism is absent. A comparative analysis of sexual dimorphism and sex ratio values would enable this link to be tested.

Ultimate factors of biased sex ratio

The effect of male-biased sex ratio on male competition and associated female preferences

An excess of male compared to female adults in a population may have two effects in terms of sexual selection [38]. Indeed, a biased sex ratio is predicted to increase variability and competition between individuals in the abundant sex (i.e. male in male-biased sex ratio) and choosiness in the rare sex (i.e. female in male-biased sex ratio).

In schistosomes, these two effects of male-biased sex ratio, in terms of sexual selection, can be observed.

First, male competition, as a consequence of the male-biased sex ratio in schistosomes, has been proposed at interspecific level [36, 39]. Using comparative analyses on schistosomatidae, a trade-off between parasite muscles and testes in connection with a male-biased sex ratio was shown [36]. The authors proposed that the male-biased sex ratio drives male competition and the development of sexual dimorphism in schistosomatidae. Another study, using an experimental approach, showed that *S. mansoni* was more competitive than *S. intercalatum* at pairing [40]. At intraspecific level, a recent study showed that male body size was positively related to reproductive success, consistent with sexual selection via male-male competition and female choice for large males [41]. Another interesting point which agrees with the theory is that the expected consequence of male competition (i.e. more variation between males than females) has been shown in schistosomes using neutral genetic markers: males are more genetically dissimilar than females [42].

Second, male variation could be associated with female preferences. Female preferences have been shown using super-infection and mate switching rate quantification. Mate switching rate increased significantly when females were given the opportunity to increase genetic dissimilarity through re-mating with a new partner, independently of the intensity of male-male competition [43]. This last result therefore supposes female choice. However, mate switching is quite different to first mate. Indeed, mate switching can be seen as a form of extended mate choice by which individuals may improve their breeding status and/or correct the errors in their initial mate choice [44]. Assortative mating needs to be tested in male and female schistosome simultaneous infections.

The effect of male-biased sex ratio on mate switching rate

A bias in sex ratio in monogamous animals is expected to have two direct consequences. On the one hand, competition between individuals belonging to the sex in excess should be intense, and drive the occurrence of forced separation. On the other hand, individuals of the limiting sex should have a larger choice of alternative pairing options. For instance, mate switching in relation to male-biased sex ratio has been shown in Nazca boobies [45].

The first study on mate switching in schistosomes reported that very few separations occurred until the number of rival males exceeded that of paired males, suggesting the role of male competition [46]. Recently an experimental study specifically designed to test the link between sex ratio and mate switching rate showed that the more male-biased the sex ratio

was, the more the mate switching rate increased, whereas no such effect was observed under a female-biased sex ratio [47].

Male-biased sex ratio and mate guarding

Mate guarding refers to a strategy designed to both preserve access to a mate and to prevent the encroachment of intrasexual rivals [48]. This mate guarding can vary from simple vigilance to real violence by sexual coercion. Mate guarding has been recognized to be the third key force of sexual selection along with mate choice and mate competition [49]. Mate guarding mainly occurs when sex-ratio is male-biased and is commonly expressed by male coercing female via mate grasping, forced copulation, sexual harassment or punishment [49]. Resulting consequences of mate guarding could be a decrease in the fitness of the female and/or in its progeny. For instance, as a result of male aggression during mating, in male-biased population of the common lizard, *Lacerta vivipara* [29], the viability of yearling and adult females, and the fecundity of females decreases.

Male mate guarding in schistosomes, the muscular male guarding the thin female in a groove on its ventral side, has been suggested as the reason the monogamous mating system has been maintained [10] and could decrease female fitness. As in other animal groups [50], such as crustacean or insect, this male mate guarding in schistosomes could result from male-male competition as a consequence of the male-biased sex ratio. Because schistosome male mate guarding is part of its sexual biology, it is impossible to test whether mate-guarding induces a decrease in the fitness of the female and/or in its progeny. Interestingly, such decreases in female fitness have been observed in schistosomes and are related to male-biased sex ratio conditions. An optimal female development success (i.e. measured as female cercarial infectivity) was observed for an equilibrated sex ratio, but a decrease in female development success was observed with a male-biased sex ratio [16]. Other studies have shown that there is a decrease in egg production by the female when sex ratio is male-biased [20, 51-53]. This reduced female fecundity was observed in mice and baboons with established worm pairs and subsequently re-infected with unisexual infections [52, 53]. Sexual harassment via frequent mate switching could explain a decrease in the number of eggs produced by a female. The fact that mate switching frequency becomes greater with an increasing male-biased sex ratio agrees with this hypothesis [47].

Male-biased sex ratio and the origin of monogamy

Monogamy in association with male-biased sex ratio has been observed in some animal groups such as insects [54], arachnid [55], molluscs [56] and fish [57].

Schistosomes also possess these two peculiar features: monogamy and male-biased sex ratio. Three non exclusive hypotheses have been proposed to explain the origin of schistosome monogamy: female dispersion, the need for paternal care or the reverse polygyny threshold hypothesis [10]. More recently, using a game theory model, an interesting link was discovered between monogamy and male-biased sex ratio [55]. The authors suggested that monogamy occurs in male-biased sex ratio conditions, when males have to face up to competition from other males, in order to simply enhance their paternity success. Because parental investment and enhanced paternity are not mutually exclusive activities [58], male-biased sex ratio thus provides a complementary explanation for the occurrence of monogamy in schistosomes.

Concluding remarks

The sexual biology of *Schistosoma* genus present three unusual features: they are gonochoric among a typically hermaphroditic group, they are monogamous (as are only 1% of living species), and their sex ratio is male-biased. The Figure 2 considers these features in an evolutionary scenario from the separation of the sexes to the male-biased sex ratio and its consequences in term of sexual selection. Because this parasite alternates asexual multiplication and sexual reproduction, and can be manipulated in the lab, schistosome is a unique model for studying animal sexual biology. Moreover, because of this peculiar public health importance, new information is daily received, like genome sequencing. In the future, the studies of schistosome sexual biology will beneficiate from these latest scientific breakthroughs.

Acknowledgments

We much thank Michelle Steinaeur and André Théron for valuable and constructive comments on the manuscript. We apologize to those authors whose works could not be cited owing to space restrictions.

References

- 1 Jirotkul, M. (1999) Operational sex ratio influences female preference and male-male competition in guppies. *Anim. Behav.* 58, 287-294
- 2 Kvarnemo, C. and Ahnesjö, I. (1996) The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends Ecol. Evol.* 11, 404-408
- 3 Hamilton, W.D. (1967) Extraordinary sex ratios. A sex-ratio theory for sex linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology. *Science* 156, 477-488
- 4 Hardy, I.C. (2002) *Sex Ratios. Concepts and research methods.* Cambridge University Press
- 5 Maynard Smith, J. (1978) *The Evolution of Sex.* Cambridge University Press
- 6 Poulin, R. and Fitzgerald, G. (1989) Male-biased sex ratio in *Argulus canadensis* Wilson, 1916 (Crustacea: Branchiura) ectoparasitic on sticklebacks. *Can. J. Zool.* 67, 2078-2080
- 7 Wapstra, E., et al. (2009) Climate effects on offspring sex ratio in a viviparous lizard. *J. Anim. Ecol.* 78, 84-90
- 8 Allaine, D., et al. (2000) Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behav. Ecol.* 11, 507-514
- 9 Beltran, S. and Boissier, J. (2009) Are schistosomes socially and genetically monogamous? *Parasitol. Res.* 104, 481-483
- 10 Beltran, S. and Boissier, J. (2008) Schistosome monogamy: who, how, and why? *Trends Parasitol.* 24, 386-391
- 11 Moné, H. and Boissier, J. (2004) Sexual Biology of Schistosomes. *Adv. Parasitol.* 57, 89-189
- 12 Stirewalt, M.A. and Fregeau, W.A. (1968) Effect of selected experimental conditions on penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in mice. II. Parasite-related conditions. *Exp. Parasitol.* 22, 73-95
- 13 Evans, N.A. and Stirewalt, M.A. (1951) Variations in infectivity of cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 1, 19-33
- 14 Rowntree, S. and James, C. (1977) Single sex cercariae of *Schistosoma mansoni*, a comparison of male and female infectivity. *J. Helminthol.* 51, 69-70
- 15 Liberatos, J.D. (1987) *Schistosoma mansoni*: male-biased sex ratios in snails and mice. *Exp. Parasitol.* 64, 165-177
- 16 Boissier, J. and Mone, H. (2000) Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121, 379-383
- 17 Mitchell, G.F., et al. (1990) Studies on the sex ratio of worms in schistosome infections. *Parasitology* 101, 27-34

- 18 Dietz, K. (1975) A pairing process. *Theor. Popul. Biol.* 8, 81-86
- 19 May, R.M. (1977) Togetherness among schistosomes: its effects on the dynamics of the infection. *Math. Biosci.* 35, 301-343
- 20 Boissier, J., et al. (1999) A review of performance and pathogenicity of male and female *Schistosoma mansoni* during the life-cycle. *Parasitology* 119, 447-454
- 21 Boissier, J., et al. (2004) A model to explain the origin of a parasite sex-specific population structure. *Theor. Popul. Biol.* 66, 269-276
- 22 Boissier, J. and Mone, H. (2001) Relationship between worm burden and male proportion in *Schistosoma mansoni* experimentally infected rodents and primates. A meta-analytical approach. *Int. J. Parasitol.* 31, 1597-1599
- 23 Morand, S., et al. (1993) Pairing probability of schistosomes related to their distribution among the host population. *Ecology* 74, 2444-2449
- 24 Mayr, E. (1939) The sex ratio in wild birds. *Am. Nat.* 73, 156-179
- 25 Paul F, D. (2007) Adult sex ratios in wild bird populations. *Ibis* 149, 671-692
- 26 Toro, M.A., et al. (2006) Sex ratio variation in Iberian pigs. *Genetics* 173, 911-917
- 27 Ospina-Alvarez, N. and Piferrer, F. (2008) Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS ONE* 3, e2837
- 28 De Menten, L., et al. (2005) Dual mechanism of queen influence over sex ratio in the ant *Pheidole pallidula*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 58, 527-533
- 29 Le Galliard, J., et al. (2005) Sex ratio bias, male aggression, and population collapse in lizards. *PNAS* 102, 18231-18236
- 30 Liberatos, J.D. and Short, R.B. (1983) Identification of sex of schistosome larval stages. *J. Parasitol.* 69, 1084-1089
- 31 Gasser, R.B., et al. (1991) Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 255-258
- 32 Penschow, J.D., et al. (1993) Female-specific genomic PCR sequences from *Schistosoma mansoni* as probes for hybridization histochemistry. *Int. J. Parasitol.* 23, 407-409
- 33 Basch, P.F. (1990) Why do schistosomes have separate sexes ? *Parasitol. Today* 6, 160-163
- 34 Zuk, M. (2009) The sicker sex. *PLoS Pathog.* 5, e1000267
- 35 Davison, M.J. and Ward, S.J. (1998) Prenatal bias in sex ratios in a marsupial, *Antechinus agilis*. *Proc. Biol. Sci.* 265, 2095-2099

- 36 Morand, S. and Muller-Graf, C.D. (2000) Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. *Parasitology* 120, 45-56
- 37 Loker, E.S. and Brant, S.V. (2006) Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends Parasitol.* 22, 521-528
- 38 Kokko, H. and Jennions, M.D. (2008) Parental investment, sexual selection and sex ratios. *J. Evol. Biol.* 21, 919-948
- 39 Tchuem Tchuente, L.A., et al. (1995) Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology* 110, 45-52
- 40 Tchuem Tchuente, L.A., et al. (1993) Choice of mate, a reproductive isolating mechanism between *Schistosoma intercalatum* and in mixed infections. *Int. J. Parasitol.* 23, 179-185
- 41 Steinauer, M.L. (2009) The sex lives of parasites: Investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* (in press)
- 42 Prugnolle, F., et al. (2002) Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Mol. Ecol.* 11, 1231-1238
- 43 Beltran, S., et al. (2008) Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. *Plos One* 3, e3328. doi:3310.1371/journal.pone.0003328
- 44 Choudhury, S. (1995) Divorce in birds: a review of the hypotheses. *Anim. Behav.* 50, 413-429
- 45 Maness, T.J. and Anderson, D.J. (2007) Serial monogamy and sex ratio bias in Nazca boobies. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2047-2054
- 46 Pica-Mattoccia, L., et al. (2000) Changes of mate occur in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 120, 495-500
- 47 Beltran, S., et al. (2009) Adult sex ratio affects divorce rate in the monogamous endoparasite *Schistosoma mansoni*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* doi: 10.1007/s00265-009-0757-y
- 48 Buss, D.M. (1988) From vigilance to violence: Tactics of mate retention in American undergraduates. *Ethol. Sociobiol.* 9, 291-317
- 49 Clutton-Brock, T.H. and Parker, G.A. (1995) Sexual coercion in animal societies. *Anim. Behav.* 49, 1345-1365
- 50 Carroll, S.P. and Loye, J.E. (1990) Male-biased sex ratios, female promiscuity, and copulatory mate guarding in an aggregating tropical bug, *Dysdercus bimaculatus*. *J. Insect Behav.* 3, 33-48

- 51 Damian, R.T. and Chapman, R.W. (1983) The fecundity of *Schistosoma mansoni* in baboons, with evidence for a sex ratio effect. *J. Parasitol.* 69, 987-989
- 52 Harrison, R.A., et al. (1982) Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanisms which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. *Parasitology* 84, 93-110
- 53 Damian, R.T., et al. (1985) *Schistosoma mansoni*: parasitology and immunology of baboons vaccinated with irradiated cryopreserved schistosomula. *Int. J. Parasitol.* 15, 333-344
- 54 Monnin, T. and Peeters, C. (1998) Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *Anim. Behav.* 55, 299-306
- 55 Fromhage, L., et al. (2008) A model for the evolutionary maintenance of monogyny in spiders. *J. Theor. Biol.* 250, 524-531
- 56 Hoagland, K.E. (1978) Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the *Mollusca*. *Malacologia* 17 365-391
- 57 Vollrath, F. (1998) Dwarf males. *Trends Ecol. Evol.* 13, 159-163
- 58 Kvarnemo, C. (2006) Evolution and maintenance of male care: is increased paternity a neglected benefit of care? *Behav. Ecol.* 17, 144-148
- 59 Boissier, J. and Moné, H. (2001) Male-female larval interactions in *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata*. *Int. J. Parasitol.* 31, 352-358
- 60 Ree, G.H. (1982) Schistosomiasis and human behaviour. *Ecol. Dis.* 1, 131-133
- 61 Dumont, M., et al. (2007) Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 101, 247-252
- 62 Boissier, J., et al. (2003) Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 91, 144-150
- 63 Nino Incani, R., et al. (2001) Parasite and vertebrate host genetic heterogeneity determine the outcome of infection by *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 87, 131-137
- 64 de Souza, C.P., et al. (1996) *Schistosoma mansoni*: the sex ratios of worms in animals infected with cercariae from three species of *Biomphalaria*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38, 141-145
- 65 Zavodna, M., et al. (2008) Effects of intermediate host genetic background on parasite transmission dynamics: a case study using *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 120, 57-61
- 66 Moné, H. (1997) Change in schistosome sex ratio under the influence of a biotic environmental-related factor. *J. Parasitol.* 83, 220-223

Box 1. Fisher's principle

Fisher's principle [3] explains why the sex ratio of most species is equilibrated. Indeed, let us suppose that in a population the male offspring is less numerous than the female offspring: the population includes fewer males than females. In these circumstances, the male chances of pairing are higher than the female. Consequently, this male can expect to have more offspring than the female. Therefore parents genetically willing to produce males have a tendency to have a higher number of grandsons than the average. Consequently, the genes which tend to produce males spread and the male offspring becomes more frequent. When the sex-ratio approaches 1:1, the advantage given to the production of males decreases until it disappears completely. This reasoning is identical if the roles of females and males are reversed. Consequently, 1:1 is the sex-ratio of equilibrium; it is the evolutionary stable strategy. 'Fischer's principle' of the sex ratio states that the sex ratio is in equilibrium when, in a population, the total efforts spent on the production of offspring are equal for the two sexes [3]. Sex ratios that are 1:1 are hence known as 'Fisherian', and those that are not 1:1 are 'non-Fisherian' or 'extraordinary' and occur because they break the assumptions made in Fisher's model [3].

Box 2. Male-biased sex ratio in schistosomes: fact or artefact?

The great majority of studies reporting male-biased sex ratio in schistosomes are experimental [59]. In the field, it has been shown that sex ratio is male-biased when schistosome intensity is low; but sex ratio tends to be equilibrated when parasite intensity increases [23]. One of the important differences between experimental and field conditions is the course of the infection. Experimental studies mainly concern one single mass infection and not a succession of repeated light infections (called 'trickle infections') to which it is believed that vertebrate hosts are normally exposed [60]. We can hypothesize that primary infections in the field present the same exposure pattern as experimental infections and thus similarly produce a male-biased schistosome sex ratio. This hypothesis is congruent with the link between the low worm intensity and the male-biased sex ratio observed in the study of Morand et al. [23]. Therefore the equilibration of sex ratio would result from the successive trickle infections and the resulting increase in worm intensity. This supposes that, during the course of infection, males would be less and less infectious whereas females would keep the same infectivity. The fact that successive infections with only male parasites (and not with only female parasites) would induce a decrease in parasite infectivity supports this hypothesis [61]. The difference

between male and female protectivities could originate from the higher inflammatory reaction induced by males compared to females [62]. Finally, the male-biased sex ratio in schistosome should only be a question of time: a newly infected host may present a male-biased schistosome sex ratio, but the sex ratio will become equilibrated with subsequent infections. Globally, in field condition, the meta-population of schistosomes has a male-biased sex ratio. Indeed, on 207 infected rats captured, the sex ratio was 1.45 (3,830 males for 2,638 females) [23]. Moreover, such male-bias has also been observed whatever the *Schistosoma* and the host species examined.

Box 3. Variation of the male-biased sex ratio in schistosomes

Parasite and host are known to influence the sex ratio in schistosomes:

* Parasite, strain or species, are known to influence the schistosome sex ratio. At intra-specific level it has been shown that different *S. mansoni* strains, corresponding to different localities, present different sex ratio [63]. At inter-specific level the sex ratio of adult schistosomes is also variable. The means of sex ratios, weighted by the number of naturally infected hosts examined, were 1.02, 1.44, 1.69, 1.70 and 1.99 for *S. incognitum*, *S. mansoni*, *S. matthei*, *S. japonicum* and *S. bovis*, respectively [11].

* Host, vertebrate or invertebrate, could also influence the schistosome sex ratio. In a meta-analytical study, including a total of 5,855 examined animals, the authors showed that sex ratios vary according to the definitive host, whether it is rat, mouse, hamster or monkey [59]. More surprising is the influence of the intermediate host [64, 65] or the presence of nonvector mollusc [66] on the adult sex ratio. At intra-specific scale, the genetic background of the *B. glabrata* mollusc host also affects the sex ratios of parasites in the subsequent host [65]. The authors showed that when parasites first develop in their native intermediate mollusc hosts, the adult sex ratio is male-biased; however, when parasites first develop in a host of a different genetic background (laboratory mollusc), the sex ratio becomes female-biased. At interspecific scale, the sex ratio of adult worms varies from 1.1 to 2.6 according to the species of the intermediate host (*B. tenagophile*, *B. straminea* or *B. glabrata*) in which the parasite first developed [64]. Finally, the schistosome sex ratio is also influenced by the presence in the mollusc host environment of a nonvector competitor mollusc [66]. The author demonstrates that the presence of *Marisa cornuarietis* is responsible for enhanced growth of *B. glabrata* and for a more male-biased sex ratio of adult schistosomes [66]. Whatever the environment (strain, species or nonvector mollusc), we suggest that a variation in the

immunological responses of each snail towards male and female parasites may differentially filter the sexes that are successfully transmitted to the definitive host [65].

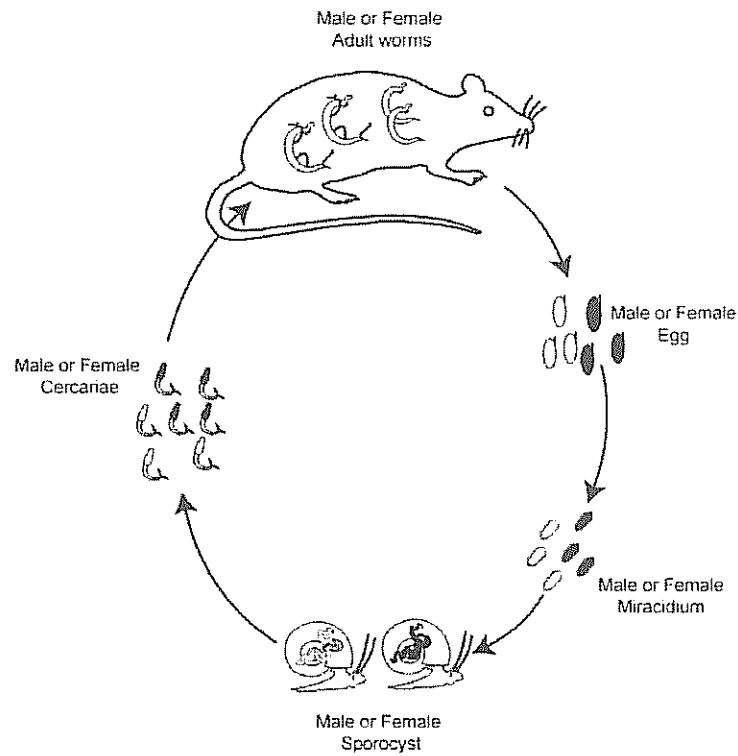


Figure 1. *Schistosoma mansoni* life cycle considering the separated sexes of the parasite. Sexual reproduction occurs between male and female adult worms in the vertebrate definitive host. Sex determination is syngamic, thus one egg produces one male or one female larva (called miracidium). This larva actively infects a mollusc intermediate host, transforms into intramolluscan larval stages (called sporocysts) and produces, by clonal multiplication, many unisexual larvae (called cercariae) that will actively infect the vertebrate definitive host and transform into adult worms.

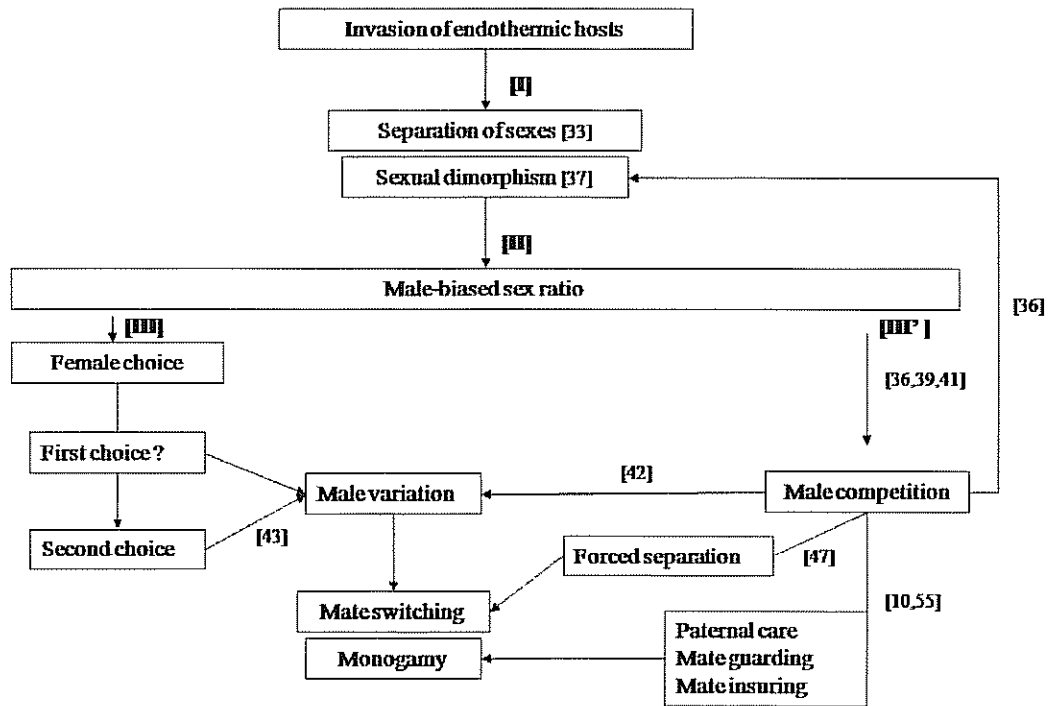


Figure 2. An evolutionary scheme for schistosome sexual biology. Step I. The endothermic host species invasion would simultaneously induce both the separation of sexes and the sexual dimorphism [33, 37]. Endotherms have a much higher immune system and higher rate of nutrient intake than ectotherms. On the one hand, separation of sexes and subsequent cross-fertilization would promote genetic diversity against a more sophisticated immune system [33]. On the other hand, a separation of the 'domestic' tasks via a sexual dimorphism would allow the colonisation of a rich but adverse habitat: the larger male being able to resist the blood flow of the hepatic portal system, and the thinner female being able to insinuate into the tiniest venules to release eggs [37]. Therefore, sexual dimorphism would result from the natural selection: the gonochoric dimorphic individuals surviving and reproducing better than hermaphroditic monomorphic ones. Step II. The sexual dimorphism would be the main actor of the male-biased sex ratio, the thin female carried along by the blood flow having a higher mortality rate than the muscular male [36]. Afterwards, the sexual selection would promote male competition (step III') and associated female choice (step III). Step III. The female first choice for distinct males has never been in evidence; however, the second choice after initial pairing has previously been shown [43]. Step III'. Male competition [36, 39, 41] main effect

could be the production of dissimilar males [42] initiating the female choice [43]. The male competition would also favour forced separation [47] and the maintenance of the monogamous mating system [10, 55]. Finally, if female preference is linked to male size, the male competition could have a feedback effect on sexual dimorphism [36]. The numbers in square bracket are the relevant publication on the subject.

III. 2. Publication : « Adult sex ratio affects divorce rate in the monogamous endoparasite *Schistosoma mansoni* » Behavioral Ecology and Sociobiology, 63:1363-1368 (2009).

Le taux de changements de partenaire varie suivant les espèces monogames mais aussi à l'intérieur de ces espèces. Alors que le biais de sex ratio peut avoir de fortes conséquences sur le système d'appariement, peu d'études ont tenté de comprendre (et encore moins expérimentalement) l'impact de ce biais de sex ratio sur le taux de changements de partenaire chez les espèces monogames. Nous avons vu dans le chapitre II, que des changements de partenaire étaient observés, notamment dans des conditions de biais de sex ratio en faveur des mâles. D'ailleurs en conditions naturelles, les populations de *S. mansoni* présentent un biais de sex ratio en faveur de mâles à l'intérieur de l'hôte vertébré (Morand et al., 1993).

Dans cet article, nous testons l'influence d'un biais de sex ratio à la fois en faveur des mâles puis en faveur des femelles, en faisant varier ce biais expérimentalement (variation de la densité en prétendants mâles puis femelles à la ré-infestation), en utilisant des infestations d'hôtes définitifs contrôlées avec des populations clonales de cercaires (figure 8). Les résultats montrent que plus il y a de mâles prétendants (i.e. en condition de biais de sex ratio en faveur des mâles), plus il y a de changements de partenaire, alors qu'en condition de biais de sex ratio en faveur des femelles, aucun effet du nombre de femelles prétendantes n'est observé. Dans cette étude, et pour la première fois, nous avons montré, en manipulant le sex ratio, que le taux de changements de partenaire augmente en condition de biais de sex ratio en faveur des mâles chez une espèce monogame.

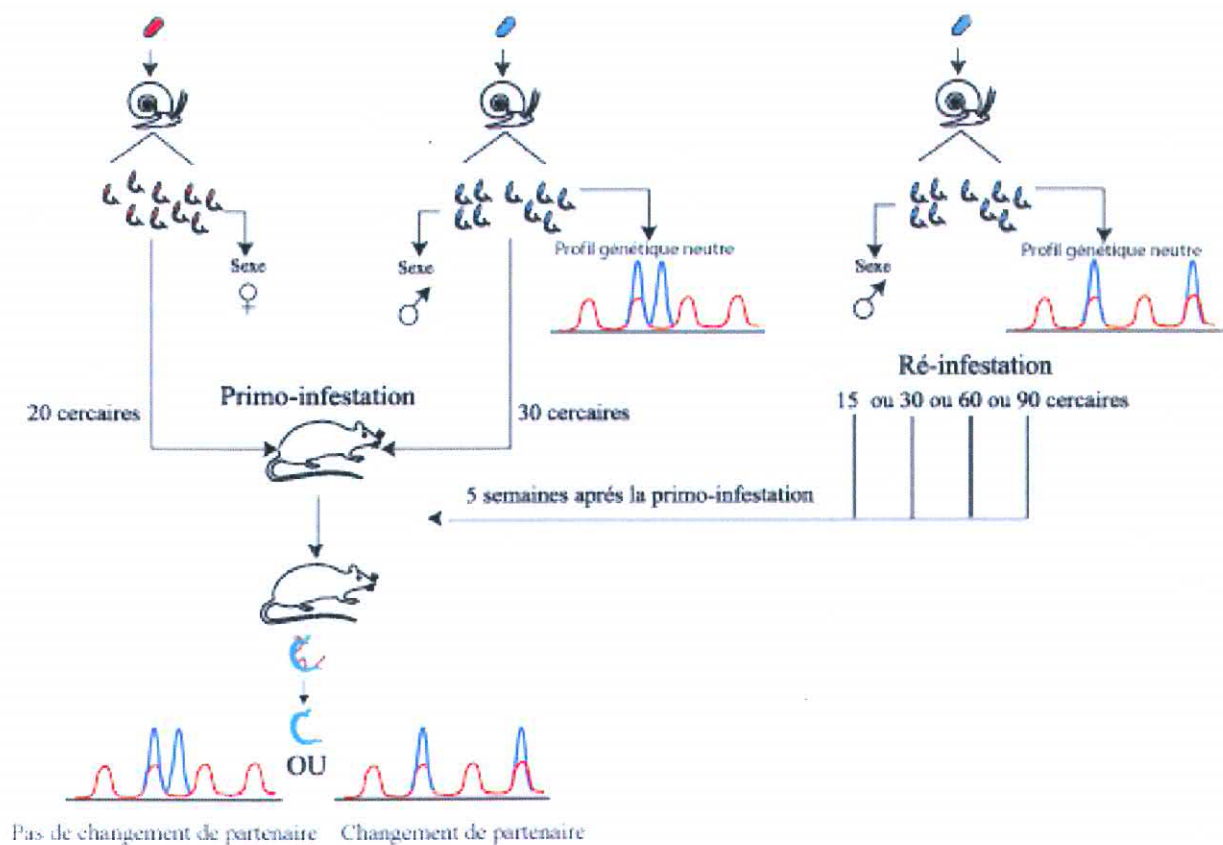


Figure 8: Schéma du protocole pour tester l'influence du biais de sex ratio en faveur des mâles. Le même protocole proposant différentes femelles à un mâle est également réalisé pour tester l'influence du biais de sex ratio en faveur des femelles

Ces résultats sont explicables par deux hypothèses non exclusives. La première hypothèse est que **la femelle serait le sexe qui choisit et serait responsable de l'initiation du changement de partenaire chez les schistosomes**. Il est souvent considéré que chez les espèces d'oiseaux monogames, l'initiation des divorces se réalise plus souvent par les femelles que par les mâles (voir Cézilly et al. 2000 pour synthèse). La deuxième hypothèse se base sur **la compétition entre mâles qui pourrait induire une récupération (ou un rapt) de la femelle par le mâle le plus compétitif** comme cela est observé chez plusieurs espèces présentant une séquestration pré copulatoire (Iribarne et al., 1996; Jormalainen and Merilaita, 1995; Jormalainen et al., 1994). Comme dit précédemment, ces deux hypothèses ne sont pas exclusives, le choix des femelles et la compétition entre les mâles peuvent contribuer au pattern d'accouplement (Andersson, 1994; Danchin et al., 2005; Iyengar and Starks, 2008). Les femelles pourraient par exemple choisir de ne pas résister à leur rapt par des mâles rivaux si elles percevaient une meilleure aptitude

phénotypique et/ou génétique de ces derniers. Les résultats du chapitre précédent vont d'ailleurs dans le sens d'un réel choix de la femelle pour une valeur génétique (changement de partenaire pour un mâle plus dissimilaire génétiquement à la femelle que ne l'est le partenaire initial), avec peu d'influence de la densité en prétendants mâles disponibles (donc peu d'influence de la compétition entre mâles) (Beltran et al., 2008a). De plus, des procédés chimiotactiques et/ou thigmotactiques ont été proposés pour expliquer l'attraction et le choix de partenaire chez les schistosomes (Tchuem Tchuente et al., 1996). La possibilité que ce type d'informations soit utilisé par les femelles pour choisir leur partenaire, ainsi que le rôle de chaque sexe dans l'initiation des changements de partenaire, restent à tester par des observations comportementales *via* des expériences *in vitro* par exemple.

Adult sex ratio affects divorce rate in the monogamous endoparasite *Schistosoma mansoni*

Sophie Beltran · Frank Cézilly · Jérôme Boissier

Received: 31 October 2008 / Revised: 10 March 2009 / Accepted: 11 March 2009 / Published online: 24 March 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract “Divorce” (mate switching) rate is known to vary largely both between and within socially monogamous species. Although the adult sex ratio can have an important influence on mating patterns, very few studies have investigated the influence of sex ratio on divorce rate in monogamous species, and even less so from an experimental point of view. In addition, most studies on the causes and consequences of divorce have been performed on vertebrate species, whereas data for invertebrate monogamous species remain scarce. *Schistosoma mansoni* is a monogamous endoparasite with a complex life cycle characterized by asexual reproduction in the intermediate host and sexual reproduction in the definitive host. In the wild, populations of *S. mansoni* inside their definitive hosts are characterized by a male-biased sex ratio. We studied the influence of experimentally varying the adult sex ratio on divorce rate in *S. mansoni*, using controlled infections of hosts with clonal populations. The more male-biased the sex ratio was, the more the divorce rate increased, whereas no such effect was observed under a female-biased sex ratio. In this study and for the first time, we showed, by handling the sex ratio, that the divorce rate increases in

adult male-biased sex ratio conditions in a monogamous species.

Keywords Adult sex ratio · Better option hypothesis · Forced divorce hypothesis · Monogamy · Schistosomes

Introduction

Social monogamy rarely implies permanent pair-bonds. In birds, for instance, where 90% of the species are socially monogamous, mate switching or “divorce” regularly occurs between breeding seasons (Black 1996; Dubois and Cézilly 2002). Although the literature on divorce in monogamous species is by far dominated by avian models (see Cézilly 2006 for a recent review), divorce has also been reported in monogamous primates (Palombit 1994), rodents (Sveinsson 1989), lizards (Bull 2000), and fishes (Kvarnemo et al. 2000; van Breukelen and Draud 2005).

Several adaptive and non-adaptive explanations have been advanced to explain the occurrence of divorce in monogamous species (see reviews in Choudhury 1995; Black 1996; Whiteman and Côté 2004). According to the “better option” hypothesis (Ens et al. 1993), divorce may result from a unilateral decision by one partner seeking to improve its breeding status through re-pairing with an individual of better quality than its current mate. Alternatively, divorce may be forced upon a pair by an usurper (the “forced divorce” hypothesis, Taborsky and Taborsky 1999). Both hypotheses predict that the frequency of divorce should increase with increasingly adult-biased sex ratios. Indeed, an excess of one sex in a population should have two direct consequences. On the one hand, individuals of the limiting sex should have a larger choice of alternative pairing options from which to choose from. On the other hand, competition

Communicated by T. Moore

S. Beltran · J. Boissier (✉)
Université de Perpignan,
Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Tropicale et
Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD,
52 Avenue Paul Alduy,
66860 Perpignan Cedex, France
e-mail: boissier@univ-perp.fr

F. Cézilly
Université de Bourgogne, Equipe Ecologie Evolutive,
UMR CNRS 5561 Biogéosciences,
6 Boulevard Gabriel,
21000 Dijon, France

between individuals belonging to the sex in excess should be intense, and drive the occurrence of forced divorce.

Curiously, very few empirical studies have investigated the influence of adult sex ratio on the frequency of divorce in monogamous species, and even less so from an experimental point of view. Taborsky and Taborsky (1999) attributed the exceptionally high divorce rate observed in one population of kiwis, *Apteryx* spp., to the unusual adult female-biased sex ratio present in that population. Similarly, Maness and Anderson (2007) related serial monogamy in Nazca boobies, *Sula granti*, to an adult male-biased sex ratio. Through experimentally creating single individuals in the Kentish plover, *Charadrius alexandrinus*, Székely et al. (1999) observed that re-mating opportunities were influenced by the adult male-biased sex ratio present in their study population. However, the adult sex ratio *per se* was not manipulated in that study. The study by Marehesan (2002) on feral pigeons, *Columba livia*, is the only one, to our knowledge, in which the adult sex ratio was experimentally manipulated. Divorce rates were found to be higher with a 2:1 adult sex ratio than when the sex ratio was even.

All of three above studies are restricted to bird species, although some correlational evidence suggests that divorce rate in human beings might also be influenced by variation in sex ratio (Fukurai and Alston 1992; South et al. 2001). Here, we experimentally investigate for the first time the influence of bias in adult sex ratio in a monogamous invertebrate, *Schistosoma mansoni*. The mating system of this endoparasite is best described as monogamy (Beltran and Boissier 2008), and cases of divorce have been previously evidenced (Pica-Mattoccia et al. 2000). In this last study, pairs were formed between a male and a female belonging to a single strain that was either resistant or sensitive to a drug, before new males from the opposite strain were introduced. The frequency of divorces reached 8% and 28%, when the established pairs were sensitive and resistant, respectively. However, as pointed out by the authors, the use of pharmacological markers might have induced a bias in the rate of mate change.

When mated or re-mated after divorce, schistosomes remain physically attached, making divorce rate relatively easy to score. Pairs form in the vertebrate definitive host, with the muscular male keeping its thin female in a groove on its ventral side called the gynecophoral canal. The life cycle of schistosomes is characterized by an asexual multiplication in a mollusc intermediate host followed by sexual reproduction in a vertebrate definitive host. The sexual reproduction ensures the production of new genotypes, whereas the asexual multiplication enables genotype proliferation (i.e., clonal expansion). It is therefore possible to perform experimental infections of vertebrate hosts with controlled larval populations, with genotype, sex ratio, and

density being predetermined before infection. Furthermore, in a schistosome infra-population (i.e., all parasites occurring in an individual host), all potential pairs do form, such that all unpaired individuals that are eventually found belong to only one sex. Thus, under an adult male-biased sex ratio, all unpaired individuals are males, while all females are mated. Although adult sex ratios in natural populations of *S. mansoni* tend to be male-biased (Liberatos 1987; Morand et al. 1993; Moné and Boissier 2004), no study so far has experimentally investigated the influence of a biased adult sex ratio on divorce rate in that species.

Materials and methods

Biological model

Schistosoma mansoni (Trematoda: Digenea) is a gonochoric monogamous parasite. Sexual reproduction occurs between male and female adult worms in the vertebrate definitive host. Sex determination is syngamic, meaning that one egg produces one male or one female larva (called a miracidium). The larva actively infects a mollusc intermediate host, before developing into intramolluscan larval stages (called sporocysts) and producing, through clonal multiplication, many unisexual larvae (called cercariae) that will actively infect the vertebrate definitive host and transform into adult worms. This parasite is unique in the sense that it uses both sexual reproduction to ensure the production of new genotypes and asexual multiplication to ensure the production of individuals harboring the same genotype (i.e., a clone). In this study, we used a *Schistosoma mansoni* strain isolated from naturally infected molluscs from Guadeloupe (French West Indies), a Guadeloupean strain of *Biomphalaria glabrata* as intermediate hosts, and the Swiss OF1 mouse strain as final hosts.

Production, sexing, and genotyping parasite clones

Methods for mollusc, mouse infections, and parasite recovery have been previously described (Boissier and Moné 2000). Briefly, mollusc infection consists in a simple contact in spring water between parasite larvae (miracidia) and molluscs, mouse infection is performed under general anesthesia and parasite larvae (cercariae) penetrate naturally through the host skin, and finally parasite recovery is performed by hepatic perfusion of the mouse. Four hundred and fifty six molluscs were individually exposed to one miracidium. Five weeks later, from these 456 exposed molluscs, 38 were infected and emitted cercariae. Two cercariae of each infected mollusc were sexed and genotyped using W1, a female-specific sequence only present on the W chromosome (Boissier et al. 2001) and

10 microsatellite markers, SMD28, L46951, R95529, SMD57 (Durand et al. 2000), SMBR8, SMBR13, SMBR14, SMBR16 (Rodrigues et al. 2007), SMC1, and SMDO11 (Curtis et al. 2001). From the 38 infected molluscs, 17 emitted female clonal cercarial populations and 21 emitted male clonal cercarial populations.

DNA extraction and PCR

We used the same DNA extraction procedure, irrespective of the developmental (adult or larval) stage (Beltran et al. 2008). PCR amplifications were performed in duplicate, using 10 microsatellite markers and one sex marker. PCR reactions were carried out in a total volume of 20 μ l containing 4 μ l of 5 \times buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0 at 25°C, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 0.2 μ M of each oligonucleotide primer, 200 μ M of each dNTP (Promega), 1 U of GoTaq polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 1 μ l of extracted DNA, and DNase-free water qsp 20 μ l. PCR program consisted in an initial denaturation phase at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, annealing temperature for 20 s (Table 1), 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 10 min in a thermocycleur (Bio-rad, Hercules, USA). For each marker, the forward PCR primer was 5' fluorescein labeled (Prologo, Cambridge, UK), allowing a precise analysis in an automated DNA sequencer. Microsatellite PCR products were diluted in Sample Loading Solution (Beckman Coulter, Villepinte, France), with a red labeled size standard (CEQTM DNA size standard kit, 400, Beckman Coulter) and electrophoresed using an automatic sequencer (CEQTM 8000, Beckman Coulter) with CEQTM 8000 sequence analysis software. Sizes of the alleles were calculated using the fragment analyzer package.

Experimental design

A first group of 19 mice was infected with 30 male and 20 female larvae, and a second group of 19 mice was infected

with 20 male and 30 female larvae. On this first infection, one sex was introduced in excess to ensure that all the individuals of the opposite sex would be paired. Three control mice in each group were not re-infected to check that all worms were effectively paired at the time the next step was initiated. Five weeks later, the remaining 16 mice in each group were re-infected (except control mice) with a different clonal population of larvae, using only clones belonging to the same sex than the one in excess during the first infection. Use of two different genotypes between first and second infection allowed discrimination between worms introduced at different time intervals. The influence of sex ratio on divorce rate was assessed by manipulating the adult sex ratio through the quantity of larvae introduced in the second infection. Four mice were independently re-infected, using either 15, 30, 60, or 90 larvae of a male clonal population (first group) or 15, 30, 60, or 90 larvae of a female clonal population (second group). Seven weeks after the second infection, paired and unpaired worms of the sex in excess were recovered and their genetic (microsatellite) profile was determined (see 'Production, sexing, and genotyping parasite clones'). Among paired worms, divorce was detected when a pair was formed between one worm (either male or female) belonging to the genotype used in the first infection and one worm (either female or male) belonging to the genotype used in the second infection. Adult sex ratio was defined as the percentage of males among the total number of worms (Kvarnemo and Ahnesjö 1996). Linear regressions weighted by the number of pairs formed in each mouse were performed to assess the influence of the adult sex ratio on the occurrence of divorce. These regressions were performed using SPSS 13.0 software.

Ethical note

Experiments were carried out under permit no. A 66040 from the French Ministère de l'Agriculture et de la Pêche

Table 1 Microsatellite markers and annealing temperatures used

Locus	GenBank accession number	Annealing temperature (°C)	Allele size (bp)	Authors
SMDO11	AF325698	60	351–383	Curtis et al. 2001
SMC1	AF325694	56	287–303	Curtis et al. 2001
SMD28	AF202966	52	240–244	Durand et al. 2000
L46951	L46951	48	202–208	Durand et al. 2000
SMD57	AF202967	52.5	278–300	Durand et al. 2000
R95529	R95529	52.5	229–274	Durand et al. 2000
SMBR8	DQ448292	56	201–240	Rodrigues et al. 2007
SMBR13	DQ137790	60	213–245	Rodrigues et al. 2007
SMBR14	DQ514536	59.5	264–312	Rodrigues et al. 2007
SMBR16	LO4480	59.5	337–341	Rodrigues et al. 2007

and the French Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. The experimenter possesses the official certificate for animal experimentation delivered by both ministries (Décret no. 87-848; number of the authorization 007083). Housing, breeding, and animal care of the mice comply with national ethical requirements.

Results

In each of the three control mice infected with an excess of male larvae, all female worms were mated. Seven, six, and four paired, and 13, 10, and 15 unpaired male worms were recovered (adult sex ratio=74%, 73%, and 83%, respectively). In each of the three mice infected with an excess of female larvae, all male worms were mated. Five, nine, and five paired, and 10, 13, and 10 unpaired female worms are recovered (adult sex ratio=25%, 29%, and 25%, respectively). Differences between the number of larvae that were injected and that of larvae that were recovered are due to the action of the host's immune system.

Overall, a total of 352 unpaired and 143 paired worms were genotyped from the 32 experimental mice. Divorce rate was significantly higher when males were introduced in excess (33 cases of divorces out of 89 pairs) than when females were introduced in excess (seven cases of divorces out of 54 pairs) (Fisher exact test $p=0.002$). Figure 1 shows a significant influence of the adult sex ratio on divorce rate only when male worms were in excess ($R^2=0.788$, $p<0.001$). No link between the adult sex ratio and divorce rate was observed when female worms were in excess ($R^2=0.261$, $p=0.13$).

Discussion

Although the adult sex ratio can have an important influence on mating patterns (Debusse et al. 1999; Hardy

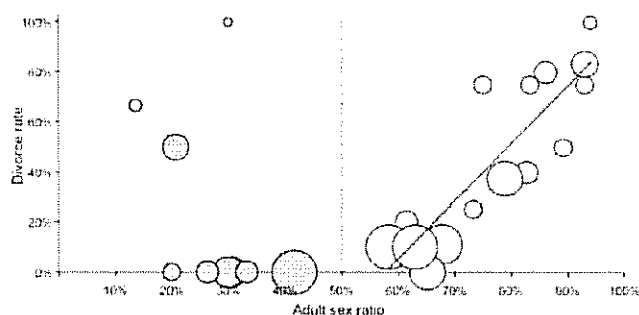


Fig. 1 Influence of the adult sex ratio on divorce rate in *Schistosoma mansoni*. The size of each circle is proportional to the number of pairs (from 2 to 10). Adult sex ratio is defined as the percentage of male worms among the total number of worms. Gray circles: female-biased sex ratio; white circles: male-biased sex ratio. The regression line (weighted by the number of pairs formed in each mouse) is for the white circles only

2002), little is known about its influence on divorce rate in monogamous species. A previous study on divorce in schistosomes reported that very few separations occurred until the number of rival males exceeded that of paired males (Pica-Mattoceia et al. 2000). Accordingly, we observed a linear effect of an adult male-biased sex ratio on divorce rate in *S. mansoni*. By contrast, an adult female-biased sex ratio had no significant influence on re-mating. Overall, our results are open to two alternative hypotheses. On the one hand, the observed pattern could indicate that females are the choosy sex and are responsible for initiating divorce in schistosomes. Interestingly, studies in monogamous bird species suggest that divorce tends to be initiated more often by females than by males (see Cézilly et al. 2000 for a review). On the other hand, male–male competition may result in successful takeover of paired females by unpaired males, as has been observed in several species with precopulatory mate guarding (Jormalainen et al. 1994; Jormalainen and Merilaita 1995; Iribarne et al. 1996).

Several elements are in favor of the “female choice” hypothesis. One would expect that females would divorce more often than males when given an opportunity to do so if male quality is more variable than female quality (Cézilly et al. 2000). The overall genetic variability is higher among male schistosomes than among females within the vertebrate host (Prugnolle et al. 2002), which suggests that male schistosomes vary more in quality than females. In addition, not only pairing is essential for the immature female to grow and reach a reproductive stage (Popiel and Basch 1995; LoVerde et al. 2004) but the male provides the female with various metabolites such as glucose or cholesterol (see LoVerde et al. 2004 for a review) that may affect her fecundity. Finally, males play a critical role in transporting the female from the place of mating to the place of egg-laying inside the vertebrate host, and assist her in pumping host blood in her intestine (LoVerde et al. 2004). All these elements suggest that females may gain various benefits from being choosy. Since the adult sex ratio tends to be male-biased in schistosomes (Morand et al. 1993), the availability of alternative pairing options could act to decrease the cost of divorce to females. Conversely, the high genetic similarity between females in the same host, combined with the high investment made by males in reproduction, suggests that, once paired, males may gain little or no benefit from initiating divorce.

According to the ‘forced divorce hypothesis’, however, divorce may not be initiated by either partner, but may be caused by the intrusion of a third individual, which displaces one member of the pair (Choudhury 1995; Taborsky and Taborsky 1999). In schistosomes, competition between males for access to females has been proposed at the interspecific level (Tchuem Tchuente et al. 1995). When mice were simultaneously infected with *S. mansoni*

and *S. intercalatum*, preponderance of homospecific pairs over heterospecific were observed (Tehuem Tehuente et al. 1993). However: when mice were first infected with homospecific *S. intercalatum* pairs and re-infected with rival males *S. mansoni*, greater heterospecific than homospecific paired were recovered (Tehuem Tehuente et al. 1995). A reasonable explanation for that result is not a preference of female *S. intercalatum* for male *S. mansoni*, but successful takeover of paired females by unpaired *S. mansoni* males. No such evidence exists at the intraspecific level, however. As previously mentioned, female schistosomes only acquire their sexual maturity when they are mated. A sexually immature female is about half in size than the mated one, whereas such a size difference does not exist between mated and non-mated males. One possibility, therefore, is that immature females of tiny size are poorly able at dislodging larger ones, thus explaining the relative scarcity of divorce under a female-biased sex ratio.

However, the two above interpretations are not mutually exclusive. Both female choice and male–male competition may contribute to determine mating patterns (Andersson 1994; Danchin and Cézilly 2008; Iyengar and Starks 2008). The possibility exists that female schistosomes choose not to resist takeover attempts by rival males if they perceive their higher phenotypic and/or genetic value. Chemotactic and/or thigmotactic processes have been proposed to explain attraction and mate choice in schistosomes (Tehuem Tehuente et al. 1996). The possibility that such information is used by paired females to assess alternative mating options, as well as the role of each sex in initiating divorce, remains to be evaluated through conducting behavioral observations and experiments in vitro.

Acknowledgments We wish to thank Bernard Dejean, Anne Rognon, and Pierre Tisseyre for technical assistance. This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS, and the Agence Nationale de la Recherche (Program Monogamix ANR-08-BLAN-0214-02).

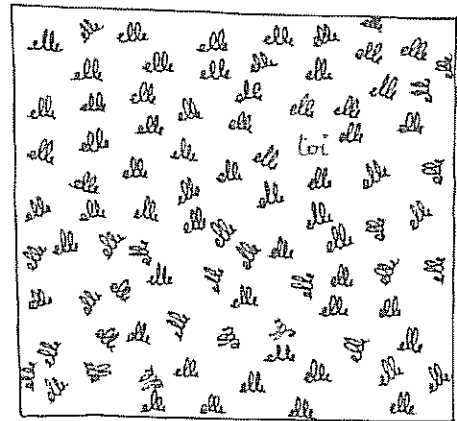
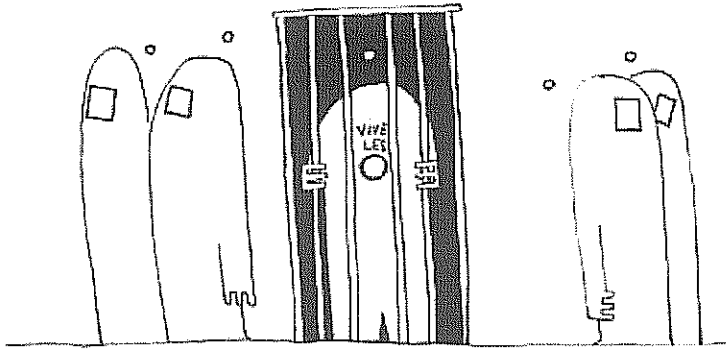
References

- Andersson M (1994) Sexual selection. Princeton University Press, Princeton
- Beltran S, Boissier J (2008) Schistosomes monogamy: who, how, and why? Trends Parasitol 24:386–391
- Beltran S, Galimier R, Allienne JF, Boissier J (2008) Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. Mem Inst Oswaldo Cruz 103:501–503
- Black JM (ed) (1996) Partnerships in birds. The study of monogamy. Oxford University Press, Oxford
- Boissier J, Moné H (2000) Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. Parasitology 121:379–383
- Boissier J, Durand P, Moné H (2001) PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: application for sexing clonal cercarial population. Mol Biochem Parasitol 112:139–141
- Bull MC (2000) Monogamy in lizards. Behav Process 51:7–20
- Cézilly F (2006) Le Paradoxe de l'Hippocampe. Une Histoire Naturelle de la Monogamie. Buchet-Chastel, Paris
- Cézilly F, Prévaut M, Dubois F, Faivre B (2000) Pair-bonding in birds and the active role of females: a critical review of the empirical evidence. Behav Process 51:83–92
- Choudhury S (1995) Divorce in birds: a review of the hypotheses. Anim Behav 50:413–429
- Curtis J, Sorensen RE, Kristen Page L, Minchella DJ (2001) Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for other schistosome species. Mol Ecol Notes 1:143–145
- Danchin E, Cézilly F (2008) Sexual selection: another evolutionary process. In: Danchin E, Giraldeau L-A, Cézilly F (eds) Behavioural ecology. Oxford University Press, Oxford, pp 363–426
- Debusse VJ, Addison JT, Reynolds JD (1999) The effects of sex-ratio on sexual competition in the European lobster. Anim Behav 58:973–981
- Dubois F, Cézilly F (2002) Breeding success and mate retention in birds: a meta-analysis. Behav Ecol Sociobiol 52:357–364
- Durand P, Sire C, Théron A (2000) Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. Mol Ecol 9:997–998
- Ens BJ, Salfriel UN, Harris MP (1993) Divorce in the long-lived and monogamous oystercatcher, *Haematopus ostralegus*: incompatibility or choosing the better option? Anim Behav 45:1199–1217
- Fukurai H, Alston JP (1992) Ecological determinants of divorce—a structural approach to the explanation of Japanese divorce. Soc Biol 39:257–277
- Hardy IC (2002) Sex ratios. Concepts and research methods. Cambridge University Press, Cambridge
- Iribarne O, Fernandez M, Armstrong D (1996) Mate choice in the amphipod *Eogammarus oelarii* Bousfield: the role of current velocity, random assortment, habitat heterogeneity and male's behavior. Mar Fresh Behav Physiol 27:223–237
- Iyengar VK, Starks BD (2008) Sexual selection in harems: male competition plays a larger role than female choice in an amphipod. Behav Ecol 19:642–649
- Jormalainen V, Merilaita S (1995) Female resistance and duration of mate-guarding in three aquatic peracarids (Crustacea). Behav Ecol Sociobiol 36:43–48
- Jormalainen V, Merilaita S, Tuomi J (1994) Male choice and male–male competition in *Idotea baltica* (Crustacea, Isopoda). Ethology 96:46–57
- Kvarnemo C, Ahnesjö I (1996) The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. Trends Ecol Evol 11:404–408
- Kvarnemo C, Moore GI, Jones AG, Nelson WS, Avise JC (2000) Monogamous pair bonds and mate switching in the Western Australian seahorse *Hippocampus subelongatus*. J Evol Biol 13:882–888
- Liberatos JD (1987) *Schistosoma mansoni*: male-biased sex ratios in snails and mice. Exp Parasitol 64:165–177
- LoVerde PT, Niles EG, Osman AA, Wu W (2004) *Schistosoma mansoni* male–female interactions. Can J Zool 82:357–374
- Maness TJ, Anderson DJ (2007) Serial monogamy and sex ratio bias in Nazca boobies. Proc R Soc Ser B 274:2047–2054
- Marchesan M (2002) Operational sex ratio and breeding strategies in the feral pigeon *Columba livia*. Ardea 90:249–257
- Moné H, Boissier J (2004) Sexual biology of schistosomes. Adv Parasitol 57:89–189
- Morand S, Pointier JP, Borel G, Théron A (1993) Pairing probability of schistosomes related to their distribution among the host population. Ecology 74:2444–2449
- Palombit R (1994) Pair bonds in monogamous apes: a comparison of the siamang *Hylobates syndactylus* and the white-handed gibbon *Hylobates lar*. Behaviour 133:321–356

- Pica-Mattoccia L, Moroni R, Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Cioli D (2000) Changes of mate occur in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 120:495–500
- Popiel I, Basch PF (1995) Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. *J Exp Zool* 232:141–150
- Pragnolle F, De Meeüs T, Durand P, Sire C, Théron A (2002) Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Mol Ecol* 11:1231–1238
- Rodrigues NB, Silyia MR, Pucci MM, Minchella DJ, Sorensen R, Loverde PT, Romanha AJ, Oliveira G (2007) Microsatellite-enriched genomic libraries as a source of polymorphic loci for *Schistosoma mansoni*. *Mol Ecol Notes* 7:263–265
- South SJ, Trent K, Shen Y (2001) Changing partners: toward a macrostructural-opportunity theory of marital dissolution. *J Marriage Fam* 63:743–754
- Svendsen GE (1989) Pair formation, duration of pair-bonds, and mate replacement in a population of beavers (*Castor canadensis*). *Can J Zool* 67:336–340
- Szekely T, Cuthill I, Kis J (1999) Brood desertion in Kentish plover: sex differences in remating opportunities. *Behav Ecol* 10:185–190
- Taborsky B, Taborsky M (1999) The mating system and stability of pairs in kiwi *Apteryx* spp. *J Avian Biol* 30:143–151
- Tchuem Tchuente LA, Imbert-Establet D, Delay B, Jourdan J (1993) Choice of mate, a reproductive isolating mechanism between *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni* in mixed infections. *Int J Parasitol* 23:179–185
- Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Imbert-Establet D, Jourdan J (1995) Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology* 110:45–52
- Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Combes C, Jourdan J (1996) Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful? *Parasitol Today* 12:231–236
- van Breukelen NA, Draud M (2005) The roles of male size and female eavesdropping in divorce in the monogamous convict cichlid (*Archocentrus nigrofasciatus*, Cichlidae). *Behaviour* 142:1023–1035
- Whiteman EA, Côté IM (2004) Monogamy in marine fishes. *Biol Rev* 79:351–375

Chapitre IV

Changements de partenaire et sélection sexuelle



FRO|SSARD

cherchez l'erreur ...

Réponses : Toutes les "elle"

Chapitre IV. Changements de partenaire et sélection sexuelle

Chez les schistosomes, la compétition entre les mâles et le choix des femelles, deux composantes de la sélection sexuelle, pourraient être impliquées dans les changements de partenaire. Les chapitres précédents ont confirmé cette implication. La compétition entre mâles proposée à un niveau interspécifique (Tchuem Tchuente et al., 1995) semble confirmée par l'influence du bias de sex ratio en faveur des mâles sur les changements de partenaire (publication détaillée en III.1) (Beltran et al., 2009a). Concernant le choix des femelles, la publication développée en II.2 confirme la possible implication d'un rôle actif des femelles dans les changements de partenaire (Beltran et al., 2008a).

Tout porte à croire que les femelles schistosomes sont le sexe qui choisit le partenaire de reproduction et que les mâles entrent en compétition pour accéder aux femelles. En effet, comme déjà mentionné en introduction du manuscrit, l'observation en milieu naturel d'une plus forte diversité génétique entre les mâles qu'entre les femelles dans l'hôte vertébré (Prugnolle et al., 2002) et le rôle crucial des mâles dans le transport (Basch, 1990), l'accès à la maturité des femelles, et la nutrition de celles-ci (Atkinson and Atkinson, 1980; Cornford and Huot, 1981; Gupta and Basch, 1987; Haseeb et al., 1989; Haseeb et al., 1985) sont des facteurs qui favorisent l'hypothèse selon laquelle les mâles adultes schistosomes varient plus que les femelles et celles-ci gagneraient à être le sexe qui choisit. Une question apparaît alors : à quels niveaux (du polymorphisme neutre au polymorphisme fonctionnel) les mâles schistosomes diffèrent-ils entre eux ?

Dans les chapitres précédents, nous avons pu voir que la dissimilarité génétique par rapport à la femelle était un facteur de choix du mâle par la femelle qui favorisait le changement de partenaire (Beltran et al., 2008a). La densité en prétendants (donc la compétition intrasexuelle potentielle) favorisait également ces changements (Beltran et al., 2009a). Dans ce chapitre, nous nous intéressons à plusieurs niveaux de polymorphisme permettant de discriminer les mâles adultes entre eux pour tenter de voir

sur quels caractères les mâles schistosomes diffèrent à l'échelle individuelle (Beltran et al., 2009c). Les différents niveaux de polymorphisme étudiés sont :

- le niveau de polymorphisme neutre de l'ADN, évalué à l'aide de marqueurs microsatellites ;
- le niveau de polymorphisme fonctionnel, *via* la comparaison des protéines synthétisées par l'étude du protéome de différents mâles adultes ;
- le niveau de polymorphisme phénotypique, estimé par l'efficacité d'immunisation des différents mâles adultes.

Cette approche, en plus de permettre l'étude des liens entre diversités neutre, fonctionnelle et phénotypique, pourrait permettre une meilleure compréhension de l'implication de ces niveaux de polymorphisme en terme de sélection sexuelle.

IV. Publication : « Molecular basis of genotype dependant concomitant immunity in *Schistosoma mansoni*: candidate proteins identified by a proteomic approach», en préparation (2009).

Dans cette étude, nous testons, dans un premier temps, (1) le lien entre diversité génétique neutre entre les mâles et polymorphisme phénotypique d'immunisation. Dans un deuxième temps, (2) nous comparons le protéome des trois mâles qui présentent à la fois une différence de génotype et une différence en terme d'efficacité d'immunisation, pour accéder à un niveau de polymorphisme fonctionnel et comprendre à une échelle encore différente ce qui diffère entre les différents mâles.

(1) D'un point de vue méthodologique (figure 9), l'expérience consiste à immuniser plusieurs lots de souris avec des clones adultes mâles différents (« clones immunisants » appelés A10, A26, A4, A22, A18, A36, A27 et A35) pour chaque lot de souris. Ces lots sont ensuite infestés avec un même clone mâle (« clone infestant » A10) qui présente avec les « clones immunisants » un gradient de similarité génétique neutre. Ainsi les différents lots de souris contiennent des couples « clone immunisant » / « clone infestant » présentant une très grande similarité génétique et graduellement, des couples « clone immunisant » / « clone infestant » jusqu'à très dissimilaires. Pour bien comprendre le protocole, il est nécessaire de redéfinir l'hypothèse d'immunité

concomitante selon laquelle les adultes parasites installés utiliseraient des antigènes du stade schistosomule pour activer le système immunitaire contre ce stade et empêcheraient ainsi le développement de ces individus en adultes sans en subir les conséquences directes (Smithers and Terry, 1969). Seuls les mâles déclenchent cette immunité et c'est l'ordre d'entrée des différents mâles utilisés dans des infestations successives qui détermine l'infectivité des différents individus, le premier entrant étant plus infestant que le suivant, etc. (Dumont et al., 2007). Dans le premier cas de notre expérimentation (grande similarité génétique entre « clone immunisant » / « clone infestant ») et d'après cette hypothèse d'immunité concomitante contre les mâles nouveaux entrants, le système immunitaire de l'hôte devrait être performant et donc l'infectivité du « clone infestant » devrait être faible. Dans la condition inverse, avec un couple « clone immunisant » / « clone infestant » très dissimilaire génétiquement, le système immunitaire de l'hôte devrait être peu performant et donc l'infectivité du « clone infestant » devrait être forte. Le résultat du modèle de régression logarithmique montre que la similarité génétique entre « clone immunisant » et « clone infestant » a une influence significative sur le taux d'infectivité du clone infestant (ddl=6, F=33.34, p=0.001, r²=0.847). La figure 1 de cette publication montre l'évolution du taux d'infectivité du parasite en fonction de cette similarité génétique entre « clone immunisant » et « clone infestant ». Le groupe contrôle, non immunisé, présente un taux d'infectivité de 31.33%. Dans les lots expérimentaux, ce taux varie entre 6.83% et 26.16% en fonction de la similarité entre « clone immunisant » et « clone infestant ». Plus le « clone immunisant » et le « clone infestant » sont dissimilaires génétiquement, plus le taux d'infectivité est élevé. Ces résultats vont dans le sens d'une immunité concomitante « génétique neutre dépendante », le système immunitaire lutte plus efficacement contre les individus mâles nouveaux entrants similaires à ceux auxquels il a déjà été confronté et « laisse plus passer » les individus mâles les plus différents, favorisant à son insu la diversité génétique du parasite. Cela suggère en outre qu'il existe des différences antigéniques entre les différents mâles (clones).

(2) Le protéome des trois mâles A10, A4 et A35, sélectionnés pour leurs différences génétiques et leur différence en terme d'efficacité d'immunisation, est analysé et

comparé (Figure 2 de l'article) afin de comprendre les bases moléculaires (à un niveau protéique) des différences entre mâles et de l'immunité concomitante observée. 85 protéines sont identifiées comme étant différentiellement (qualitativement et/ou quantitativement) exprimées entre les individus mâles adultes étudiés (Tables 1 et 2 de l'article). Plus de 50% de ces 85 protéines correspondent à des antigènes (déjà identifiées comme protéines antigéniques chez *S. mansoni*) ou à de potentiels antigènes (déjà identifiées comme protéines antigéniques chez d'autres parasites plathelminthes ou apicomplexes). Les différences observées entre les différents mâles au niveau de leurs protéines pourraient être dues à un polymorphisme de séquence ou à des différences à des niveaux transcriptionnel ou traductionnel, induisant le changement des propriétés physico-chimiques des protéines en question. Des différences sur un seul nucléotide (SNPs) sur des séquences de protéines antigéniques ont d'ailleurs récemment été démontrés (Simoes et al., 2007). Tout cela pourrait induire, entre les individus, une différence d'antigénicité qui pourrait expliquer les mécanismes à la base de l'immunité concomitante.

Les conséquences de cette immunité concomitante « sexe- et génotype-dépendante » en terme de « choix » du partenaire, ou plutôt de mécanisme à la base de ce « choix », sont discutées dans la partie Synthèse et perspectives.

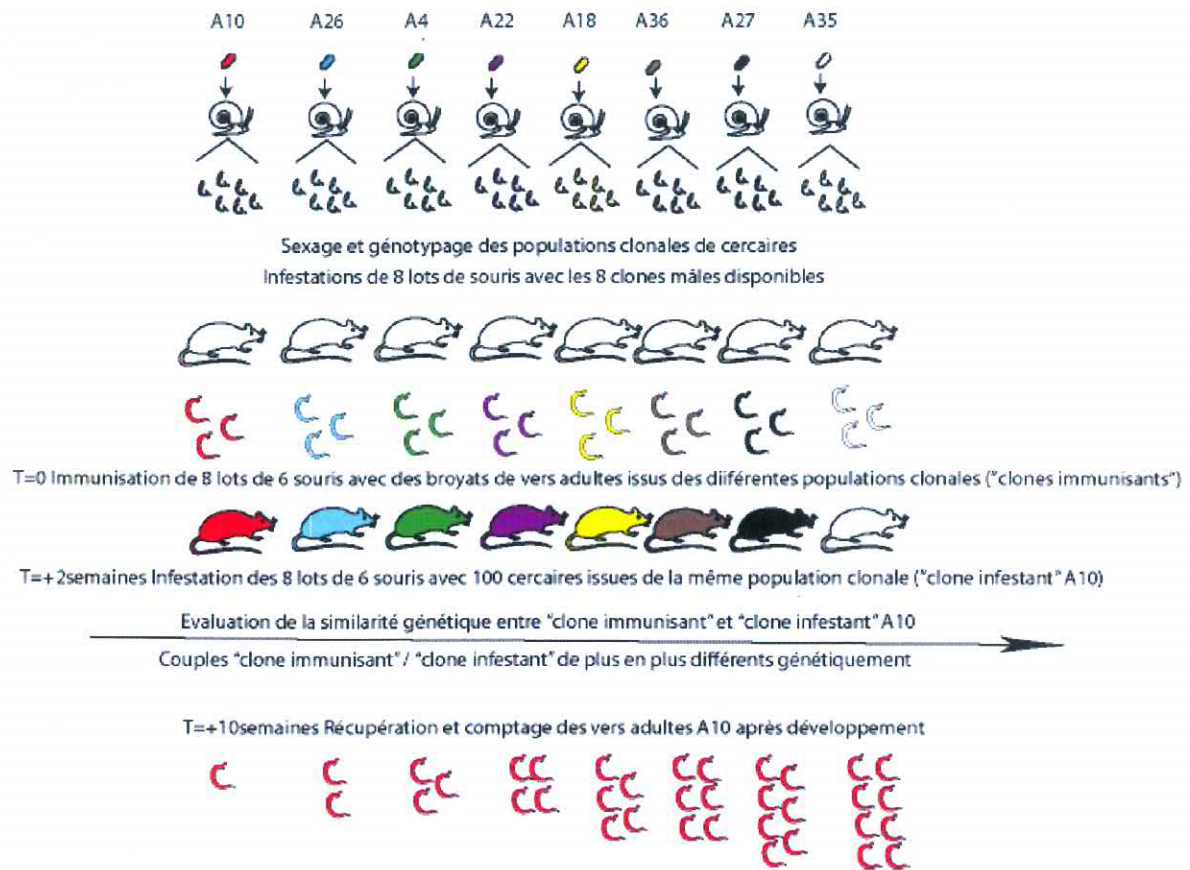


Figure 9: Schéma du protocole pour tester le lien entre diversité génétique neutre entre les mâles et polymorphisme phénotypique d'immunisation

Molecular basis of genotype dependant concomitant immunity in *Schistosoma mansoni*: candidate proteins identified by a proteomic approach.

Running head: Antigenic polymorphism in *Schistosoma mansoni*: a proteomic approach.

^aSophie Beltran, ^aBenjamin Gourbal, ^aJerome Boissier, ^aDavid Duval, ^bRaymond J Pierce, ^aAndré Theron, ^{a*}Guillaume Mitta,.

^a *Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive,*
UMR 5244, CNRS Université de Perpignan,
52 Ave Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

^b*Inserm, U 547, Université Lille 2, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59019 – Lille, France*

*Corresponding author: Guillaume Mitta

UMR 5244, CNRS Université de Perpignan,
52 Ave Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

Phone: 33 (0)4 68 66 21 85 ; Fax: 33 (0)4 68 66 22 81

e-mail: mitta@univ-perp.fr

Keywords: host-parasite interaction, concomitant immunity, antigenic polymorphism, *Schistosoma mansoni*, vaccine.

Abstract

Schistosomiasis continues to be a significant public health problem in tropical countries. Even though chemotherapy has been shown to be safe and effective to control morbidity, it does not reduce prevalence due to constant reinfections. In this context, it is essential to develop alternative therapeutic approach like vaccines. This field of vaccine development has experienced more failures than success. It could be attributed to a series of factors, including immunoevasion strategies used by schistosomes, the choice of vaccine candidates or the antigenic polymorphism that is rarely taken into account in immunization strategies against schistosomes.

Different works developed by research groups of the evolutionary biology field have revealed that antigenic polymorphism could occur within schistosome populations. These evidences were obtained by groups working on the phenomenon of concomitant immunity which is characterized by the ability of the host to mount an effective response during reinfection whilst being unable to clear a persistent burden of adult worms. They have shown that this protective effect is sex- and genotype-dependent. In the present study, we investigate and demonstrate the link between genetic dissimilarity and protective effect between male clones. In addition and in order to investigate the molecular basis of the antigenic differences between clones, we developed a comparative approach between the proteomes of three clones differing by their genotype and their protective effect.

The results obtained show a variation of protein content between clones. The identification of the corresponding proteins revealed a high proportion of proteins known to be antigenic or putatively antigenic and tegumental or secreted. Our results revealed that intraspecific differences of antigen expression must be taken into account in the future strategy in the field of vaccine development against *S. mansoni*.

INTRODUCTION

Schistosoma mansoni is a blood-dwelling trematode parasite which is the causative agent of the most severe human schistosomiasis, affecting 200 million people throughout the subtropical and tropical world [1]. It is not clear how the parasite succeeds in escaping the host immune system, giving rise to chronic persistent infections (possibly for decades). Treatment and control relies on chemotherapy with just one drug (praziquantel), being safe and effective against all *Schistosoma* species. Treatment of large populations and WHO strategies to more widely disseminate praziquantel are serious concerns regarding the potential praziquantel resistance emergence. Several reports of treatment failure in Africa [2,3], where isolates with reduced susceptibility to Praziquantel were obtained, have raised concerns about development of drug resistance. In this context, development of novel, effective drugs against schistosomiasis is presently needed to provide a range of treatments using different drug classes [4]. In parallel, it is essential to develop alternative therapeutic approach like vaccines [5]. Considering the peculiarities of schistosome infection, even the development of vaccines that partially diminish the worm burden or female fecundity could have a significant impact on the control of the disease. Nevertheless, there is currently no effective vaccine against schistosomiasis. Several candidates have been proposed in the 1980s and 1990s. Their discovery was based mainly on the recognition of these proteins by protective antibodies/serum or high immunogenicity [6-11]. Despite promising preliminary results, tests with different selected antigens were undertaken in the *Schistosoma mansoni*/mouse experimental system and showed disappointing results [5,12,13]. The failure to develop an efficacious schistosome vaccine could attributed to a series of non exclusive factors. The first is the complex immunoevasion strategies used by schistosomes to avoid elimination from their intravascular environment [14]. Furthermore, among the tested antigens, little are secreted or exposed on the apical membrane surface of the parasite. Only one (Sm 23) is exposed [15], although it is not one of the more abundant apical protein on the parasite surface [16]. Consequently, exploring the surface of the intra-mammalian stages of schistosomes for vaccine targets is a very attractive approach [17]. Another hypothesis was developed by a group working on the tegument protein tetraspanin-2 from *Schistosoma japonicum* [18]. Their results suggest that the high polymorphism of this molecule can influence the immunization process [18]. This last work is one of the rare work taking into account the polymorphism in immunization experiments against schistosomes. Different works developed by research groups of the

evolutionary biology field have revealed that antigenic polymorphism could occur within schistosome populations [19-21]. This phenomenon could also play a critical role in vaccine efficiency and explain some of the disappointing results (low protective effects) referenced above. These evidences were obtained by groups working on the phenomenon of concomitant immunity. Concomitant immunity is characterized by the ability of the host to mount an effective defence against larval stages whilst being unable to clear a persistent burden of adult worms [22,23]. These last studies showed that established adult worms might promote anti-larval immunity *via* the release of cross-reactive antigens, thus creating a barrier against continual infection and restricting burden size within the definitive host. Since the discovery of concomitant immunity, different studies have tested different modalities of infection on the success of schistosome reinfection. These studies revealed that convincing protective effect were obtained with repeated light infections (trickle infection) to which definitive hosts are submitted in the field. Most of these studies concerned monkeys [24-28] and mice [29-33]. Recently, we showed that unisexual male schistosome infection induced a stronger inflammatory response in mice compared to female one [19] and it has been shown by another group that different individual clones of cercariae, from mollusc infected with single miracidium, can induce from 10 to 67% of protection in mice to the same bisexual challenge [21]. All these results taken into account suggest that the protective effect should be genotype and sex-dependent. That's why we tested recently the protective effect of unisexual male or female trickle infections using cercariae coming from either the same or different genotypes [20]. The results showed that (i) only male trigger immunization and (ii) protective effect is genotype dependent. Indeed, successive infections with one male genotype induced a significant decrease in the infectivity of the parasite compared to successive infections with five male genotypes.

In the present study, we investigate and demonstrate the link between genetic dissimilarity and protective effect between male clones. In addition and in order to investigate the molecular basis of the antigenic differences between clones, we developed a comparative approach between the proteomes of three clones differing by their genotype and their protective effect.

MATERIAL AND METHODS

Host and parasite strains and experimental procedures

We used a *Schistosoma mansoni* strain isolated in May 2005 from naturally infected molluscs harvested in Guadeloupe (French West Indies), a Guadeloupean strain of *Biomphalaria glabrata* as intermediate hosts and the Swiss OF1 mouse strain as final hosts.

Methods for mollusc, mouse infections and parasite recovery have been previously described [34,35]. Four hundred and thirty six molluscs were individually exposed to one miracidium. Five weeks later, from these 436 exposed molluscs, 37 were infected because they emitted cercariae. Two cercariae of each infected mollusc were sexed and genotyped using W1 marker [36] and 12 microsatellite markers, R95529, SmD57, SCMSMOXII, SmD89, SMIMP25 [37], SmC1, SmDO11 [38], SMS7.1 [39], SmBR8, SmBR13, SmBR14, SmBR16 [40] (See supplementary file). From the 37 infected molluscs, 17 emitted female clonal cercarial populations, and 20 emitted male clonal cercarial populations. Eight of the 20 male clonal cercarial populations (named A4, A10, A18, A22, A26, A27, A35 and A36) were chosen to infect mice according to their genetic features (see § Neutral genetic polymorphism). Mouse infections were performed using 160 male cercariae in one time (i.e., single clone infections). Six mice were infected by clone of the parasite. 8 weeks later, we recovered the clonal male adult parasites. These adults are store at -80°C until use.

Neutral genetic polymorphism

Genetic dissimilarity between cercarial clones was estimated using the r coefficient of Wang [41], which considers the probability for two individuals to share an allele, given the estimated allele frequencies in the population. This coefficient varies between -1 and +1. When the r coefficient is equal to -1, the two individuals are very different; on the opposite, when the r coefficient is equal to +1, the two individuals are very similar. In the present study, the population considered consisted of all clonal populations obtained following mollusc infection ($n=37$). To compute the r coefficient of Wang, we checked for the absence of both departure from Hardy-Weinberg distribution and linkage disequilibria using Genepop version 3.4 [42]. The r coefficient was then calculated using the program SPAGeDi 1.0 [43]. The eight clones for

immunisation experiments were chosen as they were regularly distributed between the +1 and the -1 limits.

Immunisation experiments

To access the phenotypic polymorphism, we used an immunisation method in three steps to test the link between neutral genetic polymorphism and protective effect:

1. "Immune response caused". Adult worm extracts were prepared as previously described [44]. Briefly, worms were washed three times in cold saline solution (0.85% NaCl), homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) containing protease inhibitors (1 mM PMSF and 1 mM EDTA) in an ice bath and centrifuged at 12,000 g for 2 h at 4°C. The supernatant was recovered and stored in small aliquots at -80°C until used. Protein concentrations were determined by Bicinchoninic acid assay (Micro BC assay protein quantification kit, Uptima). Eight groups of 6 mice were immunized using worm antigens recovered from the 8 previously selected parasite clones. A total of 48 mice were subcutaneously immunized with 50 µg of worm antigen plus complete Freund's adjuvant (1:1 v/v) and, two weeks later, with 50 µg of worm antigen plus incomplete Freund's adjuvant. A control group of 6 mice was performed without worm antigen (only Freund's adjuvant was subcutaneously injected) to obtain the infectivity rate without immunization.
2. "Initiation of a neutral genetic gradient of dissimilarity between "immunising clone" and "infecting clone"". Two weeks after the last immunization, all mice were percutaneously infected with 100 cercariae of the same male clonal population (A10= "infecting clone") to obtain a neutral genetic gradient of dissimilarity between the eight "immunising clones" and the "infecting clone". The A10 clone has been chosen because enough cercariae (5400) were produced in the same day. The neutral genetic gradient of dissimilarity (r coefficient of Wang between A10 ("infecting clone") and the eight "immunizing clones" used (A10, A26, A4, A22, A18, A36, A27, and A35)) was: 1.000, 0.2085, -0.0144, -0.0299, -0.1139, -0.1390, -0.1727, and -0.4529 (see Figure 1).
3. "Phenotypic/immunisation polymorphism access". Thirty nine days after the infection, mice were sacrificed, worms were recovered and counted. For each groups of 6 mice, the infectivity rate has been measured as the average number of recovered worms/ introduced cercariae. The link between neutral genetic and phenotypic/immunisation polymorphism was assessed using logarithmic regression model.

Proteomic analysis

***Choice of clonal populations**

In order to investigate the molecular basis of the differences of protective effect between clones, we choose three of the 20 male clonal cercarial populations (named A4, A10 and A35) based on the genetic similarity between them. The *r* coefficients between the three male clonal cercarial populations chosen were -0.0144, 0.0177, and -0.4529 between A4-A10, A4-A35, and A10-A35 respectively. Consequently, A10 and A35 are the most genetically different clones and A4 has an “genetic intermediate position” between A10 and A35.

***Protein extraction, separation, detection and identification**

Adults clones originating from the same mouse after perfusion were incubated in 700 μ L of 2D lysis buffer (8M urea, 40mM Tris, 4% CHAPS, 60mM DTT) during 2 h at room temperature to prepare total protein extracts. The cell lysate was centrifuged at 15,000 \times g to pellet remaining cells and nuclear material. The protein concentration was assayed using the 2DQuant Kit (Amersham) and 100 μ g of protein were loaded on the first dimension on 17 cm Ready Strips IPG Strips, pH 3–10 non-linear gradient (Bio-Rad). Isoelectrofocusing (IEF) was performed as previously described [45] with a gradually increasing voltage to 8000V and running for 180,000Vh at 20 °C. Second dimension SDS-PAGE electrophoresis was performed in 12% acrylamide gels and proteins were visualized by silver stain [46]. 2D gels were scanned using a densitometer (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad). Although the silver stain is the most sensitive currently available, the protocol can generate staining differences within and between gels, notably in the case of background staining. Thus to avoid spurious differences, gels with similar spot intensities and background coloration were selected using an analytical approach. The density of 7 spots, present in all gels and distributed evenly over the entire gel surface was measured. The degree of similarity between gels was then obtained using a hierarchical classification procedure using the statistical software SPSS 10.0 (SPSS Inc.). A hierarchical tree was constructed and a group of the 12 most related gels (4 gels per clonal population of *S. mansoni* adult males) was selected to perform the comparative proteomic analysis. Replicate proteome images for the three clonal populations of *S. mansoni* male adults (A4, A10 and A35) were aligned and matched to generate a composite map image for each clonal population. Comparative analysis of digitized proteome maps was performed using the image analysis software PDQuest 7.4.0 (Bio-Rad). Significant differences between the patterns and/or intensities (at least two folds) of protein spots in A4, A10

and A35 proteomes were identified by pair-wise comparisons of spots between gel images. Statistical analysis associated with quantitative differences between spots was performed using a Mann-Whitney U test directly available in PDQuest 7.4.0 (Bio-Rad).

Gel plugs containing the proteins of interest were excised from a gel that was silver-stained using a method compatible with mass spectrometry [47]. Plugs were processed as described previously [45,48,49]. Digested proteins were analysed using a nanoscale capillary liquid chromatography Ultimate 3000 coupled to a LTQ-Orbitrap tandem mass spectrometer (nanoLC-MS/MS) [50,51].

The resulting peptide MS/MS spectra were processed and converted into peak lists in dta format using the SEQUEST algorithm for interrogation of protein or nucleotide sequence databases (Swiss prot-trembl and *Schistosoma mansoni* EST databases), using Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). No missed cleavages were allowed and some variable modifications were taken into account in the search such as Acetylation (Protein N-term), Oxidation and Dioxidation (M), Trioxidation (C). Searches were performed using an error on experimental peptide mass values of ± 15.0 ppm and an error for MS/MS fragment ion mass values of 1.0 Da..

Mascot results were validated using IRMa software (interpretation of Mascot results) developed by "EDyP Service" laboratory (Grenoble, France). IRMa avoids redundant proteins in the analysis and reduced false positive to less than 1%. A protein was considered to be correctly identified if at least three peptides were confidently matched with database sequences with a p-value < 0.001 for each peptide. In addition, an overall Mascot score was given by the software to the identification, a score greater than 100 was considered significant ($p < 0.05$) [52].

***Protein primary structure analysis**

Protein encoding gene identification was completed by querying peptide amino acid sequences against database (GenBank dbEST of *S. mansoni* 162 506 sequences) using the TBLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Sequences were imported in fasta format and were then assembled in contigs using the SequencherTM 4.5 software (Gene Codes Corporation). Precursors primary structure analysis associated with classical and non classical secretion pathways were performed using the SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and SecretomeP 2.0 programs (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) respectively (see Table 1, 2).

RESULTS

Link between genetic polymorphism and protective effect

We have tested the link between genetic similarity and protective effect. Results from the logarithmic regression model indicated that genetic similarity between "immunising clone" (A10 to A35) and "infecting clone A10" has significant influence on infectivity rate ($df=6$, $F=33.34$, $p=0.001$, $r^2=0.847$). Figure 1 shows the parasite infectivity rate according to the genetic similarity between "immunising clone" (A10 to A35) and "infecting clone A10". In the control group (without immunisation), the infectivity rate is 31.33%. In the experimental groups, where mice were firstly immunised with worm antigen and secondly infected with the "infecting clone A10", the infectivity rate ranged from 6.83% to 26.16% according to the genetic similarity between "immunising clone" (A10 to A35) and "infecting clone A10". The infectivity rate decreased when the similarity between "immunising clone" and "infecting clone A10" increased. These results suggest that genetically close related clones display antigenic similarities and that genetically distant clones are probably more dissimilar considering their antigenic properties. In order to investigate the molecular basis of these antigenic differences, we developed a global comparative proteomic approach.

To realise this approach we choose three of the 20 male clonal cercarial populations (named A4, A10 and A35) based on the genetic similarity between them. A10 and A35 are the most genetically different clones and A4 has a genetic intermediate position between A10 and A35. The r coefficients between the three male clonal cercarial populations chosen were -0.0144, 0.0177, and -0.4529 between A4-A10, A4-A35, and A10-A35 respectively.

Four independent samples for each clone were separated on 2D gels and representative gels are shown in Figure 2. Samples were compared using the 2D gel analysis software package PD Quest and spots presenting qualitative or quantitative (more than two-fold) differences were examined individually. Examples of quantitative and qualitative differences were presented in Figure 2. Qualitative differences were highlighted by spot 4111 present in A10 and A4 and absent in A35 and spot 7028 present in A35 and A4 and absent in A10 (Figure 2), those spots referred to Antigen SmA22 and Universal stress protein respectively (Table 1). Spot 5224 and 6243 were examples of quantitative differences (Figure 2). Spot 5224 was 4.92 and 3.19 folds more represented in A4 and A35 respectively by comparison to A10 (Table 1). Spot 6243 was 7.74 folds increase between A35 and A4 and absent in A10 (Figure 2, Table 2). Those spots

corresponded to Glutathione-S-transferase 26 (GST26) and Glutathione-S-transferase 28/proteasome respectively (Table1, Table 2).

Following the PD Quest analysis, all spots of interest were excised from the gels and submitted to mass spectrometry for identification. The results are listed in Figure 3, Table 1 and 2. For each spot, name(s) of protein(s) identified, species and database accession numbers, peptide number and MASCOT score are reported, for quantitative differences the ratio between clones was also indicated (Table 2).

The qualitative and quantitative analyses showed that 55 spots presented different patterns and/or intensities between the proteomes of the three clones. Among these 55 spots, 23 presented qualitative differences (Figure 3, Table 1) and 34 quantitative differences (Figure 3, Table 2). Among them, two spots (2319, 6243) were qualitatively and quantitatively differentially represented (Figure 3). The others (32 spots) were part of the 344 spots present in the 3 clones (Figure 3).

Within the 55 spots of interest, 85 proteins were identified after mass spectrometry analyses. All proteins with known function or presenting significant similarities for proteins with a known function were subsequently classified into distinct functional classes. Ten major functional classes were defined (Figure 4): (1) cellular detoxification (10.6% of the proteins identified); (2) protein metabolism (10.6%); (3) Receptor and cell signaling (17.6%); (4) cellular structure and cytoskeleton (12.9%); (5) carbohydrate metabolism (24.7%); (6) energy metabolism (3.5%); (7) chaperone and regulator (11.8%); (8) nucleotide metabolism (2.4%) and (9) chromatin structure (2.4%).

Among the 85 identified proteins, 25.8 % were already described as immunogen of *S. mansoni* (table 1 & 2). In addition, 29.4 % of the identified proteins display similarities for proteins identified as immunogen in other platyhelminthes or apicomplexan parasites. These both results show that a large proportion (more than 50%) of the proteins displaying quantitative or qualitative differences between clones corresponds to antigen or putative antigen.

As tegument and excreted/secreted proteins could play also a central role in the interaction between *S. mansoni* and mice immune system, we investigate the proportion of the identified proteins known or predicted to belong to these classes. Concerning the tegumental proteins, 17.6% of the identified proteins are known to be associated to the surface of *S. mansoni* and 3.5% are predicted to be membrane anchored. For the excreted/secreted proteins, 53 (62.4%) of the

identified proteins were known to be present in *Schistosoma* secretory/excretory products (table 1 and 2). Additionally, 14 (16.5%) were predicted to have signal peptides or to be secreted following non classical secretion pathways (table 1 and table 2). Thus a total of 67 proteins (78.8%) were already identified or predicted to be present in *S. mansoni* excretory- secretory products. To note that 87.2 % of identified or predicted excretory- secretory products correspond to antigen or putative antigen.

DISCUSSION

Using experimental trickle infection (repeated light infection) to which vertebrate hosts are submitted in the field, we showed recently that efficiency of immunization and protective effect against *Schistosoma* is sex and genotype dependent in mice [20]. Indeed, the results obtained in this last work showed that (i) only male trigger immunization and (ii) successive infections with one male genotype induced a significant decrease in the infectivity of the parasite compared to successive infections with five male different genotypes. The differences between male genotypes were identified with RAPD markers. Consequently, these results suggested that protective effect is dependent of the genotype. In order to better characterize the link between genotype differences and protective effect, we use in the present study a novel experimental design. Firstly, we quantify the genotype differences between different clones of schistosome by calculating their Wang coefficient (r , [41]) using microsatellite markers. Secondly, we choose several clones (8) that display a regular distribution from a high to a weak genetic similarity towards a clone (A10) used for challenge. After immunization of nine mice sets with adult protein extracts obtained from the 8 chosen clones and the A10 clones (used as a control of "maximal genetic similarity"), all mice were infected with the A10 clone and protective effect was quantified. The results obtained showed that protective effect is correlated to genetic similarity. The more the A10 clone is genetically close to the immunizing clone, the more the infectivity rate is low. Indeed, the infectivity rate ranged from 6.83% to 26.16% according to the genetic similarity between "immunising clone" and "infecting clone A10". These results highlight for the first time in *Schistosoma* a direct correlation between genetic similarity and protective effect. This suggests that antigenic differences exist between individuals in a *Schistosoma* population and we decide to investigate the molecular basis of these differences using a comparative proteomic approach targeted on three clones. We chose the A10 and A35 clones that

were the most distant genetically and a third clone A4 that display an intermediate position in the “genetic dissimilarity continuum” between A10 and A35.

The first interesting data obtained from our comparative proteomic approach is the identification of ten proteins previously described as major antigens of *S. mansoni* or *S. japonicum*. Among them, we find, the Glutathione-S-Transferase GST28 [53], the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [54], a heat shock 70 kDa protein homolog [55], the tegument antigen SmA22 [56], the major egg antigen p40 [57], the phosphoglycerate mutase [58], the GST 26 [59], the fructose biphosphate aldolase [60], and the 14-3-3 protein [61]. Consequently, more than 25 % of the proteins identified were already reported as immunogen of *S. mansoni* (table 1 & 2). In addition, nearly 30% of the identified proteins display similarities with proteins that have been described as antigenic in other parasites (table 1 & 2). These both results show that a large proportion (more than 50%) of the proteins identified corresponds to antigen or putative antigen. These proteins display qualitative and/or quantitative differences between clones. These differences can be attributed to differences in expression level or to polymorphism that can change physicochemical properties of the proteins. A recent study of M. Simoes and colleague reveals single nucleotide polymorphisms (SNPs) in several antigen of *S. mansoni* including GST [62]. This result highlights that protein differences between clones appear on antigenic proteins. This phenomenon has probably an impact on the antigenicity properties of each clone and could explain the differences observed concerning their protective effect. In addition, we can not exclude that some of the other proteins identified in the present study have antigenic properties. Consequently, some of these proteins could also participate to this hypothetic scheme.

As proteins secreted or exposed on the schistosome tegument (receptors, GPI-anchored proteins...) interact directly with the host immune system, they are choice candidates as putative antigens and immunomodulators. That's why we also investigate in the present study the proportion of the protein identified that are at the surface or putatively secreted. The tegumental proteins represents 17.6% of the protein identified. These proteins correspond to the tegument antigen SmA22 [56], the enolase [63], the GAPDH [63] and the annexin[16]. Concerning the secreted proteins, we studied the secretion features of all the protein identified by analysing their precursor using SignalP 3.0 and secretomeP 2.0 which can predict the classical and non-classical secretion pathways, respectively. Thirty percent of the protein identified are predicted to be either classical or a non-classical secreted protein. This proportion is very high considering that

approximately 0.3% of adult worm proteins could be excreted/secreted. Indeed, previous studies have shown that (i) approximately 3000 proteins can be detected in the proteome of adult worms [64] and (ii) 101 proteins were identified in the Excretory/Secretory proteome of the adult developmental stage [65]. These predictions obtained using bioinformatic tools (SignalP 3.0 and secretomeP 2.0) are largely confirmed comparing the proteins identified in the present study and proteins identified in different works studying the Excretory/Secretory proteome of schistosomes [65]. Indeed, 62.4% of the proteins identified in the present study were previously identified in the Excretory/Secretory proteome of schistosomes [65]. All these data taken together highlight that we identified in the present study a high proportion of tegumental and excreted/secreted (ES) proteins. Considering the direct exposition of these proteins to the host immune system, expression differences on these proteins (i) could be the source of differences in antigenic properties between clones and (ii) could explain consequently the difference of protective effect observed between clones.

Our findings have important implications in both epidemiological and evolutionary aspects [66]. The genotype dependent concomitant immunity we showed could help to understand some transmission and recruitment processes that shape the schistosome genetic population structures observed in the field as well their evolutionary significance. Indeed, it was expected a low levels of intra-host genetic variation in parasites including an asexual multiplication in intermediate hosts [67]. However, in natural populations of *S. mansoni* infecting wild rats in the Guadeloupean focus of murine schistosomiasis, Theron *et al.* [68] demonstrated a substantial genetic diversity within infrapopulations (e.g. 150 different multilocus genotypes in a single host) and a limited level of genotype repetitions (on average a genotype was present in two copies within a host). Such genotype dependent concomitant immunity we describe in this paper may favor this genetic variation through successive phases of infection by accumulation of different (dissimilar) genotypes during the life-time of vertebrate hosts, and compensate for the potential negative impact the thousands asexually produced cercariae should have on the adult parasite diversity in the vertebrate host. More specifically, schistosome adult infrapopulations are characterized by a genetic dispersion bias: male being more genetically dissimilar between them than females [69]. The fact that first-arrived males induced a genotype dependent negative effect, *via* the host immune system, on subsequent ones and, that females alones are unable to induce a protective immunity [20] could explained the sex-specific population genetic structure observed.

Finally, the increase in genetic heterogeneity among males would provide more choice for females which are known to choose their sexual partner according to their genetic dissimilarity [70]. All these mechanisms would have for consequences the increase of parasite genetic diversity which will provide advantages in the host-parasite evolutionary arms race.

In conclusion, in the present study we reveal antigenic differences between clones within a *S. mansoni* population and we investigate the proteomic basis of these differences. The results obtained show a variation of protein content between clones. The identification of the proteins involved in these qualitative and quantitative differences revealed a high proportion of proteins known to be antigenic or putatively antigenic and tegumental or secreted. These intrapopulation and *a fortiori* intraspecific differences of antigen expression must be taken into account in the future strategy in the field of vaccine development against *S. mansoni*. Indeed, multiple antigen strategies should be used to circumvent SNPs and/or quantitative differences on antigen expression between *S. mansoni* individuals.

Acknowledgement

This work was supported by the ANR (grant 25390 Schistophepigen), CNRS and UPVD. The mass spectrometry approaches used in this study was developed by EDyP service laboratory CEA / INSERM 0880 / UJF; 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

References

1. WHO (2002) TDR Strategic Direction for Research: Schistosomiasis. WHO Information.
2. Stelma FF, Talla I, Sow S, Kongs A, Niang M, et al. (1995) Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 53: 167-170.
3. Ismail M, Metwally A, Farghaly A, Bruce J, Tao LF, et al. (1996) Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *Am J Trop Med Hyg* 55: 214-218.
4. Hagan P, Appleton CC, Coles GC, Kusel JR, Tchuem-Tchuente LA (2004) Schistosomiasis control: keep taking the tablets. *Trends Parasitol* 20: 92-97.
5. McManus DP, Loukas A (2008) Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 21: 225-242.
6. Pearce EJ, La Flamme A, Sabin E, Brunet LR (1998) The initiation and function of Th2 responses during infection with *Schistosoma mansoni*. *Adv Exp Med Biol* 452: 67-73.
7. Soisson LM, Masterson CP, Tom TD, McNally MT, Lowell GH, et al. (1992) Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J Immunol* 149: 3612-3620.
8. Reynolds SR, Shoemaker CB, Harn DA (1992) T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 149: 3995-4001.
9. Reynolds SR, Dahl CE, Harn DA (1994) T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. *J Immunol* 152: 193-200.
10. Tandler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, et al. (1996) A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 269-273.
11. Boulanger D, Warter A, Trottein F, Mauny F, Bremond P, et al. (1995) Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. *Parasite Immunol* 17: 361-369.
12. Bergquist NR, Leonardo LR, Mitchell GF (2005) Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends Parasitol* 21: 112-117.

13. Pearce EJ (2003) Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Acta Trop* 86: 309-313.
14. Pearce EJ, MacDonald AS (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2: 499-511.
15. Wright MD, Davern KM, Mitchell GF (1991) The functional and immunological significance of some schistosome surface molecules. *Parasitol Today* 7: 56-58.
16. Braschi S, Wilson RA (2006) Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol Cell Proteomics* 5: 347-356.
17. DeMarco R, Verjovski-Almeida S (2009) Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discov Today* 14: 472-478.
18. Cai P, Bu L, Wang J, Wang Z, Zhong X, et al. (2008) Molecular characterization of *Schistosoma japonicum* tegument protein tetraspanin-2: sequence variation and possible implications for immune evasion. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 197-202.
19. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Mone H (2003) Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 91: 144-150.
20. Dumont M, Mone H, Mouahid G, Idris MA, Shaban M, et al. (2007) Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 101: 247-252.
21. Smith MA, Clegg JA (1979) Different levels of immunity to *Schistosoma mansoni* in the mouse: the role of variant cercariae. *Parasitology* 78: 311-321.
22. Smithers SR, Terry RJ (1967) Resistance to experimental infection with *Schistosoma mansoni* in rhesus monkeys induced by the transfer of adult worms. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 61: 517-533.
23. Smithers SR, Terry RJ (1969) Immunity in schistosomiasis. *Ann N Y Acad Sci* 160: 826-840.
24. Webbe G, James C (1973) Acquired resistance to *Schistosoma haematobium* in the baboon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 67: 28-29.
25. Damian RT, Greene ND, Suzuki T, Dean DA (1981) Schistosomiasis mansoni in baboons. V. Antibodies and immediate hypersensitivity in multiply infected *Papio cynocephalus*. *Am J Trop Med Hyg* 30: 836-843.

26. Sturrock RF, Cottrell BJ, Kimani R (1984) Observations on the ability of repeated, light exposures to *Schistosoma mansoni* cercariae to induce resistance to reinfection in Kenyan baboons (*Papio anubis*). *Parasitology* 88 (Pt 3): 505-514.
27. Reid GD, Sturrock RF, Harrison RA, Tarara RP (1995) *Schistosoma haematobium* in the baboon (*Papio anubis*): assessment of protection levels against either a single mass challenge or repeated trickle challenges after vaccination with irradiated schistosomula. *J Helminthol* 69: 139-147.
28. Farah IO, Nyindo M, Suleman MA, Nyaundi J, Kariuki TM, et al. (1997) *Schistosoma mansoni*: development and modulation of the granuloma after or multiple exposures in the baboon (*Papio cynocephalus anubis*). *Exp Parasitol* 86: 93-101.
29. el-Garem AA, Wassef SA, Habib H, Ghobrial SY (1970) Study of pulmonary involvement in *Schistosoma mansoni* infection in mice utilising single and repeated infection as well as single and repeated therapy. *J Egypt Med Assoc* 53: 203-213.
30. Moloney NA, Webbe G, Luty A (1984) Factors affecting the acquisition of resistance to *Schistosoma japonicum* in the mouse. I. The correlation between egg deposition and worm elimination. *Parasitology* 89 (Pt 2): 345-360.
31. Andrade ZA, De Azevedo TM (1987) A contribution to the study of acute schistosomiasis (an experimental trial). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 311-317.
32. Lewis FA, Kennell CJ, James SL (1987) Vaccine-induced immunity in mice against *Schistosoma mansoni* trickle cercarial infections. *Am J Trop Med Hyg* 37: 98-105.
33. Coelho PM, Mello RT, Pollom TE (1995) *Schistosoma mansoni*: reinfections and concomitant immunity in mice. Importance of perfusion time after challenge infection for evaluation of immunoprotection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 507-509.
34. Boissier J, Moné H (2000) Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121: 379-383.
35. Duvall RH, DeWitt WB (1967) An improved perfusion technique for recovering adult Schistosomes from laboratory animals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 16: 483-486.
36. Boissier J, Durand P, Moné H (2001) PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: application for sexing clonal cercarial population. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112: 139-141.

37. Durand P, Sire C, Theron A (2000) Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. *Molecular Ecology* 9: 997-998.
38. Curtis J, Sorensen RE, Page LK, Minchella DJ (2001) Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for other schistosome species. *Molecular Ecology Notes* 1: 143-145.
39. Blair L, Webster JP, Barker GC (2001) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schistosoma mansoni* from Africa. *Molecular Ecology Notes* 1: 93-95.
40. Rodrigues NB, Loverde PT, Romanha AJ, Oliveira G (2002) Characterization of new *Schistosoma mansoni* microsatellite loci in sequences obtained from public DNA databases and microsatellite enriched genomic libraries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 Suppl 1: 71-75.
41. Wang J (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203-1215.
42. Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2), a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
43. Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618-620.
44. Noya O, Fermin Z, Alarcon de Noya B, Losada S, Colmenares C, et al. (1995) Humoral immune response of children with chronic schistosomiasis. Isotype recognition of adult worm antigens. *Parasite Immunol* 17: 319-328.
45. Vergote D, Bouchut A, Sautiere PE, Roger E, Galinier R, et al. (2005) Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Int J Parasitol* 35: 215-224.
46. Patton WF (2002) Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 771: 3-31.
47. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-858.

48. Bouchut A, Roger E, Coustau C, Gourbal B, Mitta G (2006) Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of adhesion genes. *Int J Parasitol* 36: 175-184.
49. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J, et al. (2007) A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 6: 88-101.
50. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70: 437-473.
51. Ashton PD, Curwen RS, Wilson RA (2001) Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *Trends Parasitol* 17: 198-202.
52. Kayser JP, Vallet JL, Cerny RL (2004) Defining parameters for homology-tolerant database searching. *J Biomol Tech* 15: 285-295.
53. Balloul JM, Sondermeyer P, Dreyer D, Capron M, Grzych JM, et al. (1987) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 326: 149-153.
54. Goudot-Crozel V, Caillol D, Djabali M, Dessein AJ (1989) The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *J Exp Med* 170: 2065-2080.
55. Hedstrom R, Culpepper J, Harrison RA, Agabian N, Newport G (1987) A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein Hsp70. *J Exp Med* 165: 1430-1435.
56. Stein LD, David JR (1986) Cloning of a developmentally regulated tegument antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 20: 253-264.
57. Nene V, Dunne DW, Johnson KS, Taylor DW, Cordingley JS (1986) Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. *Mol Biochem Parasitol* 21: 179-188.
58. Zhou Y, Lin J, Yao L, Wang X, Shi Y, et al. (2008) [Cloning, expressing and characterizing of a phosphoglycerate mutase gene of *Schistosoma japonicum*]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24: 1550-1555.

59. Wu Z, Liu S, Zhang S, Tong H, Gao Z, et al. (2004) Persistence of the protective immunity to *Schistosoma japonicum* in Chinese yellow cattle induced by recombinant 26kDa glutathione-S-transferase (reSjc26GST). *Vet Parasitol* 123: 167-177.
60. El Ridi R, Tallima H (2009) *Schistosoma mansoni* ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis. *Vaccine* 27: 666-673.
61. Schechtman D, Tarrab-Hazdai R, Arnon R (2001) The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis. *Parasite Immunol* 23: 213-217.
62. Simoes M, Bahia D, Zerlotini A, Torres K, Artiguenave F, et al. (2007) Single nucleotide polymorphisms identification in expressed genes of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 154: 134-140.
63. Perez-Sanchez R, Valero ML, Ramajo-Hernandez A, Siles-Lucas M, Ramajo-Martin V, et al. (2008) A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. *Mol Biochem Parasitol* 161: 112-123.
64. Curwen RS, Ashton PD, Johnston DA, Wilson RA (2004) The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. *Mol Biochem Parasitol* 138: 57-66.
65. Liu F, Cui SJ, Hu W, Feng Z, Wang ZQ, et al. (2009) Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol Cell Proteomics* 8: 1236-1251.
66. Brown SP, Grenfell BT (2001) An unlikely partnership: parasites, concomitant immunity and host defence. *Proc Biol Sci* 268: 2543-2549.
67. Poulin R (1998) *Evolutionary Ecology of Parasites*. London: Chapman & Hall.
68. Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P (2004) Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology* 129: 571-585.
69. Prugnolle F, De Meeus T, Durand P, Sire C, Theron A (2002) Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Mol Ecol* 11: 1231-1237.
70. Beltran S, Cezilly F, Boissier J (2008) Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. *PLoS ONE* 3: e3328.

71. Wu XJ, Sabat G, Brown JF, Zhang M, Taft A, et al. (2009) Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Mol Biochem Parasitol* 164: 32-44.
72. Dea-Ayuela MA, Rama-Iniguez S, Bolas-Fernandez F (2006) Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6: 4187-4194.
73. Knudsen GM, Medzihradzky KF, Lim KC, Hansell E, McKerrow JH (2005) Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Mol Cell Proteomics* 4: 1862-1875.
74. Guillou F, Roger E, Mone Y, Rognon A, Grunau C, et al. (2007) Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol Biochem Parasitol*.
75. Pal-Bhowmick I, Mehta M, Coppens I, Sharma S, Jarori GK (2007) Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase. *Infect Immun* 75: 5500-5508.
76. Liu L, Xu L, Yan F, Yan R, Song X, et al. (2009) Immunoproteomic analysis of the second-generation merozoite proteins of *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol*.
77. Ma GY, Zhang JZ, Yin GR, Zhang JH, Meng XL, et al. (2009) *Toxoplasma gondii*: Proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. *Exp Parasitol*.
78. Lorenzo C, Ferreira HB, Monteiro KM, Rosenzvit M, Kamenetzky L, et al. (2005) Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J Clin Microbiol* 43: 2764-2770.
79. Mayta H, Hancock K, Levine MZ, Gilman RH, Farfan MJ, et al. (2007) Characterization of a novel *Taenia solium* oncosphere antigen. *Mol Biochem Parasitol* 156: 154-161.
80. Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, et al. (1999) Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 115: 342-349.
81. Abouel-Nour MF, Lotfy M, Attallah AM, Doughty BL (2006) *Schistosoma mansoni* major egg antigen Smp40: molecular modeling and potential immunoreactivity for anti-pathology vaccine development. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 365-372.
82. Bonnefoy S, Gysin J, Blisnick T, Guillotte M, Carcy B, et al. (1994) Immunogenicity and antigenicity of a *Plasmodium falciparum* protein fraction (90-110 kDa) able to protect squirrel monkeys against asexual blood stages. *Vaccine* 12: 32-40.

Table 1: Qualitative protein identifications in a comparative screen between A10, A35 and A4 *S. mansoni* adult clones

*: signal anchor was predicted using SignalP 3.0.

SP: signal peptide, NC: non classical secretion.

Spot Number	Clone name	Spot Presence (+)/Absence (-)	Protein Name	Accession Number	Species Name	Peptide number	Score	surface protein (+/-, ref) or signal anchor*	Secretion pathway	Identified previously in <i>Schistosoma</i> ES products	Reported as antigen (species, ref)
6243	A10	-	proteasome subunit beta	gi 34627796	<i>S. mansoni</i>	5	315,70	-	-	[71]	<i>Leishmania infantum</i> [72]
A35	+	Glutathione-S-Transferase	gi 166286765	<i>S. mansoni</i>	4	249,79	-	-	-	[60,65]	<i>Schistosoma mansoni</i> [53]
A4	+										
4344	A10	+	ubiquitin binding protein.	gi 5788272	<i>S. mansoni</i>	5	384,91	-	NC		
A35	-	prohibitin	gi 34620967	<i>S. mansoni</i>	3	238,37	-	-	-		
A4	+										
6345	A10	-	Receptor for activated PKC	Q8T6T3_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	3	108,14	-	NC		
A35	+										
A4	+										
5666	A10	+	fimbrin	Q26574_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	7	543,90	-	-	[73]	
A35	-	elongation factor 1-alpha	Q94747_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	4	191,88	-	-	-		
A4	+										
2422	A10	-	trimeric G-protein alpha subunit	gi 3385205	<i>S. mansoni</i>	5	279,68	-	-		
A35	-										
A4	+										
4441	A10	+	enolase	gi 5869394	<i>S. mansoni</i>	9	478,94	+, [63]	-	[65,73,74]	<i>Plasmodium falciparum</i> [75]
A35	+	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gi 166259182	<i>S. mansoni</i>	5	285,73	+, [63]	-	-	[65,71,74]	<i>Schistosoma mansoni</i> [54]
A4	-										
4635	A10	-	Hexokinase	HXK_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	7	317,37	-	-		
A35	+	Enolase	ENO_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	5	293,24	+, [63]	-	-	[65,73,74]	<i>Plasmodium falciparum</i> [75]
A4	+										
1355	A10	-	ATP synthase subunit beta	Q5D9S4_SCHIA	<i>S. mansoni</i>	6	538,89	-	-	[73]	<i>Eimeria tenella</i> [76]
A35	-										
A4	+										
2123	A10	+	dynactin	gi 2546879	<i>S. mansoni</i>	3	235,45	-	NC		
A35	-										

A35	+	stress-induced-phosphoprotein 1	gi 5790830	<i>S. mansoni</i>	5	404,34	-	-
A4	+							
338	A10	-	GPI-anchored glycoprotein	<i>S. mansoni</i>	4	234,67	Signal anchor	SP
A35	-							
A4	+							
1430	A10	-	oncosphere or troponin	<i>S. mansoni</i>	5	346,72	-	-
A35	-		cAMP-dependent kinase	<i>S. mansoni</i>	4	223,37	-	NC
A4	+							
2122	A10	-	proteasome subunit beta	<i>S. mansoni</i>	5	391,92	-	-
A35	-							
A4	+							
8239	A10	-	Adenylate kinase (ADK)	<i>S. mansoni</i>	5	350,27	-	NC
A35	-		malate (MDH)	<i>S. mansoni</i>	3	274,09	-	SP
A4	+		Glutathione-S GST28	<i>S. mansoni</i>	3	194,52	-	-

Taenia solium [79]

Leishmania infantum
[72]

Toxoplasma gondii
[77], *Echinococcus*
granulosus [78]
Schistosoma mansoni
[53]

Table 2: Quantitative protein identifications in a comparative screen between A10, A35 and A4 *S. mansoni* adult clones.

ND: not done, NS: not significant.

*: signal anchor was predicted using SignalP 3.0.

SP: signal peptide, NC: non classical secretion.

Spot Number	Clone Comparison	Expression Ratio	Protein Name	Accession Number	Species Name	Peptide number	Score	surface protein (+/-, ref) or signal anchor*	Secretion pathway	Identified previously in <i>Schistosoma</i> ES products	Reported as antigen (species, ref)
6243	A10 vs A35	ND	proteasome subunit beta	gi 34627796	<i>S. mansoni</i>	5	315,70	-	-	[71]	<i>Leishmania infantum</i> [72]
	A10 vs A4	ND	Glutathione-S-Transferase GST28	gi 166286765		4	249,79	-	-	[60,65]	<i>Schistosoma mansoni</i> [53]
	A35 vs A4	+ 7.74									
1414	A10 vs A35	+ 2.52	Heat shock 70 kDa protein homolog	HSP70_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	5	362,86	-	-	[65,71]	<i>Schistosoma mansoni</i> [55]
	A10 vs A4	+ 3.15	oncosphere protein or tropotin T	gi 34616732	<i>S. mansoni</i>	5	345,74	-	-		<i>Taenia solium</i> [79]
	A35 vs A4	NS									
413	A10 vs A35	NS	similar to reticulocalbin or calumenin	gi 5790411	<i>S. mansoni</i>	11	566,08	-	SP		
	A10 vs A4	+ 2.53	Trimeric G-protein alpha o subunit	Q8IT62_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	4	181,63	-	-		
	A35 vs A4	NS		A							
1541	A10 vs A35	NS	Heat shock 70 kDa protein homolog	HSP70_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	6	342,34	-	-	[65,71]	<i>Schistosoma mansoni</i> [55]
	A10 vs A4	NS									
	A35 vs A4	+ 3.18									
5345	A10 vs A35	- 6.38	glyoxalase domain containing 4	gi 72293648	<i>S. mansoni</i>	3	151,34	-	NC		
	A10 vs A4	- 7.34									
	A35 vs A4	NS									
1335	A10 vs A35	NS	ATPase+HSP90	Q5D947_SCHJA	<i>S. mansoni</i>	3	105,49	-	-	[65,71]	
	A10 vs A4	+ 10.89									
	A35 vs A4	+ 7.22									
1416	A10 vs A35	NS	G protein alpha subunit	Q5C0H0_SCHJA	<i>S. mansoni</i>	3	172,60	-	NC		
	A10 vs A4	+ 2.01		A							
	A35 vs A4	+ 2.09									
4230	A10 vs A35	+ 2.11	Glutathione S-transferase GST28	GST28_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	5	310,20	-	-	[65,71,74]	<i>Schistosoma mansoni</i> [53]
	A10 vs A4	NS									
	A35 vs A4	NS									
3414	A10 vs A35	NS	Enolase	ENO_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	7	540,03	+, [63]	-	[65,73,74]	<i>Plasmodium</i>

	A10 vs A4	+ 2.12	oncosphere protein or troponin T	gi 34616732	<i>S. mansoni</i>	6	422,90	-	-	<i>falciparum</i> [75] <i>Taenia solium</i> [79]
	A35 vs A4	NS								
2319	A10 vs A35	+ 3.81	glutathione S-transferase omega	gi 5789011	<i>S. mansoni</i>	3	146,53	-	-	[65,71,74]
	A10 vs A4	ND	14-3-3 zeta isoform	Q6IX09_SCHB O	<i>S. mansoni</i>	3	177,94	-	-	[60]
	A35 vs A4	ND								<i>Schistosoma mansoni</i> [61]
4224	A10 vs A35	NS	GpE protein homolog 1	gi 34627204	<i>S. mansoni</i>	6	339,20	-	NC	[65]
	A10 vs A4	NS								
	A35 vs A4	+ 2.36								
4545	A10 vs A35	+ 3.98	Enolase	ENO_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	6	360,44	+	[63]	[65,73,74]
	A10 vs A4	NS	similar to disulfide-isomerase or PDI	gi 34699273	<i>S. mansoni</i>	4	337,58	-	SP	[65]
	A35 vs A4	- 2.66								<i>Plasmodium falciparum</i> [75] <i>Toxoplasma gondii</i> [77]
5204	A10 vs A35	NS	putative guanylate kinase	gi 75967337	<i>S. mansoni</i>	8	546,47	-	-	
	A10 vs A4	+ 2.60								
	A35 vs A4	NS								
5663	A10 vs A35	NS	Hexokinase	HXX_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	10	714,17	-	-	
	A10 vs A4	- 5.01	Enolase	ENO_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	5	358,96	+	[63]	[65,73,74]
	A35 vs A4	- 3.45								<i>Plasmodium falciparum</i> [75]
6432	A10 vs A35	NS	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase=GPDH	Q5QE16_SCHM A	<i>S. mansoni</i>	7	482,16	-	NC	[65,71,74]
	A10 vs A4	- 3.07	Fructose-bisphosphate aldolase	ALF_SCHMA	<i>S. mansoni</i>	8	427,88	-	-	[60]
	A35 vs A4	NS								<i>Schistosoma mansoni</i> [60]
1539	A10 vs A35	NS	oncosphere protein or troponin T	gi 34616732	<i>S. mansoni</i>	4	256,74	-	-	<i>Taenia solium</i> [79]
	A10 vs A4	+ 2.58	similar to UBX domain protein 1	gi 34627997	<i>S. mansoni</i>	3	205,91	-	NC	
	A35 vs A4	+ 2.08								
412	A10 vs A35	+ 2.50	Calumenin	gi 166341378	<i>S. mansoni</i>	8	721,52	-	SP	
	A10 vs A4	NS								
	A35 vs A4	NS								
5305	A10 vs A35	NS	Histone H4	A7SHX4_NEM VE	<i>S. mansoni</i>	5	286,90	-	NC	[60,74]
	A10 vs A4	+ 2.18								<i>Leishmania infantum</i> [80]
	A35 vs A4	+ 2.04								
5327	A10 vs A35	- 2.49	5'-methylthioadenosine phosphorylase	gi 34659681	<i>S. mansoni</i>	3	218,86	-	-	
	A10 vs A4	- 3.39								

Figures

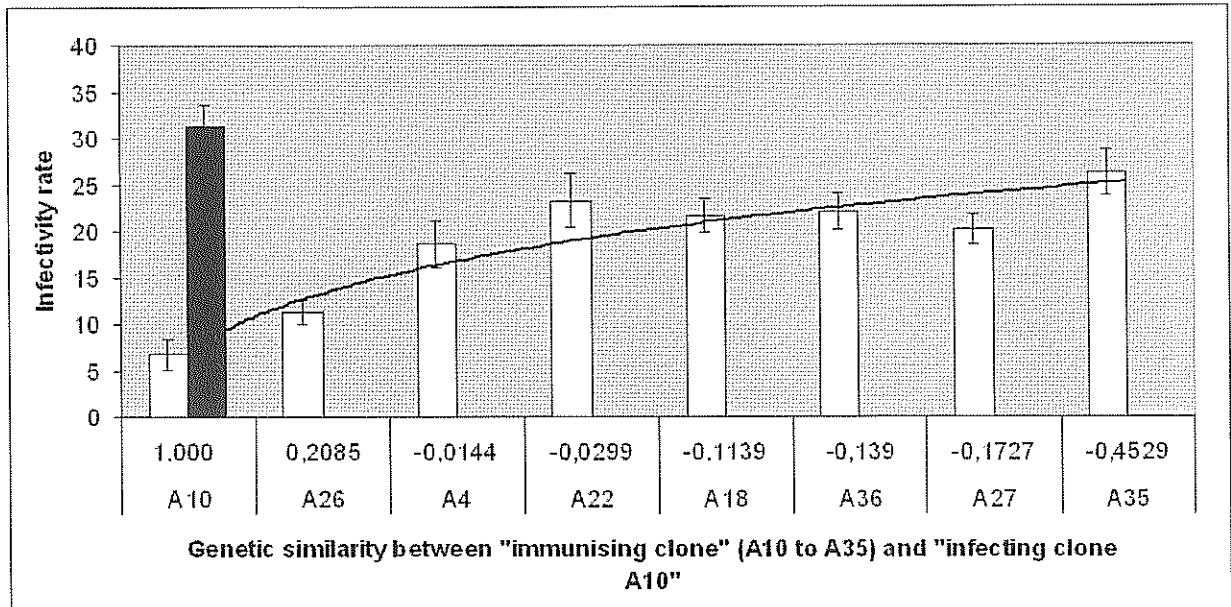


Figure 1: Evolution of the infectivity rate according to the genetic similarity between “immunising clone” (A10 to A35) and “infecting clone” (A10). The black histogram corresponds to the infectivity rate of the control group (without immunisation). The white histograms correspond to the infectivity rate of the experimental groups. The r coefficient of Wang ranges from $r=1$ to $r=-1$. When the r coefficient is close to -1 , the two individuals are very genetically dissimilar; on the opposite, when the r coefficient is close to $+1$, the two individuals are very genetically similar. On this figure, the r coefficient between “immunising clone” (A10, A26, A4, A22, A18, A36, A27, A35) and “infecting clone” (A10) ranges between $r=1,000$ and $r=-0.4529$. For example, A10 (“immunising clone”) and A10 (“infecting clone”) are very genetically similar ($r=1,000$), whereas A35 (“immunising clone”) and A10 (“infecting clone”) are very genetically dissimilar ($r=-0.4529$). The genetic similarity between “immunising clone” and “infecting clone” has a significant influence on the infectivity rate of the “infecting clone” (logarithmic regression model, $ddl=6$, $F=33.34$, $p=0.001$, $r^2=0.847$).

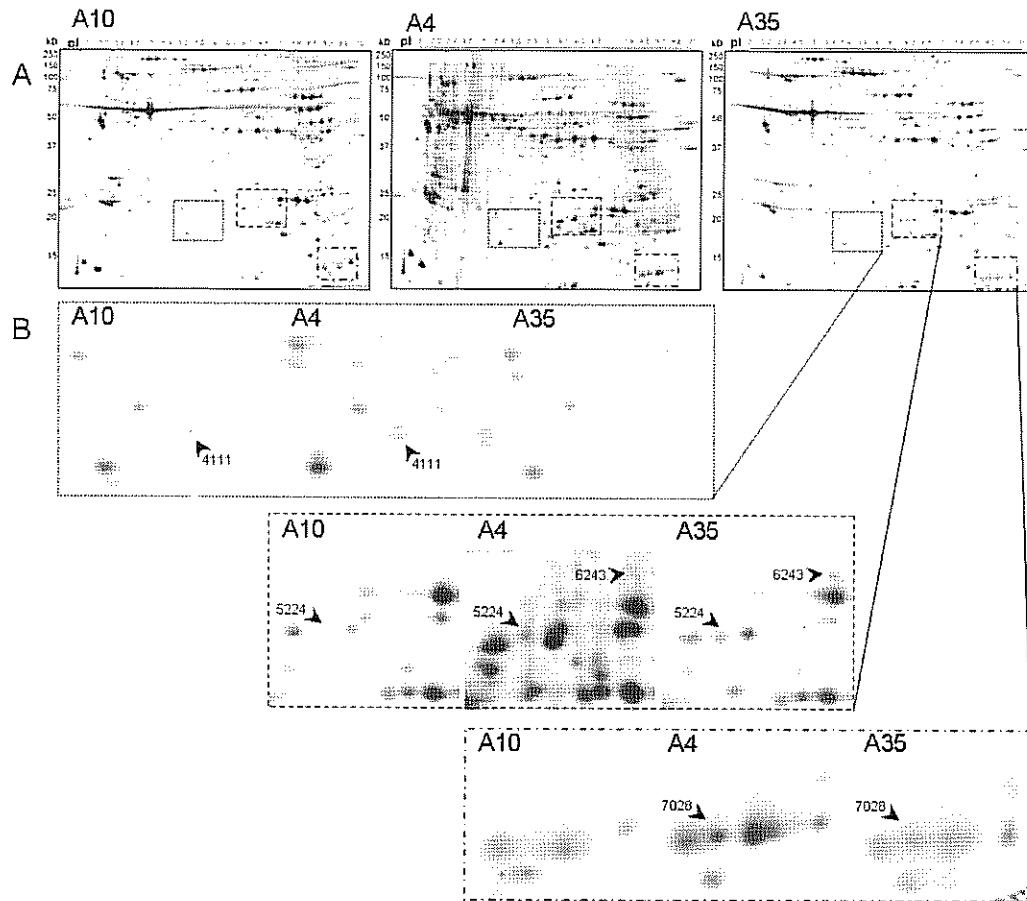


Figure 2: Proteomic profiles of total proteome from *S. mansoni* adult clones A10, A35 and A4 (A). High magnification of gel areas showing qualitative and quantitative differences underlined using PDQuest image analysis software. Four spots highlighted by a black arrow and spot number were used as example (B). All differences were presented in Table 1 and Table 2.

X-axis is the isoelectric point scale (pI). Y-axis is the molecular weight scale in kDa. Proteins were focused using a 3–10 non-linear pH range as the first dimension and a 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as the second dimension. Gels were silver-stained.

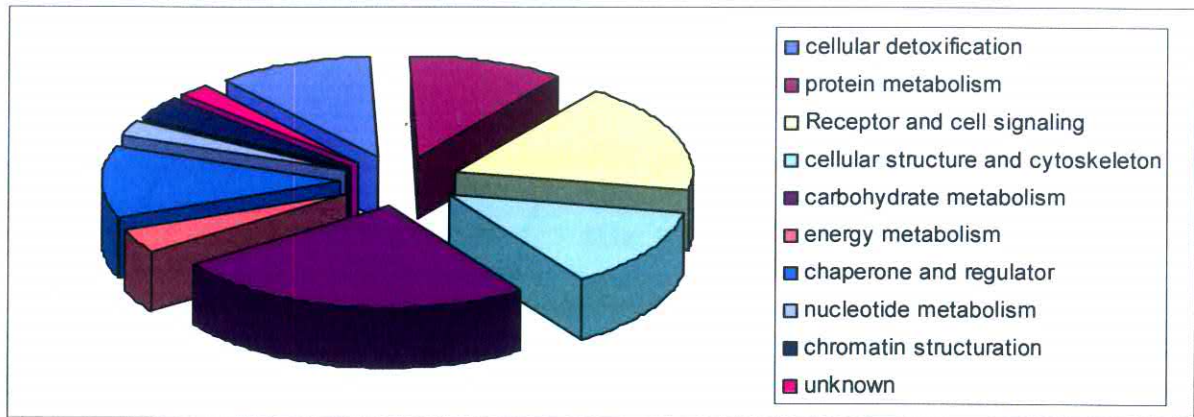
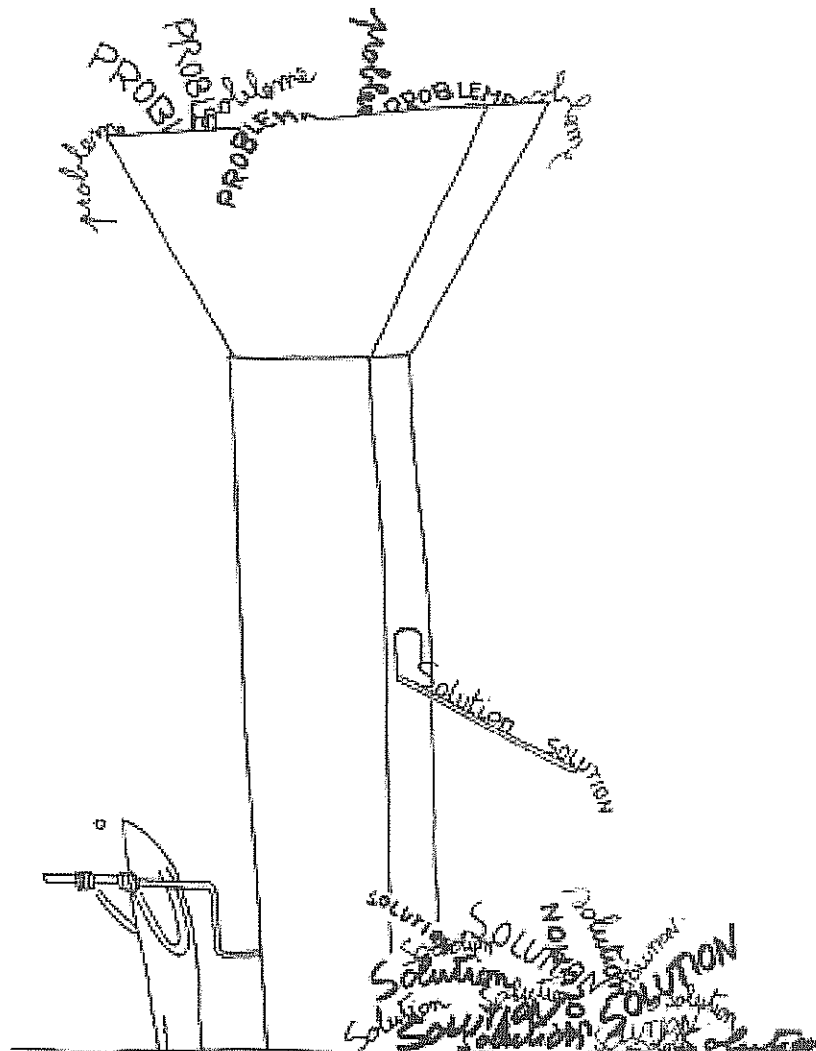


Figure 4: Distribution of proteins identified into functional classes.

Classification of identified proteins in male adult *Schistosoma* (clones) into cellular functional classes. The 85 proteins identified and quantified by proteomic approach were assigned to only one functional class on the basis of their annotation in Genbank and Swissprot database.

Synthèse et Perspectives



FRO|SSARD

A l'aide de la nouvelle technique d'extraction d'ADN développée (Beltran et al., 2008b), nous avons pu proposer différents mâles à une femelle et différentes femelles à un mâle (Beltran and Boissier, 2009a; Beltran et al., 2008a). Les résultats obtenus montrent que (1) *S. mansoni* est capable de changer de partenaire sexuel ; (2) les femelles changent plus fréquemment de partenaire que les mâles ; (3) le taux de changements de partenaire augmente lorsque le gain potentiel d'hétérozygotie pour la descendance augmente (Beltran et al., 2008a) ; (4) les changements de partenaire induisent une descendance ce qui, d'après notre définition de la monogamie, rend la monogamie du schistosome sociale mais non génétique (Beltran and Boissier, 2009a) ; (5) enfin, le biais de sex ratio en faveur des mâles influence le taux de changements de partenaire qui augmente quand augmente le nombre de prétendants mâles (Beltran et al., 2009a).

Chez les schistosomes, les changements de partenaire ne se font pas aléatoirement, nous avons vu qu'ils se font « pour » la dissimilarité génétique (Beltran et al., 2008a), ce qui induirait un gain d'hétérozygotie pour la descendance. Ce gain pourrait contrebalancer la phase clonale intra-molluscale (phase de prolifération qui ne produit pas de diversité génétique) et rendrait le parasite plus apte dans la course aux armements qui l'oppose à ses hôtes. Cependant, pour que les changements de partenaire représentent un caractère adaptatif permettant un gain d'hétérozygotie pour la descendance, plusieurs éléments doivent être clarifiés :

1. D'abord, le taux changements de partenaire est-il lié au taux de descendance issue de ces changements ? Dans ce contexte, quel est le rôle du réceptacle séminal de la femelle ?
2. Ensuite, le gain d'hétérozygotie induit-il un gain de valeur sélective (« fitness ») ?
3. Enfin, comment se réalise, d'un point de vue fonctionnel, ce « choix » de la femelle pour la dissimilarité ?

Quel est le lien entre taux de changements de partenaire et taux de descendants issus de ces changements? Quel est le rôle du réceptacle séminal de la femelle ?

Une descendance rapide issue de changements de partenaire est obtenue expérimentalement chez *S. mansoni* (Beltran and Boissier, 2009a). L'étude menée ne permet d'étudier cette descendance issue de changements de partenaire qu'à une échelle populationnelle. De plus, le fait de prélever les faeces des hôtes chaque semaine, sans les sacrifier, ne nous permet que d'évaluer la descendance issue des changements de partenaire sans connaître le taux réel de ces changements aux différents temps étudiés. Cette étude ne nous permet pas non plus d'établir le rôle du réceptacle séminal de la femelle (stockage réel de sperme ou non) ne sachant pas si toutes les femelles ayant changé de partenaire ont produit une descendance issue de ce changement.

Une expérience massive du même type pourrait être réalisée, en proposant à une femelle des mâles plus ou moins similaires à elle génétiquement, avec chaque semaine, en plus d'un prélèvement de faeces, une évaluation du taux de changements de partenaire par un sacrifice de quelques hôtes définitifs expérimentalement infestés. Cette expérience permettrait de tester le lien (toujours à l'échelle populationnelle) entre taux de changements de partenaire et taux de descendance issue de ces changements et ce, en fonction du gain d'hétérozygotie potentiel pour la descendance. Un taux de changements de partenaire équivalent à un taux de descendants « hors couple initial » pourrait signifier que les changements de partenaire entraînent une descendance. Un taux de changements de partenaire plus élevé que le taux de descendants « hors couple initial » pourrait signifier un coût aux changements de partenaire et/ou le rôle du réceptacle séminal de la femelle dans le stockage de sperme. A l'inverse, un taux de changements de partenaire plus faible que le taux de descendants « hors couple initial » pourrait signifier une meilleure efficacité des « nouveaux couples » (i.e. issus du ré-accouplement). L'évolution de ces taux en fonction du gain potentiel d'hétérozygotie pour la descendance pourrait permettre une meilleure compréhension des changements de partenaire chez *S. mansoni*.

Une approche complémentaire *in vitro* peut être également réalisée sur des femelles auxquelles un changement de partenaire est imposé. Une analyse de la

descendance en prélevant les œufs pondus *in vitro* directement après le réaccouplement pourrait répondre définitivement à la question du rôle du réceptacle séminal de la femelle. En effet, si une descendance issue du premier partenaire mâle de la femelle est observée, alors cela signifie que la femelle est capable de stocker du sperme dans son réceptacle séminal, ce qui pourrait avoir des implications en terme de compétition spermatique.

Gain de diversité génétique = gain de valeur sélective (« fitness ») ?

Concernant le lien souvent prédit mais rarement expérimenté entre gain de diversité génétique et gain de « fitness », il serait intéressant de réaliser trois types d'études :

(1) Dans une première expérience, l'effet de la dissimilarité génétique entre les partenaires du couple sur le succès d'accouplement, sur le succès de reproduction (nombre d'œufs produits), et pourquoi pas sur d'autres traits de vie tout au long du cycle de vie du parasite (infectivité de la descendance produite chez les hôtes intermédiaire et définitif...) serait mesuré. Pour ce faire, différents groupes (réplicats écologiques) de deux souris (réplicats statistiques) peuvent être infestés avec, pour chaque groupe, un couple clonal et un gradient de dissimilarité génétique entre les différents couples clonaux.

(2) Une deuxième étude consiste à réaliser le suivi de la diversité génétique neutre d'une souche de parasite (en utilisant des marqueurs microsatellites) depuis sa récupération sur le terrain, durant trois ans de maintien au laboratoire soit 9 cycles de passage à travers des hôtes expérimentaux, et de lier ce suivi génétique à la mesure d'un trait de vie, le taux d'infestation des mollusques (infestés avec 10 miracidia) (cf. Annexe 2). Une diminution de la diversité génétique du parasite en lien avec une diminution du trait de vie mesuré est attendue au cours des générations. Cette étude peut ainsi permettre de vérifier le lien entre diversité génétique neutre et valeur sélective. La souche de parasite a été prélevée en Guadeloupe sur le site Dansfond en 2005 et est maintenue depuis au laboratoire (souche appelée GUA DFO). Les vers adultes dans les hôtes définitifs de la génération G0 de terrain, de la 1^{ère} génération G1, 2^{ème} génération G2, 4^{ème} génération G4, 5^{ème} génération G5 et 9^{ème} génération G9 de laboratoire ont été récupérés et leur ADN a été analysé à l'aide de

15 marqueurs microsatellites. Les analyses de génétique des populations ont été réalisées par Nicolas Bech, doctorant au laboratoire. La publication des résultats de cette étude est en cours (cf. Annexe 2). Pour résumer les résultats obtenus : (a) d'abord, au cours des générations, nous avons pu démontrer une structuration génétique marquée par une diminution continue de la diversité génétique neutre et une perte d'allèles au cours du temps. Des signes de goulet d'étranglement apparaissent également à chaque génération. (b) Ensuite, entre G0 et G1 (donc dès le passage en laboratoire), le taux d'infestation des mollusques (infestés avec 10 miracidia) diminue de plus de 50%. (c) Enfin, ce trait de vie mesuré ne varie plus au cours du temps en laboratoire et donc malgré une perte continue de diversité génétique neutre (de la 1^{ère} génération à la 9^{ème} génération de laboratoire).

(a) Ce travail permet de montrer pour la première fois un suivi de diversité génétique de souche de parasite de sa population naturelle source (ou fondatrice) à son installation au laboratoire et de voir que cette perte de diversité génétique est continue et progressive. Une perte de diversité génétique au cours du maintien de la souche de parasite était attendue. Deux hypothèses tentent d'expliquer cette perte de diversité génétique du parasite. **Premièrement**, les hôtes expérimentaux exerceraient une pression de sélection et représenteraient des filtres de parasites (Sorensen et al., 2006; Stohler et al., 2004). Cependant, une étude révèle une influence, non pas de l'utilisation de l'hôte expérimental de laboratoire, mais de la provenance de la souche de parasite (venant soit d'un hôte définitif murin soit d'un hôte définitif humain) dans la perte de diversité génétique du parasite (Bremond et al., 1993). **Deuxièmement**, la manière dont les souches sont installées et maintenues en laboratoire entrainerait un rapide goulet d'étranglement. En effet, les rongeurs sont couteux à maintenir en laboratoire donc peu d'hôtes définitifs servent à maintenir les souches de parasites. De plus, aucun contrôle ou standardisation des populations clonales de parasite (ni en qualité, ni en quantité) n'est réalisé pendant l'infestation de ces hôtes définitif ce qui peut générer de rapides goulets d'étranglement (Theron et al., 2008).

(b) Ce travail permet de montrer également pour la première fois un suivi d'un trait de vie de souche de parasite de la population naturelle source (ou fondatrice) à son installation au laboratoire et de voir que ce trait mesuré (taux d'infestation des mollusques infestés avec 10 miracidia) diminue drastiquement entre G0 (milieu naturel) et G1 (premier passage au laboratoire). Le taux d'infestation passe de 96%

en milieu naturel à 38% dès le premier passage en condition de laboratoire. Cette diminution a déjà été observée : dès le premier passage par des hôtes expérimentaux, le pourcentage d'infestation de l'hôte intermédiaire mollusque diminuait de moitié, passant de près de 100% en condition naturelle à 51% lorsque les mollusques étaient infestés avec 20 miracidia (Theron et al., 2008). Une hypothèse est proposée par Theron et al. (2005 et 2008) pour expliquer cette diminution du taux d'infestation des mollusques dès la G1, à l'aide de la théorie du « matching allele » ou théorie de « clé-serrure » (Theron and Coustau, 2005; Theron et al., 2008). Selon cette théorie, le phénotype de l'hôte (sensible/résistant) dépend du génotype du parasite et le phénotype du parasite (infestant ou non) dépend du génotype de l'hôte (Lambrechts et al., 2006). Pour simplifier, pour qu'il y ait compatibilité entre un parasite et son hôte, le parasite doit avoir la « bonne clé » qui correspond à la « bonne serrure » de son hôte. Ainsi, la probabilité de compatibilité entre un miracidia et un mollusque est d'abord faible, mais quand le nombre de miracidia mis en contact de l'hôte augmente, la probabilité de compatibilité hôte-parasite augmente jusqu'à atteindre 100% (entre 5 et 20 miracidia sont nécessaires pour atteindre ce seuil en milieu naturel). Le premier passage par des hôtes de laboratoire aurait conduit à la perte d'allèles chez le parasite conduisant celui-ci à perdre un certain nombre de « clés », réduisant ainsi la compatibilité entre le parasite et son hôte, dès le premier passage en laboratoire. Ainsi, quelque soit le nombre de miracidia utilisés pour l'infestation des mollusques suivants, les 100% de compatibilité ne sont plus atteints.

(c) Un autre résultat intéressant est l'absence de variation du taux d'infestation des mollusques au cours du temps et de la perte continue de diversité génétique au laboratoire (taux d'infectivité de 38%, 30%, 41%, 39% et 38% pour G1, G2, G4, G5 et G9 respectivement). Il a été montré au laboratoire qu'un fort polymorphisme de mucines (SmPoMucs) (molécules clés dans l'interaction parasite-mollusque) est généré au sein des parasites (Roger et al., 2008a; Roger et al., 2008b). Cette « création » de polymorphisme fonctionnel (nommée le « chaos contrôlé » par les auteurs) pourrait expliquer la présence d'un taux d'infestation constant. Le « matching allele » se ferait sur des zones fonctionnelles de l'ADN et non sur des zones neutres, ce qui expliquerait la stabilité du trait de vie malgré la baisse continue de diversité neutre et la perte d'allèle dans notre étude. Ce trait pourrait toutefois évoluer sur plus long terme. Deux cas de figures pourrait alors apparaître : (1) nous

pouvons imaginer qu'au cours du temps, la diversité génétique neutre continue à diminuer, et que des zones fonctionnelles perdent également de la diversité. Ainsi, le nombre de « clés » diminue et le taux d'infectivité avec. (2) Une deuxième possibilité est que malgré la chute de diversité génétique neutre, le parasite continue à générer un polymorphisme sur ces zones fonctionnelles (par exemple les SmPoMucs), mais c'est l'hôte qui, au cours du temps, perd de la diversité en laboratoire. A cette étape, ce sont les « serrures » qui diminuent alors que les « clés » restent constantes. Dans ce cas de figure, le taux d'infestation des mollusques devient plus élevé si par chance « clés » et « serrures » correspondent, et diminue si par hasard « clés » et « serrures » ne correspondent plus.

Une analyse du polymorphisme neutre et fonctionnel à l'aide de marqueurs moléculaires génétiques neutres et fonctionnels pourrait permettre une meilleure compréhension de l'interaction hôte intermédiaire-parasite. Un suivi plus long de la souche, ou une accélération de perte de diversité *via* la génération de souches consanguines, alliés à une étude génétique mais aussi à la mesure de traits de vie, pourrait également apporter des éléments à la compréhension du lien entre diversité génétique et valeur sélective.

(3) Une troisième expérience, utilisant la création de souches consanguines du parasite en accouplant des individus « frères-sœurs », a été partiellement menée au cours de cette thèse et mérite un approfondissement. Comme il est impossible de créer de la diversité génétique et qu'un gradient de diversité génétique pourrait ne pas être suffisant pour distinguer les effets de cette diversité sur les traits de vie étudiés (cf. suivi de souche énoncé précédemment), deux souches consanguines, issues d'une souche de *S. mansoni* de Guadeloupe Dansfond (GUA DFO) (souche arrivée et conservée au laboratoire depuis 2005), ont été générées en croisant des individus apparentés (et ce, à chaque génération), pour diminuer la diversité génétique et voir si au cours des générations, des diminutions de valeur sélective sont observées sur différents traits de vie. Les traits de vie mesurés sont synthétisés dans la figure 10: le taux d'infestation des mollusques lorsqu'ils sont infestés avec 20 miracidia ; le nombre moyen de sporocystes (Sp1) lorsque les mollusques sont infestés avec 20 miracidia (les Sp1 sont comptés suivant la méthode décrite par Theron et Gérard en 1994 (Theron and Gérard, 1994)) ; et l'infectivité de souris (hôte définitif vertébré) (SWISS OF1) infestées avec 160 cercaires. Ces traits de vie ont

déjà été mesurés sur une autre souche de *S. mansoni*, présente au laboratoire depuis près de 50 ans, la souche Brésilienne (BRE) (Theron et al., 1997), qui présente de forts indices de consanguinité (données non publiées). Enfin, nous avons remesuré ces traits sur la souche Guadeloupéenne (GUA DFO) (qui nous a servi à la création des deux souches consanguines).

Les résultats sont bien sûr préliminaires et impossibles à publier dans l'état car nous n'avons pas réussi à maintenir ces souches consanguines et obtenir ainsi plus de mesures et de réplicats. Cependant, il semblerait que dès la première génération de souche consanguine, et donc lorsque la diversité génétique diminue, quelques traits de vie mesurés évoluent : le taux d'infestation des mollusques (infestés avec 20 miracidia) chez les souches consanguines semble augmenter par rapport à la souche origine GUA DFO ; inversement, l'infectivité chez le vertébré subit une perte significative de 10% ($U=25.5$, $p=0.0412$) par rapport à la souche origine GUA DFO ; par contre, le nombre moyen de Sp1 lorsque les mollusques sont infestés avec 20 miracidia, plus élevé chez la souche BRE, ne semble pas évoluer chez les souches consanguines par rapport à la souche origine GUA DFO. Deux éléments importants se dégagent : (a) l'augmentation du taux d'infestation des mollusques quand la diversité génétique diminue (cas des souches consanguines et de la souche BRE, maintenue depuis près de 50 ans au laboratoire, présentant des signes de consanguinité, de fort taux d'infestation de mollusques et une faible infectivité chez le vertébré) ; et (b) le compromis ou « trade off » apparent entre l'infectivité chez l'hôte intermédiaire mollusque (cf. Nombre de Sp1 au moins entre la souche GUA DFO et la souche BRE) et chez l'hôte définitif (entre la souche GUA DFO et les souches BRE et consanguines).

(a) L'augmentation du taux d'infestation des mollusques quand la diversité génétique diminue va dans le sens de l'hypothèse énoncée dans la partie précédente (c)(2) : dans notre expérience, même si le parasite continue à générer un polymorphisme sur ces zones fonctionnelles (comme les SmPoMucs, très polymorphes même sur la souche BRE (Roger et al., 2008a)), c'est l'hôte mollusque qui, au cours du temps, perdrait de la diversité. A cette étape, c'est le nombre de « serrures » qui diminueraient, alors que le nombre de « clés » resteraient constant. Dans ce cas de figure, le taux d'infestation des mollusques deviendrait plus élevé si par chance, « clés » et « serrures » correspondent. Cette hypothèse expliquerait nos résultats.

(b) Une perte drastique de diversité génétique chez ce parasite s'associerait à une augmentation de l'infectivité du mollusque (cf. Nombre moyen de Sp1 chez la souche BRE) et inversement à une diminution de l'infectivité chez le vertébré. Il devient alors difficile d'associer une augmentation de diversité génétique avec une augmentation de valeur sélective (ou inversement une diminution de diversité génétique avec une diminution de valeur sélective) puisque l'infectivité va dans un sens apparemment contraire entre le passage à l'intérieur de l'hôte intermédiaire mollusque et celui à l'intérieur de l'hôte définitif sur les deux souches maintenues en laboratoire (BRE et GUA DFO). Ce compromis ou « trade off » apparent (si le parasite « passe » bien la barrière de l'hôte mollusque intermédiaire, il ne « passe » pas bien celle de l'hôte vertébré définitif et inversement, si le parasite « passe » mal la barrière de l'hôte mollusque intermédiaire, il « passe » bien celle de l'hôte vertébré définitif) pourrait s'expliquer. En effet, d'un point de vue mécanistique, **au sein du mollusque**, ces résultats iraient dans le sens de l'hypothèse de SELECTION DE PARENTELE (ou « KIN SELECTION »), compatible avec la théorie « clé-serrure » présentée précédemment (Theron and Coustau, 2005; Theron et al., 2008). La sélection de parentèle offre une explication des comportements altruistes au sein d'un groupe (W.D. Hamilton) : ce type de comportement peut être préservé par l'évolution s'il bénéficie à un individu génétiquement apparenté. Les coûts du comportement altruiste sont alors compensés par la survie des gènes. Concernant la théorie « clé-serrure », pour rappel, lorsqu'un parasite possède la « bonne clé » vis-à-vis de son hôte, il peut l'infester. Les individus auxquels le parasite est très apparenté possèdent également cette « bonne clé », tous peuvent alors infester l'hôte intermédiaire et n'entrent pas en compétition à l'intérieur de cet hôte car ils sont apparentés (théorie de sélection de parentèle). La présence d'un plus grand nombre de Sp1 dans le mollusque au sein de la souche BRE par rapport à la souche GUA DFO (cf. Figure 10) semble aller dans le sens de cette hypothèse. Le fait que les générations consanguines présentent une stabilité dans le nombre moyen de Sp1 pourrait signifier que les miracidia sont encore trop dissimilaires pour favoriser la sélection de parentèle. **Au sein du vertébré** par contre, ces résultats semblent suggérer que moins il y a de diversité génétique entre les parasites, plus le système immunitaire de l'hôte est capable de se défendre. Ce résultat est assez intuitif en terme de course aux armements qui oppose l'hôte à son parasite : un bon niveau de diversité génétique est en effet nécessaire pour contrecarrer le système immunitaire

sophistiqué de l'hôte vertébré (cf. Introduction, première hypothèse énoncée pour expliquer l'apparition du gonochorisme chez les schistosomes).

Il est difficile de dire quelle stratégie confère au parasite une meilleure valeur sélective puisqu'au moins en laboratoire, les deux types de souches BRE (très peu diversifiées génétiquement) et GUA DFO (plus récente et diversifiée) sont maintenues. Un modèle, intégrant les paramètres de diversité génétique, de taux d'infestation de mollusque et d'infectivité des hôtes intermédiaire et définitif, pourrait permettre d'évaluer quelle stratégie est la meilleure. Ces résultats sont encourageants et une nouvelle étude en laboratoire reprenant l'idée de générer des souches consanguines pourrait amener la preuve expérimentale d'un lien entre diversité génétique et traits de vie même si, comme nous l'avons vu, l'interprétation devient complexe en terme de valeur sélective.

	Souche de 50 ans		Souche jeune		2 souches consanguines	
	Souche BRE	Souche GUA DFO	Souche GUA DFO	Génération 1	Génération 2	Génération 2
Taux d'infestation chez les mollusques infestés avec 20 miracidia	100%**	60%	60%	74%*		69%
Nombre moyen de sporocystes chez les mollusques infestés avec 20 miracidia	7**	1,1	1,1	1,51*		1,13
Infectivité chez le vertébré	BRE < GUA DFO			Perte significative de 10% par rapport à GUA DFO		-

Figure 10: Résultats des mesures réalisées sur différentes souches de *Schistosoma mansoni*

** La valeur est celle de la publication (Theron et al., 1997)

* La valeur est une moyenne des mesures réalisées sur les deux souches consanguines

- Valeur absente à cause de la perte de la (ou des) souche (s)

Hypothèses mécanistiques du « choix » de la femelle pour la dissimilarité

Nous pouvons proposer deux hypothèses non exclusives pour expliquer les mécanismes du « choix » de la femelle pour la dissimilarité génétique: un mécanisme moléculaire de reconnaissance directe entre le mâle et la femelle, que l'on appelle **sélection directe** et/ou une **sélection indirecte** des mâles les moins apparentés, *via* le système immunitaire de l'hôte. La première hypothèse de **sélection directe** implique que la femelle est capable de détecter la distance génétique qui la sépare des mâles qui lui sont proposés (par des signaux chimiques). En interspécifique, les changements de partenaire chez les schistosomes montrent qu'il existe une reconnaissance entre espèces (Tchuem Tchuente et al., 1995). En intraspécifiques, les travaux *in vitro* suggèrent également qu'il existe des molécules de rapprochement entre sexes opposés (Eveland et al., 1982, 1983; Haseeb and Eveland, 1991; Imperia et al., 1980). Certains auteurs ont tenté d'identifier des molécules chimioattractives entre mâles et femelles en combinant test *in vitro* et analyses chimiques (Loverde et al., 2004b ; Ghaleb et al., 2006; Haseeb et al., 2008). A l'heure actuelle, il reste beaucoup à faire, notamment identifier ces molécules et déterminer s'il existe un polymorphisme de substances attractives à l'échelle des individus (cf. Chap. IV). La deuxième hypothèse de **sélection indirecte** implique qu'il existerait un polymorphisme antigénique à l'échelle génotypique, reconnu par le système immunitaire de l'hôte. En cas de ré-infestation, l'hôte lutterait alors plus habilement contre les génotypes similaires à ceux auxquels il a déjà été confronté durant la primo-infestation. Une immunité protectrice à la ré-infestation, appelée immunité concomitante, existe chez les schistosomes (Smithers and Terry, 1969). En effet, des hôtes primo-infestés sont capables de détruire de nouvelles larves sans que les adultes déjà installés en soient affectés (Brown and Grenfell, 2001). De plus, des travaux récents au laboratoire ont montré que cette immunité est plus efficace si la ré-infestation et la primo-infestation sont de même génotype (Dumont et al., 2007). L'immunité concomitante serait alors une forme de manipulation de l'hôte par le parasite pour favoriser le brassage génétique de ce dernier.

Afin de tester l'**hypothèse de sélection directe**, deux types de manipulations expérimentales pourraient être envisagés. (1) Le changement de partenaire a été

utilisé comme un critère permettant d'analyser le second choix. Il faudrait maintenant réaliser une étude sans induire de changements de partenaire, en proposant, dès la primo-infestation, différents mâles à une femelle et pourquoi pas différentes femelles à un mâle. Chez *Schistosoma mansoni*, le foie de l'hôte représentant un lieu de « rendez-vous » pour les partenaires de la reproduction (Armstrong, 1965), un scénario aléatoire pourrait être imaginé pour le premier accouplement, d'autant qu'une absence de « premier choix » a été mise en évidence en interspécifique au sein du taxon *Schistosoma intercalatum* (Pages et al., 2001). Ce type d'étude expérimentale permettrait de tester l'existence ou non d'un premier choix *in vivo* chez les schistosomes, de comprendre jusqu'à quel point la femelle est capable de choisir son mâle (et *vice versa*) et jusqu'à quel point le système immunitaire de l'hôte est impliqué. (2) Une approche complémentaire *in vitro* pourrait permettre d'observer un choix de partenaire, de comprendre les traits choisis (s'il en existe) et de tenter d'accéder aux molécules d'attraction éventuellement émises. Plusieurs combinaisons de choix *in vitro* pourraient être envisagées en suivant le protocole réalisé par d'autres auteurs (Eveland et al., 1982, 1983; Imperia et al., 1980) : il peut être donné à la femelle l'opportunité de choisir entre des mâles (a) dont la dissimilarité génétique par rapport à la femelle est différente, (b) dont l'hétérozygotie propre est différente, (c) dont la taille est différente. Des mixages de ces critères (entre autres traits de vie) pourraient être réalisés pour évaluer une éventuelle priorité dans les traits éventuellement choisis par la femelle. Par exemple, il peut être donné à la femelle l'opportunité de choisir entre un mâle de petite taille mais dont la dissimilarité génétique par rapport à elle est grande et un mâle de grande taille dont la dissimilarité génétique par rapport à la femelle est faible. Dans ces conditions, la femelle pourrait privilégier un trait plutôt qu'un autre. L'étude de ces caractères absolus et relatifs est prévue dans le projet ANR Monogamix « Influence relative des critères absolus et relatifs dans le choix du partenaire et les liens du couple chez les espèces monogames », auquel nous participons.

Concernant l'**hypothèse de sélection indirecte**, deux approches peuvent être menées. (1) La première approche consisterait à réaliser le même type d'expérience que présenté en introduction du chapitre II, en proposant en primo- et ré- infestation des mâles qui présentent une dissimilarité à la femelle différente, mais cette fois-ci en utilisant des souris immunodéprimées, c'est-à-dire des souris dont le système

immunitaire (et donc l'immunité concomitante) ne fonctionne pas, afin de tester l'hypothèse de sélection indirecte *via* le système immunitaire. Si le même résultat est obtenu, à savoir plus de changements de partenaire lorsque les mâles de la ré-infestation sont plus dissimilaires génétiquement aux femelles que ne le sont les mâles initiaux, alors, la sélection indirecte sera une hypothèse à écarter. A l'inverse, si ce résultat n'est plus démontré, la sélection indirecte *via* le système immunitaire pourra être considérée comme étant impliquée, d'un point de vue mécanistique, dans les changements de partenaire et le deuxième « choix » des femelles. L'utilisation de souris immunodéprimées est cependant très difficile et nécessite des conditions particulièrement strictes au sein des animaleries. C'est pourquoi (2) une deuxième approche a été développée au sein du laboratoire pour tenter de tester cette hypothèse de sélection indirecte. Cette approche est détaillée dans le chapitre IV du manuscrit. Dans cette étude, le lien entre diversité génétique neutre entre les mâles et polymorphisme phénotypique d'immunisation est testé. Le résultat du modèle de régression logarithmique montre que la similarité génétique entre « clone immunisant » et « clone infestant » a une influence significative sur le taux d'infectivité du clone infestant ($ddl=6$, $F=33.34$, $p=0.001$, $r^2=0.847$) (figure 11 ci-après reprise à partir de la figure 1 de l'article détaillé en chapitre IV). Plus le « clone immunisant » et le « clone infestant » sont dissimilaires génétiquement, plus le taux d'infectivité est élevé. Ces résultats vont dans le sens d'une immunité concomitante « génétique neutre dépendante », le système immunitaire lutte plus efficacement contre les individus nouveaux entrants similaires à ceux auxquels il a déjà été confronté et « laisse plus passer » les individus les plus différents, favorisant à son insu la diversité génétique du parasite.

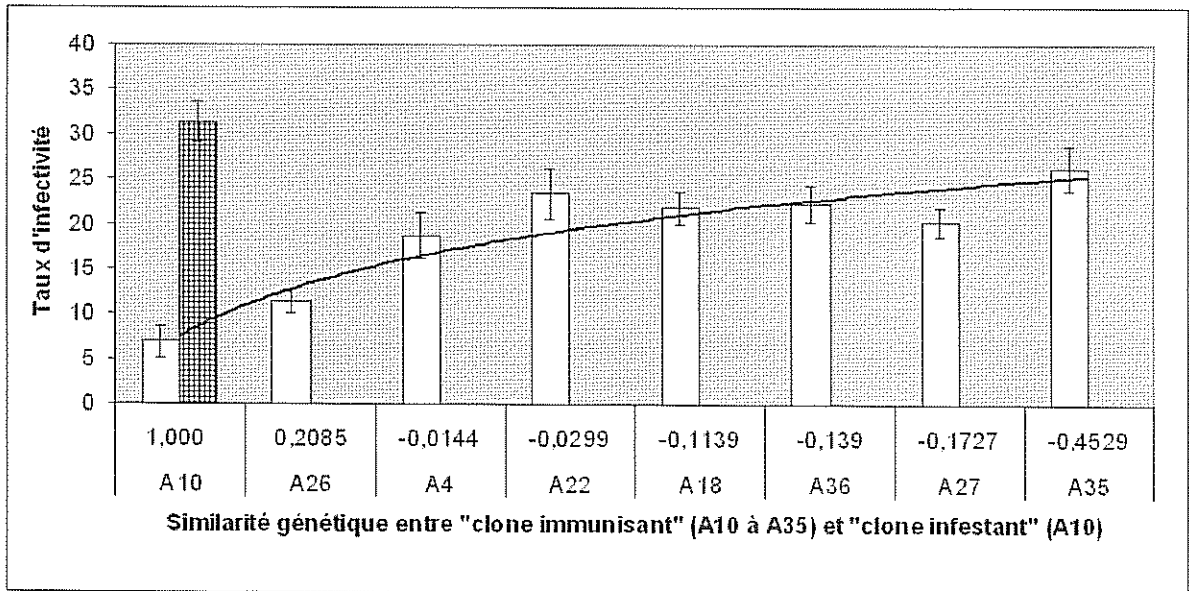


Figure 11: Evolution du taux d'infectivité du parasite en fonction de la similarité génétique entre « clone immunisant » et « clone infestant »

L'histogramme quadrillé correspond au taux d'infectivité du groupe contrôle, groupe constitué de souris non immunisées mais infestées avec le « clone infestant » A10. Le coefficient de similarité (appelé R) entre deux individus varie de R=1 à R=-1. Lorsque R est proche de 1, les individus sont très similaires génétiquement, lorsque R est proche de -1, les individus sont très dissimilaires génétiquement. Sur la figure, le R entre « clone immunisant » (A10, A26, A4, A22, A18, A36, A27, A35) et « clone infestant » (A10) varie de R=1,000 à R=-0.4529. Ainsi, par exemple, A10 (« clone immunisant ») et A10 (« clone infestant ») sont très similaires génétiquement (R=1,000) alors que A35 (« clone immunisant ») et A10 (« clone infestant ») sont très dissimilaires génétiquement (R=-0.4529). La similarité génétique entre « clone immunisant » et « clone infestant » a une influence significative sur le taux d'infectivité du « clone infestant » (Modèle de régression logarithmique, ddl=6, F=33.34, p=0.001, r²=0.847).

Dans ce contexte, nous pouvons proposer le scénario suivant : les couples primo-infestants sont reconnus à l'échelle de leur génotype par le système immunitaire de l'hôte, en particulier le mâle qui est plus immunogène que la femelle (Boissier et al., 2003). Lors d'une ré-infestation, cet hôte lutte plus efficacement contre les génotypes apparentés à ceux de la primo-infestation et « laisse plus facilement passer » et en plus grande quantité les génotypes moins apparentés. La femelle change alors de partenaire pour des mâles de génotypes moins apparentés et plus nombreux que les mâles de génotypes apparentés. Ce scénario est supporté à la fois par les résultats du chapitre III et IV.

Schéma évolutif général du système de reproduction chez *Schistosoma mansoni*

Les schistosomes du genre *Schistosoma* présentent trois caractéristiques énigmatiques : ils sont gonochoriques, monogames et présentent un biais de sex ratio en faveur des mâles. La figure 12 suivante (reprise de la publication détaillée en Chap. III) considère ces trois caractéristiques dans un schéma évolutif (Beltran and Boissier, 2009b).

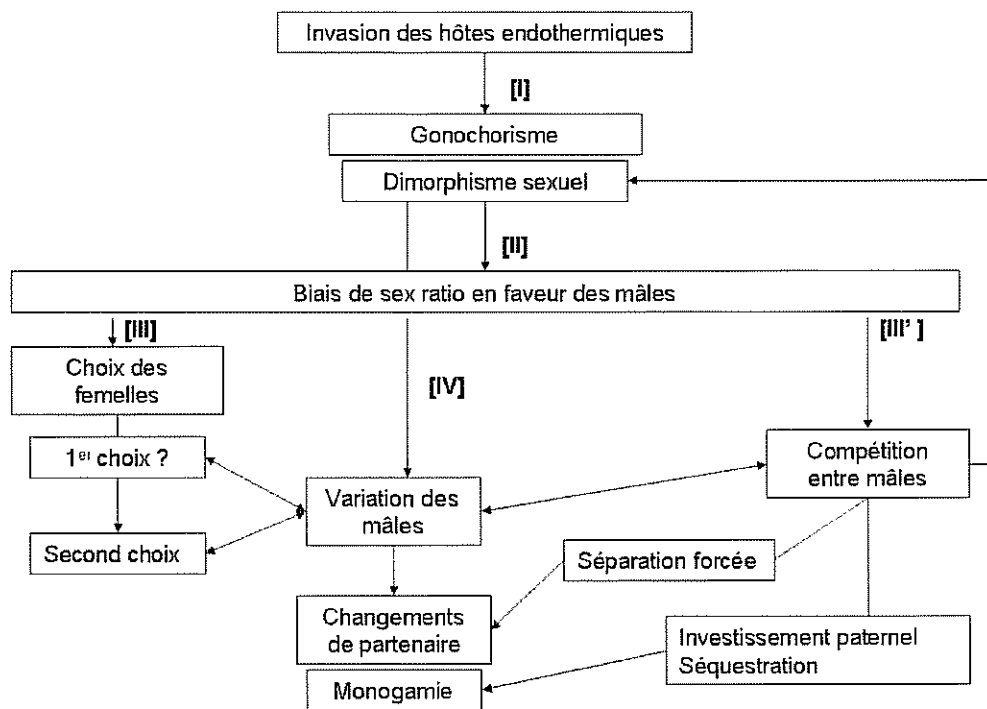


Figure 12: Schéma évolutif du système de reproduction chez *Schistosoma mansoni*

Ce schéma évolutif comporte trois étapes. **Étape I.** L'invasion des hôtes à sang chaud (endothermes) aurait induit à la fois la séparation des sexes (gonochorisme) et le dimorphisme sexuel des schistosomes (Basch, 1990; Loker and Brant, 2006) (cf. Introduction du manuscrit). La séparation des sexes permet au parasite (1) d'augmenter sa diversité génétique et de mieux lutter contre le système immunitaire des hôtes endothermes (plus sophistiqué que celui des hôtes ectothermes) (Basch, 1990), mais aussi (2) de séparer les « tâches ménagères » *via* le dimorphisme sexuel, le mâle musculeux étant capable de résister au flux sanguin du système

porte hépatique et la fine femelle de s'insinuer et de pondre dans les veinules les plus étroites (Loker and Brant, 2006). Le dimorphisme sexuel pourrait ainsi résulter de la sélection naturelle: les individus gonochoriques dimorphiques survivant et se reproduisant mieux que les individus monomorphes hermaphrodites. **Étape II.** Le dimorphisme sexuel deviendrait le principal acteur du biais de sex ratio en faveur des mâles. La femelle, plus fine, résiste moins bien au flux sanguin du système porte hépatique, son taux de mortalité est alors plus important que celui des mâles musculeux (Beltran and Boissier, 2009b; Morand and Muller-Graf, 2000). A partir de là, la sélection sexuelle favoriserait la compétition entre les mâles (étape III') et le choix associé des femelles (étape III). **Étape III.** Un premier choix des femelles pour les mâles disponibles n'a jamais été testé (cf. perspectives concernant l'hypothèse de sélection directe) ; cependant, un second choix, après un premier accouplement, a été montré (Beltran et al., 2008a). **Étape III'.** L'effet principal de la compétition entre mâles (Morand and Muller-Graf, 2000; Steinauer, 2009; Tchuem Tchuente et al., 1995) pourrait être une plus grande dissimilarité entre mâles (Prugnolle et al., 2002), induisant un choix des femelles (Beltran et al., 2008a). La compétition entre mâles favoriserait également les changements de partenaire forcés (Beltran et al., 2009a) et le maintien de la monogamie (Beltran and Boissier, 2008; Fromhage et al., 2008) malgré une variabilité importante entre les mâles démontrée (cf. Analyse protéomique et hypothèse inverse du seuil de polygynie (Beltran and Boissier, 2008)). Enfin, si la préférence des femelles est liée à la taille des mâles (Steinauer, 2009), la compétition entre les mâles pourrait avoir un effet rétroactif sur le dimorphisme sexuel (Morand and Muller-Graf, 2000). **Étape IV.** Le fait que les mâles, plus gros, soient plus immunogènes que les femelles (Boissier et al., 2003) pourrait également induire une plus forte variance entre mâles en terme de couverture antigénique par exemple, variance nécessaire pour lutter contre le système immunitaire sophistiqué de l'hôte vertébré. Ceci aurait des effets rétroactifs sur le choix des femelles, la compétition des mâles et les changements de partenaire.

EPILOGUE

***Schistosoma mansoni*, un modèle magique**

Celui qui souhaite mieux explorer l'énigmatique monogamie *via Schistosoma mansoni* a plus d'un tour dans son sac. En effet, l'expansion clonale, le contrôle du cycle, le niveau taxonomique, le génome séquencé... de *S. mansoni* font de ce parasite un modèle biologique idéal. Tous les tours sont permis : réplicats biologiques, réplicats statistiques, contrôle des prétendants, analyses des molécules... Ainsi, ce modèle magique a permis, permet et permettra très certainement une meilleure compréhension de la monogamie.

« Mieux vaut un tiens que deux tu l'auras »

« Mieux vaut un tiens que deux tu l'auras » est une citation de Gilles Corrozet, poète français du XVI^{ème} siècle, popularisée par Jean de La Fontaine au XVII^{ème} siècle, dans une de ses fables, « Le petit poisson et le pêcheur ». Dans cette fable, un petit poisson pêché par un pêcheur tente de prêcher son relâché à l'eau en arguant qu'il est trop petit et ne fournira pas assez de viande pour être mangé. Mais à son argumentation, le pêcheur réplique :

« Un Tiens vaut, ce dit-on, mieux que deux Tu l'auras

L'un est sûr, l'autre ne l'est pas. »

Cette citation devenue proverbe est aussi retrouvée avec des variantes dans diverses langues. En anglais par exemple, il est dit : « a bird in the hand is worth two in the bush » traduit par « Mieux vaut un oiseau dans la main que deux dans un buisson ».

Cela signifie qu'il vaut parfois mieux profiter d'un bien acquis mais modeste que de le risquer pour un bien supérieur mais hypothétique et même trop coûteux. Ainsi, ce proverbe pourrait très bien être associé à la monogamie qui, d'après l'observation des espèces animales et notamment celle de *Schistosoma mansoni*, répond avant tout à des impératifs « économiques ».

Et l'Homme dans tout ça ?

Est-ce que ce système monogame est le meilleur système d'appariement d'un point de vue évolutif (biologique) pour l'Homme ou est-ce qu'il s'agit d'un système « politiquement correct » ? Le débat fait rage... Certains aimeraient nous faire croire que l'espèce humaine est issue d'une lignée ancestrale monogame, faisant de la monogamie le propre de l'homme. D'autres en revanche, doutent qu'il existe une seule espèce véritablement monogame ; selon eux, l'homme serait foncièrement polygyne, et la coutume du mariage ou de l'union monogame irait à l'encontre de nos tendances « naturelles ». Devant cette controverse, le terrain d'étude scientifique est quelque peu glissant se mélangeant trop facilement à la subjectivité, au vécu et aux aspirations de chacun.

Comme dit précédemment, l'observation des espèces animales semble montrer que la monogamie répond avant tout à des impératifs « économiques ». Il en va peut-être de même chez l'espèce humaine. Dans ce cas, l'évolution prévisible des sociétés modernes, en lien avec l'amélioration du statut économique des femmes, irait vers une prédominance d'une monogamie séquentielle ou sérielle, caractérisée par des changements de partenaire au cours de la vie. On peut s'inquiéter ou non des conséquences, par exemple en terme de familles recomposées que j'aime bien appeler « en kit ». Mais gardons en mémoire que chez certains oiseaux, chaque saison de reproduction se solde par un divorce ; ces oiseaux s'en portent-ils plus mal ?

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Adhami BH, Doenhoff M, Thornhill J, Akhka A, White E, Kusel JR, 2001. A study of some characteristics of individual clones of *Schistosoma mansoni* with emphasis on the biological and metabolic activities. *Parasitology* 123:563-572.
- Allaine D, Brondex F, Graziani L, Coulon J, Till-Bottraud I, 2000. Male-biased sex ratio in litters of Alpine marmots supports the helper repayment hypothesis. *Behavioral Ecology* 11:507-514.
- Andersson M, 1994. Sexual selection. Princeton University Press.
- Armstrong JC, 1965. Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *Journal of Parasitology* 51:605-616.
- Atkinson KH, Atkinson BG, 1980. Biochemical basis for the continuous copulation of female *Schistosoma mansoni*. *Nature* 283:478-479.
- Basch PF, 1990. Why do schistosomes have separate sexes ? *Parasitology Today* 6:160-163.
- Basch PF, 1991. Schistosomes. Development, reproduction, and host relations. New-York: Oxford University Press.
- Basch PF, Nicolas C, 1989. *Schistosoma mansoni*: pairing of male worms with artificial surrogate females. *Experimental Parasitology* 68:202-207.
- Beltran S, Boissier J, 2008. Schistosome monogamy: who, how, and why? *Trends in Parasitology* 24:386-391.
- Beltran S, Boissier J, 2009a. Are schistosomes socially and genetically monogamous? *Parasitology Research* 104:481-483.
- Beltran S, Boissier J, 2009b. Male Biased Sex Ratio: Why and What Consequences for *Schistosoma* Genus? *Trends in Parasitology*: submitted.
- Beltran S, Cézilly F, Boissier J, 2008a. Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. *PLoS ONE* 3:e3328.
- Beltran S, Cézilly F, Boissier J, 2009a. Adult sex ratio affects divorce rate in the monogamous endoparasite *Schistosoma mansoni*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63:1363-1368.
- Beltran S, Desdevises Y, Portela J, Boissier J, 2009b. Mating systems and evolutionary trade-offs between morpho-anatomical features in Schistosomatidae. Under writing.
- Beltran S, Galinier R, Allienne JF, Boissier J, 2008b. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103:501-503.
- Beltran S, Gourbal B, Mitta G, Duval D, Pierce RJ, Theron A, Boissier J, 2009c. Molecular basis of genotype dependant concomitant immunity in *Schistosoma mansoni*: candidate proteins identified by a proteomic approach. In writing.
- Blomqvist D, Kempnaers B, Lanctot RB, Sandercock BK, 2002. Genetic parentage and mate guarding in the arctic-breeding western sandpiper. *The Auk* 119:228-233.
- Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Mone H, 2003. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 91:144-150.
- Boissier J, Jarkovsky J, Morand S, Mone H, 2004. A model to explain the origin of a parasite sex-specific population structure. *Theoretical Population Biology* 66:269-276.
- Boissier J, Mone H, 2000. Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121:379-383.
- Boissier J, Mone H, 2001a. Male-female larval interactions in *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata*. *International Journal for Parasitology* 31:352-358.

- Boissier J, Mone H, 2001b. Relationship between worm burden and male proportion in *Schistosoma mansoni* experimentally infected rodents and primates. A meta-analytical approach. *International Journal for Parasitology* 31:1597-1599.
- Boissier J, Morand S, Mone H, 1999. A review of performance and pathogenicity of male and female *Schistosoma mansoni* during the life-cycle. *Parasitology* 119:447-454.
- Bremond P, Pasteur N, Combes C, Renaud F, Theron A, 1993. Experimental host-induced selection in *Schistosoma mansoni* strains from Guadeloupe and comparison with natural observations. *Heredity* 70:33-37.
- Brooks DR, O'Grady RT, Glen DR, 1985. Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes : Cercomeria) with comments on their adaptative radiation. *Canadian Journal of Zoology* 63:411-443.
- Brotherton PN, Manser MB, 1997. Female dispersion and the evolution of monogamy in the dik-dik. *Animal Behaviour* 54:1413-1424.
- Brouwer KC, Ndhlovu P, Munatsi A, Shiff CJ, 2001. Genetic diversity of a population of *Schistosoma haematobium* derived from schoolchildren in east central Zimbabwe. *Journal of Parasitology* 87:762-769.
- Brown JL, 1997. A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behavioral Ecology* 8:60-65.
- Brown SP, Grenfell BT, 2001. An unlikely partnership: parasites, concomitant immunity and host defence. *Proceedings of the Royal Society of London serie B Biological Sciences* 268:2543-2549.
- Bull MC, 2000. Monogamy in lizards. *Behavioral Processes* 51:7-20.
- Buss DM, 1988. From vigilance to violence: Tactics of mate retention in American undergraduates. *Ethology and Sociobiology* 9:291-317.
- Cézilly F, 2006. *Le paradoxe de l'hippocampe*. Paris: Bucher-Chastel ed.
- Cézilly F, Préault M, Dubois F, Faivre B, 2000. Pair-bonding in birds and the active role of females: a critical review of the empirical evidence. *Behavioral Processes* 51:83-92.
- Chapman T, Arnqvist G, Bangham J, Rowe L, 2003. Sexual conflict. *Trends in Ecology and Evolution* 18:41-47.
- Chitsulo L, Engels D, Montessoro A, Savioli L, 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77:41-51.
- Choudhury S, 1995. Divorce in birds: a review of the hypotheses. *Animal Behaviour* 50:413-429.
- Chu GW, Cutress CE, 1954. *Austrobilharzia variglandis* (Miller and Northup, 1926) Penner, 1953, (Trematoda: Schistosomatidae) in Hawaii with notes on its biology. *Journal of Parasitology* 40:515-523.
- Clough ER, 1981. Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. *Journal of Parasitology* 67:535-539.
- Clutton-Brock TH, Parker GA, 1995. Sexual coercion in animal societies. *Animal Behaviour* 49:1345-1365.
- Combes C, 1991. The schistosome scandal. *Acta Oecologica* 12:165-173.
- Combes C, 2001. *Parasitism : The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*. Chicago and London: The University of Chicago Press.
- Cornford EM, Fitzpatrick AM, 1985. The mechanism and rate of glucose transfer from male to female schistosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 17:131-141.
- Cornford EM, Huot M, 1981. Glucose transfer from male to female schistosomes. *Science* 213:1269-1271.
- Coulson JC, 1966. The influence of the pair-bond and age on the breeding biology of the kittiwake gull *Rissa tridactyla*. *Journal of Animal Ecology* 35:269-279.

- Crompton DWT, 1999. How much human helminthiasis is there in the world? *Journal of Parasitology* 85:397-403.
- Curtis J, Sorensen RE, Minchella DJ, 2002. Schistosome genetic diversity: the implications of population structure as detected with microsatellite markers. *Parasitology* 125 Suppl:S51-59.
- Dabo A, Durand P, Morand S, Diakite M, Languard J, Imbert-Establet D, Doumbo O, Jourdane J, 1997. Distribution and genetic diversity of *Schistosoma haematobium* within its bulinid intermediate hosts in Mali. *Acta Tropica* 66:15-26.
- Damian RT, Chapman RW, 1983. The fecundity of *Schistosoma mansoni* in baboons, with evidence for a sex ratio effect. *Journal of Parasitology* 69:987-989.
- Damian RT, Powell MR, Roberts ML, Clark JD, Stirewalt MA, Lewis FA, 1985. *Schistosoma mansoni*: parasitology and immunology of baboons vaccinated with irradiated cryopreserved schistosomula. *International Journal for Parasitology* 15:333-344.
- Danchin E, Giraldeau LA, Cézilly F, 2005. *Ecologie comportementale*, 1 ed. Paris: Dunod.
- Davison MJ, Ward SJ, 1998. Prenatal bias in sex ratios in a marsupial, *Antechinus agilis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265:2095-2099.
- Dawkins R, Krebs JR, 1979. Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 205:489-511.
- De Menten L, Fournier D, Brent C, Passera L, Vargo EL, Aron S, 2005. Dual mechanism of queen influence over sex ratio in the ant *Pheidole pallidula*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58:527-533.
- de Souza CP, Jannotti-Passos LK, Ferreira SS, Vieira IB, 1996. *Schistosoma mansoni*: the sex ratios of worms in animals infected with cercariae from three species of *Biomphalaria*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 38:141-145.
- Delehanty DJ, Fleischer RC, Colwell MA, Oring LW, 1998. Sex-role reversal and the absence of extra-pair fertilization in Wilson's phalaropes. *Animal Behaviour* 55:995-1002.
- Despres L, Maurice S, 1995. The evolution of dimorphism and separate sexes in schistosomes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 262:175-180.
- DeWoody JA, Fletcher DE, Wilkins SD, Nelson WS, Avise JC, 2000. Genetic monogamy and biparental care in an externally fertilizing fish, the largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267:2431-2437.
- Dhondt AA, Adriaensen F, 1994. Causes and effects of divorce in the blue tit *Parus caeruleus*. *Journal of Animal Ecology* 63:979-987.
- Dietz K, 1975. A pairing process. *Theoretical Population Biology* 8:81-86.
- Dumont M, Mone H, Mouahid G, Idris MA, Shaban M, Boissier J, 2007. Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 101:247-252.
- Dunn PO, Whittingham LA, Pitcher TE, 2001. Mating systems, sperm competition, and the evolution of sexual dimorphism in birds. *Evolution* 55:161-175.
- Eggert AK, Reinking M, Muller JK, 1998. Parental care improves offspring survival and growth in burying beetles. *Animal Behaviour* 55:97-107.
- Ens BJ, Safriel UN, Harris MP, 1993. Divorce in the long-lived and monogamous oystercatcher, *Haematopus ostralegus*: incompatibility or choosing the better option? *Animal Behaviour* 45:1199-1217.
- Eppert A, Lewis FA, Grzywacz C, Coura-Filho P, Caldas I, Minchella DJ, 2002. Distribution of schistosome infections in molluscan hosts at different levels of parasite prevalence. *Journal of Parasitology* 88:232-236.
- Erasmus DA, 1973. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 67:165-183.

- Evans NA, Stirewalt MA, 1951. Variations in infectivity of cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 1:19-33.
- Eveland LK, Fried B, Cohen LM, 1982. *Schistosoma mansoni*: adult worm chemoattraction, with and without barriers. *Experimental Parasitology* 54:271-276.
- Eveland LK, Fried B, Cohen LM, 1983. *Schistosoma mansoni*: adult worm chemoattraction with barriers of specific molecular weight exclusions. *Experimental Parasitology* 56:255-258.
- Fedorka KM, Mousseau TA, 2002. Tibial spur feeding in ground crickets: larger males contribute larger gifts (Orthoptera: Gryllidae). *Florida Entomologist* 85:317-323.
- Fernandez-Duque E, Juarez CP, Di Fiore A, 2008. Adult male replacement and subsequent infant care by male and siblings in socially monogamous owl monkeys (*Aotus azarai*). *Primates* 49:81-84.
- Fernando MA, Stockdale PH, Remmler O, 1971. The route of migration, development, and pathogenesis of *Syngamus trachea* (Montagu, 1811) Chapin, 1925, in pheasants. *Journal of Parasitology* 57:107-116.
- Foerster K, Delhey K, Johnsen A, Lifjeld JT, Kempenaers B, 2003. Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. *Nature* 425:714-717.
- Foster SJ, Vincent ACJ, 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Ecology* 65:1-61.
- Fromhage L, McNamara JM, Houston AI, 2008. A model for the evolutionary maintenance of monogyny in spiders. *Journal of Theoretical Biology* 250:524-531.
- Gasser RB, Morahan G, Mitchell GF, 1991. Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* 47:255-258.
- Ghaleb AM, Atwood Iii J, Morales-Montor J, Damian RT, 2006. A 3 kDa peptide is involved in the chemoattraction in vitro of the male *Schistosoma mansoni* to the female. *Microbes and Infection* 8:2367-2375.
- Gillette JR, Jaeger RG, Peterson MG, 2000. Social monogamy in a territorial salamander. *Animal Behaviour* 59:1241-1250.
- Gower CM, Shrivastava J, Lambertson PHL, Rollinson D, Webster BL, Emery A, Kabatereine NB, Webster JP, 2007. Development and application of an ethically and epidemiologically advantageous assay for the multi-locus microsatellite analysis of *Schistosoma mansoni*. *Cambridge Journals Online*; 523-536.
- Gower CM, Webster JP, 2005. Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution* 59:544-553.
- Griffith SC, F. OIP, A. TK, 2002. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11:2195-2212.
- Gubernick DJ, Teferi T, 2000. Adaptive significance of male parental care in a monogamous mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267:147-150.
- Gupta BC, Basch PF, 1987. Evidence for transfer of a glycoprotein from male to female *Schistosoma mansoni* during pairing. *Journal of Parasitology* 73:674-675.
- Gwynne D, 1991. Sexual competition among females: what causes courtship-role reversal? *Trends in Ecology and Evolution* 6:118-121.
- Hall ML, Magrath RD, 2000. Duetting and mate-guarding in Australian magpie-larks (*Grallina Cyanoleuca*). *Behavioural Ecology and Sociobiology* 47:180-187.
- Hamilton WD, 1967. Extraordinary sex ratios. A sex-ratio theory for sex linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology. *Science* 156:477-488.
- Harcourt AH, Harvey PH, Larson SG, Short RV, 1981. Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature* 293:55-57.

- Harding JA, Almany GR, Houck LD, Hixon MA, 2003. Experimental analysis of monogamy in the Caribbean cleaner goby, *Gobiosoma evelynae*. *Animal Behaviour* 65:865-874.
- Hardy IC, 2002. Sex Ratios. Concepts and research methods. Cambridge: Cambridge University Press.
- Harrison RA, Bickle Q, Doenhoff MJ, 1982. Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanisms which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. *Parasitology* 84:93-110.
- Haseeb MA, Eveland LK, 1991. *Schistosoma mansoni*: a chemoattractive factor released by males and its receptor in females. *Experientia* 47:970-974.
- Haseeb MA, Fried B, Eveland LK, 1989. *Schistosoma mansoni*: female-dependent lipid secretion in males and corresponding changes in lipase activity. *International Journal for Parasitology* 19:705-709.
- Haseeb MA, Thors C, Linder E, Eveland LK, 2008. *Schistosoma mansoni*: Chemoreception through n-acetyl-d-galactosamine-containing receptors in females offers insight into increased severity of schistosomiasis in individuals with blood group A. *Experimental Parasitology* 119:67-73.
- Haseeb MA, Eveland LK, Fried B, 1985. The uptake, localisation and transfert of [4-14C]-cholesterol in *Schistosoma mansoni* males and females maintained in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology* 82:421-423.
- Hasselquist D, Sherman PW, 2001. Social mating systems and extra pair fertilizations in passerine birds. *Behavioral Ecology* 12:457-466.
- Hatchwell BJ, Russell AF, Ross DJ, Fowlie MK, 2000. Divorce in cooperatively breeding long-tailed tits: a consequence of inbreeding avoidance? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267:813-819.
- Hoagland KE, 1978. Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the Mollusca. *Malacologia* 17 365-391.
- Hosken DJ, Garner TWJ, Ward PI, 2001. Sexual conflict selects for male and female reproductive characters. *Current Biology* 11:489-493.
- Hughes C, 1998. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology* 79:383-399.
- Hunter FM, Burke T, Watts SE, 1992. Frequent copulation as a method of paternity assurance in the northern fulmar. *Animal Behaviour* 44:149-156.
- Imperia PS, Fried B, Eveland LK, 1980. Pheromonal attraction of *Schistosoma mansoni* females toward males in the absence of worm-tactile behavior. *Journal of Parasitology* 66:682-684.
- Iossa G, Soulsbury CD, Baker PJ, Harris S, 2008. Sperm competition and the evolution of testes size in terrestrial mammalian carnivores. *Functional Ecology* 22:655-662.
- Iribarne O, Fernandez M, Armstrong D, 1996. Mate choice in the amphipod *Eogammarus oclairi* bousfield: The role of current velocity, random assortment, habitat heterogeneity and male's behavior. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 27:223-237.
- Iyengar VK, Starks BD, 2008. Sexual selection in harems: Male competition plays a larger role than female choice in an amphipod. *Behavioral Ecology* 19:642-649.
- Jirotkul M, 1999. Operational sex ratio influences female preference and male-male competition in guppies. *Animal Behaviour* 58:287-294.
- Jones JT, Kusel JR, 1989. Intra-specific variation in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Today* 5:37-39.
- Jormalainen V, Merilaita S, 1995. Female resistance and duration of mate-guarding in three aquatic peracarids (Crustacea). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36:43-48.

- Jormalainen V, Merilaita S, Tuomi J, 1994. Male choice and male-male competition in *Idotea baltica* (Crustacea, Isopoda). *Ethology* 96:46-57.
- Kenagy GJ, Trombulak SC, 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy* 67:1-22.
- Kokko H, Jennions MD, 2008. Parental investment, sexual selection and sex ratios. *Journal of Evolutionary Biology*:in press, accepted in March 2008.
- Komers PE, 1996. Obligate monogamy without parental care in Kirk's dikdik. *Animal Behaviour* 51:131-140.
- Komers PE, Brotherton PN, 1997. Female space use is the best predictor of monogamy in mammals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 264:1261-1270.
- Kvarnemo C, 2006. Evolution and maintenance of male care: is increased paternity a neglected benefit of care? *Behavioral Ecology* 17:144-148.
- Kvarnemo C, Ahnesjö I, 1996. The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends in Ecology and Evolution* 11:404-408.
- Kvarnemo C, Moore GI, Jones AG, Nelson WS, Avise JC, 2000. Monogamous pair bonds and mate switching in the Western Australian seahorse *Hippocampus subelongatus*. *Journal of Evolutionary Biology* 13:882-888.
- Lambrechts L, Fellous S, Koella JC, 2006. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends in Parasitology* 22:12-16.
- Le Galliard J, Fitze P, Ferrière R, Clobert J, 2005. Sex ratio bias, male aggression, and population collapse in lizards. *PNAS* 102:18231-18236.
- Liberatos JD, 1987. *Schistosoma mansoni*: male-biased sex ratios in snails and mice. *Experimental Parasitology* 64:165-177.
- Liberatos JD, Short RB, 1983. Identification of sex of schistosome larval stages. *Journal of Parasitology* 69:1084-1089.
- Loker ES, Brant SV, 2006. Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends in Parasitology* 22:521-528.
- Love PT, Andrade LF, Oliveira G, 2009. Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. *Current Opinion in Microbiology*, in press.
- Love PT, De Wald J, Minchella DJ, Bosshardt SC, Damian RT, 1985. Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 71:297-301.
- LoVerde PT, Hirai H, Merrick JM, Lee NH, El-Sayed N, 2004a. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitology International* 53:183-192.
- LoVerde PT, Niles EG, Osman A, Wenjie W, 2004b. *Schistosoma mansoni* male-female interactions. *Canadian Journal of Zoology* 82:357-374.
- Maness TJ, Anderson DJ, 2007. Serial monogamy and sex ratio bias in Nazca boobies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:2047-2054.
- Martin OY, Hosken DJ, 2003. The evolution of reproductive isolation through sexual conflict. *Nature* 423:979-982.
- Mathews LM, 2002. Territorial cooperation and social monogamy: factors affecting intersexual behaviours in pair-living snapping shrimp. *Animal Behaviour* 63:767-777.
- Mathews LM, 2003. Tests of the mate-guarding hypothesis for social monogamy: male snapping shrimp prefer to associate with high-value females. *Behavioral Ecology* 14:63-67.
- Matsumoto K, Yanagisawa Y, 2001. Monogamy and sex role reversal in the pipefish *Corythoichthys haematopterus*. *Animal Behaviour* 61:163-170.
- Maule AG, Marks NJ, 2006. in *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*. Edited by Queen's University, Belfast, Northern Ireland.
- May RM, 1977. Togetherness among schistosomes: its effects on the dynamics of the infection. *Mathematical Biosciences* 35:301-343.

- Maynard Smith J, 1978. *The Evolution of Sex*: Cambridge University Press.
- Mayr CE, 1982. *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution and Inheritance*, Cambridge, Harvard University Press, 1982 - traduit en français sous le titre de *Histoire de la biologie. Diversité, évolution et hérédité*, Fayard (1989) : 894 p. .
- Mayr E, 1939. The sex ratio in wild birds. *The American Naturalist* 73:156-179.
- McKown RD, Veatch JK, Fox LB, 1991. New locality record for *Heterobilharzia americana*. *Journal of wildlife diseases* 27:156-160.
- Mitchell GF, Garcia EG, Wood SM, Diasanta R, Almonte R, Calica E, Davern KM, Tiu WU, 1990. Studies on the sex ratio of worms in schistosome infections. *Parasitology* 101:27-34.
- Moller PA, Cuervo JJ, 2000. The evolution of paternity and paternal care in birds. *Behavioral Ecology* 11:472-485.
- Mone H, 1997. Change in schistosome *sex ratio* under the influence of a biotic environmental-related factor. *Journal of Parasitology* 83:220-223.
- Mone H, Boissier J, 2004. Sexual Biology of Schistosomes. *Advances in Parasitology* 57:89-189.
- Monnin T, Peeters C, 1998. Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *Animal Behaviour* 55:299-306.
- Moore DV, Sandground JH, 1956. The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 5:831-840.
- Morand S, Muller-Graf CD, 2000. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. *Parasitology* 120:45-56.
- Morand S, Pointier JP, Borel G, Theron A, 1993. Pairing probability of schistosomes related to their distribution among the host population. *Ecology* 74:2444-2449.
- Najim AT, 1956. Life history of *Gigantobilharzia huronensis* Najim, 1950; a dermatitis-producing bird blood-fluke (Trematoda-Schistosomatidae). *Parasitology* 46:443-469.
- Neff BD, 2003. Decisions about parental care in response to perceived paternity. *Nature* 422:716-719.
- Neves RH, de Lamare Biolchini C, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Branquinho TB, Lenzi HL, Hulstijn M, Gomes DC, 2005. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitology Research* 95:43-49.
- Nino Incani R, Morales G, Cesari IM, 2001. Parasite and vertebrate host genetic heterogeneity determine the outcome of infection by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 87:131-137.
- Nollen PM, 1983. Patterns of sexual reproduction among parasitic platyhelminths. *Parasitology* 86:99-120.
- Nosanchuk JS, Wade SE, Landolf M, 1995. Case report of and description of parasite in *Mammomonogamus laryngeus* (human syngamiasis) infection. *Journal of Clinical Microbiology* 33:998-1000.
- Ospina-Alvarez N, Piferrer F, 2008. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS ONE* 3:e2837.
- Pages JR, Southgate VR, Tchuem Tchuente LA, Jourdane J, 2001. Lack of prezygotic isolation by assortative mating between the two cryptic species of the polytypic *Schistosoma intercalatum* taxon. *Parasitology Research* 87:888-890.

- Palombit RA, 1996. Pair Bonds in Monogamous Apes: a Comparison of the Siamang *Hylobates Syndactylus* and the White-Handed Gibbon *Hylobates Lar*. Behaviour 133:321-356.
- Parker GA, 1998. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: Birkhead TR, Møller AP, editors Sperm competition and sexual selection, Academic Press; London:3-54.
- Parker GA, Ball MA, Stockley P, Gage MJ, 1997. Sperm competition games: a prospective analysis of risk assessment. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 264:1793-1802.
- Paul F D, 2007. Adult sex ratios in wild bird populations. Ibis 149:671-692.
- Pellegrino J, Coelho PM, 1978. *Schistosoma mansoni*: wandering capacity of a worm couple. Journal of Parasitology 64:181-182.
- Pennisi E, 1998. A genomic battle of the sexes. Science 281:1984.
- Penschow JD, Gasser RB, Darling PE, Mitchell GF, 1993. Female-specific genomic PCR sequences from *Schistosoma mansoni* as probes for hybridization histochemistry. International Journal for Parasitology 23:407-409.
- Pereira HM, Loarie SR, Roughgarden J, 2002. Monogamy, polygyny and interspecific interactions in the lizards *Anolis pogus* and *Anolis gingivinus*. Caribbean Journal of Science 38:132-136.
- Pica-Mattocchia L, Moroni R, Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Cioli D, 2000. Changes of mate occur in *Schistosoma mansoni*. Parasitology 120:495-500.
- Pitcher TE, Dunn PO, Whittingham LA, 2005. Sperm competition and the evolution of testes size in birds. Journal of Evolutionary Biology 18:557-567.
- Pitnick S, Jones KE, Wilkinson GS, 2006. Mating system and brain size in bats. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 273:719-724.
- Platt TR, Blair D, Purdie J, Melville L, 1991. *Griphobilharzia amoena* N. Gen., N. Sp (Digenea: Schistosomatidae), a parasite of the freshwater crocodile *Crocodylus Johnstoni* (Reptilia: Crocodylia) from Australia, with the erection of a new subfamily, Griphobilharziinae. Journal of Parasitology 77:65-68.
- Platt TR, Brooks DR, 1997. Evolution of the schistosomes (Digenea: Schistosomatoidea): the origin of dioecy and colonization of the venous system. Journal of Parasitology 83:1035-1044.
- Poirier NE, Whittingham LA, Dunn PO, 2004. Males achieve greater reproductive success through multiple broods than through extrapair mating in house wrens. Animal Behaviour 67:1109-1116.
- Popiel I, Basch PF, 1986. *Schistosoma mansoni*: cholesterol uptake by paired and unpaired worms. Experimental Parasitology 61:343-347.
- Portela J, Grunau C, Cosseau C, Beltran S, Dantec C, Parrinello H, Boissier J, 2009. Whole-genome comparison: identification of sex-specific sequences in *Schistosoma mansoni*. Nature Methods: submitted.
- Poulin R, 2005. Detection of interspecific competition in parasite communities. Journal of Parasitology 91:1232-1235.
- Poulin R, Fitzgerald G, 1989. Male-biased sex ratio in *Argulus canadensis* Wilson, 1916 (Crustacea: Branchiura) ectoparasitic on sticklebacks. Canadian Journal of Zoology 67:2078-2080
- Pribil S, Searcy WA, 2001. Experimental confirmation of the polygyny threshold model for red-winged blackbirds. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 268:1643-1646.
- Prosen ED, Jaeger RG, Lee DR, 2004. Sexual coercion in a territorial salamander: females punish socially polygynous male partners. Animal Behaviour 67:85-92.

- Prugnolle F, De Meeûs T, Durand P, Sire C, Theron A, 2002. Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Molecular Ecology* 11:1231-1238.
- Ramm SA, Parker GA, Stockley P, 2005. Sperm competition and the evolution of male reproductive anatomy in rodents. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272:949-955.
- Reichard U, Boesch C, 2003. *Monogamy: Mating Strategies and Partnerships in Birds, Humans and other Mammals*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Richardson DS, Burke T, Komdeur J, von Schantz T, 2005. MHC-based patterns of social and extra-pair mate choice in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272:759-767.
- Roberts SC, Hale ML, Petrie M, 2006. Correlations between heterozygosity and measures of genetic similarity: implications for understanding mate choice. *Journal of Evolutionary Biology* 19:558-569.
- Roger E, Grunau C, Pierce RJ, Hirai H, Gourbal B, Galinier R, Emans R, Cesari IM, Cosseau C, Mitta G, 2008a. Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite (*Schistosoma mansoni*) Interacting with Its Invertebrate Host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2:e330.
- Roger E, Mitta G, Moné Y, Bouchut A, Rognon A, Grunau C, Boissier J, Théron A, Gourbal BEF, 2008b. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Molecular and Biochemical Parasitology* 157:205-216.
- Rowntree S, James C, 1977. Single sex cercariae of *Schistosoma mansoni*, a comparison of male and female infectivity. *Journal of helminthology* 51:69-70.
- Runcie MJ, 2000. Biparental care and obligate monogamy in the rock-haunting possum, *Petropseudes dahli*, from tropical Australia. *Animal Behaviour* 59:1001-1008.
- Schillaci MA, 2006. Sexual selection and the evolution of brain size in primates. *PLoS ONE* 1:e62.
- Schwartz MK, Boness DJ, Schaeff CM, Majluf P, Perry EA, Fleischer RC, 1999. Female-solicited extrapair matings in Humboldt penguins fail to produce extrapair fertilizations. *Behavioral Ecology* 10:242-250.
- Short RB, 1983. Presidential address: Sex and the single schistosome. *Journal of Parasitology* 69:3-22.
- Shrivastava J, Gower CM, Balolong EJ, Wang TP, Qian BZ, Webster JP, 2005. Population genetics of multi-host parasites-the case for molecular epidemiological studies of *Schistosoma japonicum* using larval stages from naturally infected hosts. *Parasitology* 131:617-626.
- Silveira AM, Friche AA, Rumjanek FD, 1986. Transfer of [14C] cholesterol and its metabolites between adult male and female worms of *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85:851-857.
- Simmons LW, Emlen DJ, 2006. Evolutionary trade-off between weapons and testes. *PNAS* 103:16346-16351.
- Simoes M, Bahia D, Zerlotini A, Torres K, Artiguenave F, Neshich G, Kuser P, Oliveira G, 2007. Single nucleotide polymorphisms identification in expressed genes of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 154:134-140.
- Sire C, Langand J, Barral V, Theron A, 2001. Parasite (*Schistosoma mansoni*) and host (*Biomphalaria glabrata*) genetic diversity: population structure in a fragmented landscape. *Parasitology* 122:545-554.

- Smith HG, Sandell MI, Bruun M, 1995. Paternal care in the European starling, *Sturnus vulgaris*: incubation. *Animal Behaviour* 50:323-331.
- Smithers SR, Terry RJ, 1969. The immunology of schistosomiasis. *Advances in Parasitology* 7: 1-93.
- Sodhi NS, 1991. Pair Copulations, Extra-Pair Copulations, and Intraspecific Nest Intrusions in Merlin. *The Condor* 93:433-437.
- Sorensen RE, Rodrigues NB, Oliveira G, Romanha AJ, Minchella DJ, 2006. Genetic filtering and optimal sampling of *Schistosoma mansoni* populations. *Parasitology* 133:443-451.
- Stanback M, Richardson DS, Boix-Hinzen C, Mendelsohn J, 2002. Genetic monogamy in Monteiro's hornbill, *Tockus monteiri*. *Animal Behaviour* 63:787-793.
- Standen OD, 1953a. The penetration of the cercariae of *Schistosoma mansoni* into the skin and lymphatics of the mouse. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 47:292-298.
- Standen OD, 1953b. The relationship of sex in *Schistosoma mansoni* to migration within the hepatic portal system of experimentally infected mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 47:139-145.
- Steinauer ML, 2009. The sex lives of parasites: Investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* 39:1157-1163.
- Steinauer ML, Agola LE, Mwangi IN, Mkoji GM, Loker ES, 2008. Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni*: a robust, high-throughput method to assess multiple microsatellite markers from individual miracidia. *Infection, Genetics and Evolution* 8:68-73.
- Stirewalt MA, Fregeau WA, 1968. Effect of selected experimental conditions on penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in mice. II. Parasite-related conditions. *Experimental Parasitology* 22:73-95.
- Stohler RA, Curtis J, Minchella DJ, 2004. A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* 34:595-601.
- Svendsen G, 1989. Pair formation, duration of pair-bonds, and mate replacement in a population of beavers (*Castor canadensis*). *Canadian Journal of Zoology* 67:336-340.
- Tchuem Tchuente LA, Imbert-Establet D, Delay B, Jourdane J, 1993. Choice of mate, a reproductive isolating mechanism between *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni* in mixed infections. *International Journal for Parasitology* 23:179-185.
- Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Combes C, Jourdane J, 1996. Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful? *Trends in Parasitology* 12:231-236.
- Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Imbert-Establet D, Jourdane J, 1995. Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology* 110:45-52.
- Theron A, Coustau C, 2005. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *Journal of helminthology* 79:187-191.
- Theron A, Coustau C, Rognon A, Gourbiere S, Blouin MS, 2008. Effects of laboratory culture on compatibility between snails and schistosomes. *Parasitology* 135:1179-1188.
- Theron A, Gérard C, 1994. Development of accessory sexual organs in *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) in relation to timing of infection by *Schistosoma mansoni* : consequences for energy utilization patterns by the parasite. *Journal of Molluscan Studies* 60:25-31.
- Theron A, Pages JR, Rognon A, 1997. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Experimental Parasitology* 85:1-9.

- Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P, 2004. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology* 129:571-585.
- Toro MA, Fernandez A, Garcia-Cortes LA, Rodriganez J, Silio L, 2006. Sex ratio variation in Iberian pigs. *Genetics* 173:911-917.
- Tregenza T, Wedell N, 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Molecular Ecology* 9:1013-1027.
- Valentim CLL, LoVerde PT, Anderson TJC, Criscione CD, 2009. Efficient genotyping of *Schistosoma mansoni* miracidia following whole genome amplification. *Molecular and Biochemical Parasitology* 166:81-84.
- van Breukelen NA, Draud M, 2005. The roles of male size and female eavesdropping in divorce in the monogamous convict cichlid (*Archocentrus nigrofasciatus*, *Cichlidae*). *Behaviour* 142:1023-1035.
- Vollrath F, 1998. Dwarf males. *Trends in Ecology and Evolution* 13:159-163.
- Wang J, 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160:1203-1215.
- Wapstra E, Uller T, Sinn DL, Olsson M, Mazurek K, Joss J, Shine R, 2009. Climate effects on offspring sex ratio in a viviparous lizard. *Journal of Animal Ecology* 78:84-90.
- Warkentin IG, Curzon AD, Carter RE, Wetton JH, James PC, Parkin DT, Oliphant LW, 1994. No evidence for extra-pair fertilizations in the Merlin revealed by DNA fingerprinting. *Molecular Ecology* 3:229-234.
- Weatherhead PJ, Dufour KW, Lougheed SC, Eckert CG, 1999. A test of the good-genes-as-heterozygosity hypothesis using red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology* 10:619-625.
- Webster P, Mansour TE, Bieber D, 1989. Isolation of a female-specific, highly repeated *Schistosoma mansoni* DNA probe and its use in an assay of cercarial sex. *Molecular and Biochemical Parasitology* 36:217-222.
- Westneat DF, Mays HL, 2005. Tests of spatial and temporal factors influencing extra-pair paternity in red-winged blackbirds. *Molecular Ecology* 14:2155-2167.
- Whiteman EA, Côté IM, 2003. Social monogamy in the cleaning goby *Elacatinus evelynae*: ecological constraints or net benefit? *Animal Behaviour* 66:281-291.
- Woodard JD, Murphy MT, 1999. Sex roles, parental experience and reproductive success of eastern kingbirds, *Tyrannus tyrannus*. *Animal Behaviour* 57:105-115.
- Wright HWY, 2006. Paternal den attendance is the best predictor of offspring survival in the socially monogamous bat-eared fox. *Animal Behaviour* 71:503-510.
- Zavodna M, Sandland GJ, Minchella DJ, 2008. Effects of intermediate host genetic background on parasite transmission dynamics: a case study using *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 120:57-61.
- Zuk M, 2009. The sicker sex. *PLoS Pathogens* 5:e1000267.

Annexe 1 :

Article soumis dans Nature Methods sur l'identification de nouveaux marqueurs du sexe chez *S. mansoni* : « Whole-genome comparison : identification of sex-specific sequences in *Schistosoma mansoni* ».

Whole-genome comparison: identification of sex-specific sequences
in *Schistosoma mansoni*

Julien Portela¹, Christoph Grunau¹, Céline Cosseau¹, Sophie Beltran¹, Christelle Dantec²,
Hugues Parrinello² & Jérôme Boissier^{1*}

¹ UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD. Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, CBETM.
Université de Perpignan. France.

² Plateforme MGX, Institut de Génomique Fonctionnelle 141, rue de la Cardonille,
Montpellier. France.

Keywords: Whole-genome comparison, *Schistosoma mansoni*, sex specific marker, massive
sequencing

***Corresponding authors :**

J. Boissier

Laboratoire de Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, Centre de Biologie et d'Écologie
Tropicale et Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD, 52 Avenue Paul Alduy,
66860 Perpignan Cedex, France

Email: boissier@univ-perp.fr

Tel: +33 4 68 66 20 50

Fax: +33 4 68 66 22 81

Abstract

We report a technique to identify sex-specific sequences based on massive parallel sequencing and straightforward bioinformatics analysis of unique and repetitive sequences. It is possible to apply this technique to any species in which genetic differences between the sexes exist. Here, we used *Schistosoma mansoni* as a model. It can also be envisaged to exploit this approach for the detection of sequence variations between strains (*e.g.* pathovars) or closely related species.

Emerging methods of massive sequencing that allow for rapid re-sequencing entire genomes for relatively little money is changing the way biological questions are addressed in many domains. Recently, for instance, whole-genome wide sequence variation in *Caenorhabditis elegans* was assessed comparing Solexa Sequence Analyser reads to a reference genome (strain-to-reference comparison) (Hillier *et al.*, 2008). Here, we describe how to identify differences in the DNA sequence of two genomes obtained by massive parallel sequencing approach (strain-to-strain comparison). We used the method to identify sex specific sequences in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *S. mansoni* (Trematoda: Digenea) is a gonochoric endoparasite causing a serious human disease called schistosomiasis. Schistosomiasis ranks second only to malaria in terms of parasite induced human morbidity and mortality, with over 200 million people infected worldwide. In schistosomes, sex is determined by sex chromosomes, with female being the heterogametic sex (ZW) and male the homogametic sex (ZZ) (Short, 1983). If male and female adult worms show evident phenotypic dimorphism, the larval stages are morphologically indistinguishable making sex-specific infection, crosses and linkage studies extremely difficult (for the life cycle see supplementary figure 1). Traditional methods of identification of W-specific sequences have failed to deliver faithful markers (Grevelding, 1999). We reasoned that male (ZZ) vs. female (ZW) whole genome comparison would enable to identify female specific sequence only present on the W chromosome.

In this study we used a *S. mansoni* strain isolated from naturally infected molluscs from Guadeloupe (French West Indies), a Guadeloupean strain of *Biomphalaria glabrata* as intermediate hosts, and the Swiss OF1 mouse strain as final hosts. Methods for mollusc, mouse infections and parasite recovery have been previously described (Boissier, Mone, 2000). Briefly, mollusc infection consists in a simple contact in spring water between parasite larvae (miracidia) and molluscs, mouse infection is performed under general

anaesthesia and parasite larvae (cercariae) penetrate naturally through the host skin, and finally parasite recovery is performed by hepatic perfusion of the mouse. DNA from 23 male and 91 female grown in mice infected with a single sex and of the same clonal population was extracted using a method adapted to ChIP-Seq but without the immunoprecipitation step (Cosseau *et al.*, 2009).

Solexa sequencing was performed at the sequencing facilities of GenomiX Montpellier (France) on a Genome Analyzer II (Illumina) by single end sequencing. 8,600,198 and 9,355,380 sequence reads were produced with GAPipeline 1.3 for the male and female, respectively, and 65.2 % (female) and 70.3% (male) of the reads were aligned to unique sequences in the reference genome (Berriman *et al.*, 2009) (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Schistosoma/mansoni/genome/gene_predictions/GFF)

. As for many species, the *S. mansoni* genome is sequenced but only partially assembled resulting in a high number (19022) of individual scaffolds. Perl scripts were used to split the alignment results into individual files for each scaffold (SeparateElandReads.pl) and aligned reads ("hits") were counted (AnalyzeElandFiles.pl). This allowed for identification of scaffolds with a low number of hits in the male and high hit counts in the female, *i.e.* female-specific sequences. For visualization in a genome browser, the Eland output (s_x_sorted.txt) was converted into the classical Eland format (s_x_eland_result.txt) with a perl script (available on request), and used for generation of wiggle and gff files with FindPeaks 3.1 (Fejes *et al.*, 2008). Wiggle files were uploaded to an in-house Gbrowse server, and female-specific sequences were confirmed by visual inspection of candidate scaffolds. Regions on these scaffolds that showed hits only from the female genome were used for primer design (see below). Roughly 40% of the *S. mansoni* genome is composed of repetitive sequences. The conventional alignment algorithms cannot use these sequences, and they are in general not considered for analysis. To make use of these

repeats, we exploited the repeatmasker database of *S. mansoni* (ftp://ftp.tigr.org/pub/data/Eukaryotic_Projects/s_mansoni/preliminary_annotation/homology_evidence/smal.repeats.gz) to produce a pseudogenome that is composed of repeats with each repeat occurring only once. This pseudogenome was indexed with 2bwt-builder of soap2.17 (Li *et al.*, 2008), and the Solexa fastq files were used for alignment with SOAP. 16.20% (female) and 15.06% (male) of the reads mapped to the pseudogenome, *i.e.* were identified as repeats. Taking into account the above-mentioned unique sequences, this leaves 18.6 % (female) and 14.64 % (male) unidentified. From the soap output, repeats with at least five hits and for which at least 95% of the total hits occurred in the female genome were used for further analysis (Table 1). Soap files were converted into gff format with a tool of the pass utilities (Campagna *et al.*, 2009) and distribution of hits was visualized with gff2ps (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=gff2ps>). Visual inspection revealed that all male sequences occurred exclusively on the flanks of the repeats corresponding probably to integration and/or excision sites. As a result of this straightforward bioinformatics analysis, six unique sequences and five repeats (R=407, R=879, Sm_alpha fem1, R=564, R=172) were identified to be female specific. Only one of the sequences had been identified before: Sm_alpha fem1 (GenBank U12442.1) was isolated in 1995 by a subtractive hybridization process as female-specific sequence of the alpha retrotransposon family (Drew, Brindley, 1995). One repeat (R=407) has 95% identity to a *S. mansoni* female-specific repetitive DNA W2 (GenBank U10109.1). Subsequently, PCR were done that confirmed the *in-silico* analysis. *Schistosoma mansoni* W specific primers pairs (SmWSPP, see supplementary Table 1) were designed in the female-specific regions using Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) and checked for specificity using Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Because of its short length, no primers were designed for repeat R=172. DNA from male and female adult

worms was extracted (Beltran *et al.*, 2008) and PCR amplifications were performed in duplicate. PCR reactions were carried out in a total volume of 10 μ l containing 1 μ l of 10X buffer (450 mM Tris HCl (pH 8.8), 110 mM ammonium sulfate, 45 mM MgCl₂, 67 mM beta-mercaptoethanol, 44 μ M EDTA (pH 8), 1.13 mg/mL BSA) (Jeffreys *et al.*, 1990), 2 pmol of each oligonucleotide primer, 1 mM of each dNTP (Promega), 0.5 unit of GoTaq polymerase (Promega, Madison, Wisconsin), 1 μ l of extracted DNA and DNase-free water. PCR program consisted in an initial denaturation phase at 95°C for 5 min, followed by a suitable number of cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 60 s or less, and a final extension at 72°C for 10 min. For details see supplementary Tables 1 and 2. All tested primer pairs showed the PCR product at the expected size on the adult female but not on the adult male parasite (Figure 1). For SmWSPP 9 (Sm_alpha_{fem1}), W-specific PCR products of different size were amplified probably due to the repetitive nature of the target sequence. The same results were obtained on individual parasite larval stages (data not shown).

For the first time, this paper reports how to use massive parallel sequencing for identifying differences in the DNA sequence of two genomes of metazoan organism. Our method proved to be efficient for the rapid identification of sex-specific sequences. To determine the mode of sex determination is a challenging question for many species (Staelens *et al.*, 2008). Using massive sequencing and PCR to exhaustively detect and confirm sex-specific sequences is a reliable and straightforward method to clarify the sex determination issue. The identified markers can be used to identify the sex of individuals in early developmental stages or adults in species without apparent sexual dimorphism (such as *S. mansoni*). It would also be possible to control the sex in domestic animal reproduction in livestock industry (Chen *et al.*, 2009; Horng, Huang, 2003). Other applications lie in molecular ecology to identify sex-specific patterns like biased sex-ratio or bias in the dispersal of each

sex (Scribner *et al.*, 2001; Yannic *et al.*, 2008). In addition to male-to-female comparison, our approach can be used to identify genetic differences between strains, pathovars or even closely related species opening up a wide range of possible applications.

Acknowledgement

This work was supported by the ANR (Program Monogamix ANR-08-BLAN-0214-02, Program Schistophepigen ANR-07-BLAN-0119-02 and Program Schisto-Med ANR-08-MIEN-026-01). The authors wish to thank Bernard Dejean for technical assistance. CC is a recipient of a CNRS post-doctoral fellowship.

	repeat	female hits	male hits	% female	Length (bp)
	R=407	2730	0	100	2664
T	R=879	1141	1	99.91	654
	Sm_alpha fem1	19415	28	99.86	338
	R=564	1487	11	99.27	1129
	R=172	1758	85	95.39	104

Table 1. Name and number of female and male hits and length of the selected repeats. Repeats were considered as female (W) specific if at least five hits occurred and if at least 95% of the total hits occurred in the female genome

Figure 1. Ethidiumbromid stained agarose gel (1.5%) with PCR products for each W-specific primer pair (SmWSPP1-10, supplementary table 1). Positive control (c+) is a primer pair in the autosomal rhodopsine gene, negative control (c-) is water. M is size marker (100 bp, Promega). Two strains of *S. mansoni* were analysed (DFO (top) and BRE (bottom panel)). On upper part of each panel, PCR products for DNA of female adults, on the bottom part, PCR on DNA of male adults.

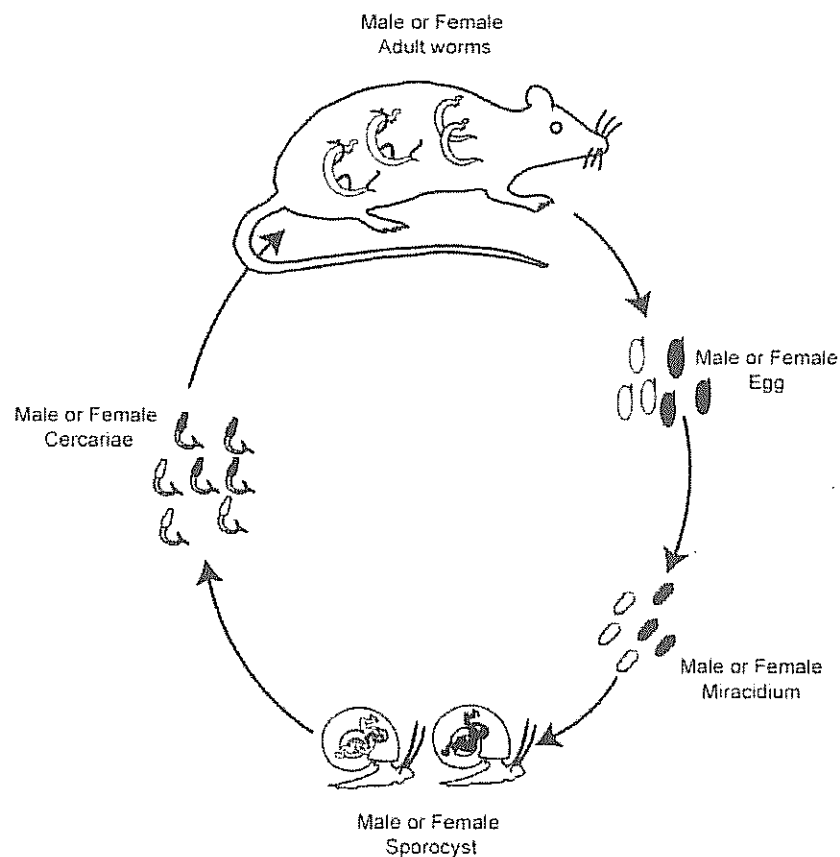
References

- Beltran S, Galinier R, Allienne JF, Boissier J (2008) Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**, 501-503.
- Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, *et al.* (2009) The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* **460**, 352-358.
- Boissier J, Mone H (2000) Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* **121** (Pt 4), 379-383.
- Campagna D, Albiero A, Bilardi A, *et al.* (2009) PASS: a program to align short sequences. *Bioinformatics* **25**, 967-968.
- Chen J, Wang Y, Yue Y, *et al.* (2009) A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol Cell Probes*.
- Cosseau C, Azzi A, Smith K, *et al.* (2009) Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of *Schistosoma mansoni*: Critical experimental parameters. *Mol Biochem Parasitol* **166**, 70-76.
- Drew AC, Brindley PJ (1995) Female-specific sequences isolated from *Schistosoma mansoni* by representational difference analysis. *Mol Biochem Parasitol* **71**, 173-181.
- Fejes AP, Robertson G, Bilenky M, *et al.* (2008) FindPeaks 3.1: a tool for identifying areas of enrichment from massively parallel short-read sequencing technology. *Bioinformatics* **24**, 1729-1730.
- Grevelding CG (1999) Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **101**, 207-216.
- Hillier LW, Marth GT, Quinlan AR, *et al.* (2008) Whole-genome sequencing and variant discovery in *C. elegans*. *Nat Methods* **5**, 183-188.
- Horng YM, Huang MC (2003) Male-specific DNA sequences in pigs. *Theriogenology* **59**, 841-848.
- Jeffreys AJ, Neumann R, Wilson V (1990) Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell* **60**, 473-485.
- Li R, Li Y, Kristiansen K, Wang J (2008) SOAP: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics* **24**, 713-714.
- Scribner KT, Petersen MR, Fields RL, *et al.* (2001) Sex-biased gene flow in spectacled eiders (Anatidae): inferences from molecular markers with contrasting modes of inheritance. *Evolution* **55**, 2105-2115.
- Short RB (1983) Presidential address: Sex and the single schistosome. *Journal of Parasitology* **69**, 3-22.
- Staelens J, Rombaut D, Vercauteren I, *et al.* (2008) High-density linkage maps and sex-linked markers for the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Genetics* **179**, 917-925.
- Yannic G, Basset P, Hausser J (2008) Phylogeography and recolonization of the Swiss Alps by the Valais shrew (*Sorex antinorii*), inferred with autosomal and sex-specific markers. *Mol Ecol* **17**, 4118-4133.

Supplementary information online

Perl scripts can be downloaded from

<http://methdb.univ-perp.fr/cgrunau/methods/Eland2Growse.html>



Supplementary Figure 1. *Schistosoma mansoni* life cycle considering the separated sexes of the parasite. Sexual reproduction occurs between male and female adult worms in the vertebrate definitive host. Sex determination is syngamic, thus one egg produces one male or one female larva (called miracidium). This larva actively infects a mollusc intermediate host, transforms into intramolluscan larval stages (called sporocysts) and produces, by clonal multiplication, many unisexual larvae (called cercariae) that will actively infect the vertebrate definitive host and transform into adult worms.

Primer pair	Forward primer	Reverse primer	Product size (bp)	PCR condition*	Sequence information
SmWSPP 1	TTTTGGGGATTATCATCGC	GGCAATAAGGGCTAACCACA	201	1	Smp_scaff002739 (1708-1908)
SmWSPP 2	CTGTTTCGAATTCACACTTCA	CATTCACAGTTTGGCGAACA	365	1	Smp_scaff002739 (2682-3046)
SmWSPP 3	AGGCTGTCCTAGCAACACT	CGTCGCTTTCCTTACTCCTGC	206	1	Smp_scaff003066 (1027-1232)
SmWSPP 4	TCGTGTGACTCGCTTGTAGC	ACTTCAGGGATGCCAAACTG	393	1	Smp_scaff004478 (1790-1995)
SmWSPP 5	CAGTTTGGCATCCCTGAAGT	AGCAGTGCACACCCGAAAAC	201	1	Smp_scaff004478 (2163-2563)
SmWSPP 6	GGCAAAAGAAAAACCACCAA	GGTGACGCCCTAGGACACAAT	210	1	Smp_scaff011102 (858-1067)
SmWSPP 7	TCTACTGCTGATTGGTTGCG	TGCACAATCACAGCTCCTTC	610	2	R=407 ** (261-870, 972-1581, 1683-2292)
SmWSPP 8	GTGACCGTGTTTGGTGTG	GTTATGAGGGTTGACCACGC	176	2	R=879 ** (241-416)
SmWSPP 9	TGCACAAAGTGAGTGGCTGTGGG	TGGATGTACCTGCATCCCGTGT	120	2	Sm_alphaform1: GenBank U12442.1
SmWSPP 10	CAAGCTCGCTACGATGATA	GCTTCACGTGAGTGGTGAGA	295	2	R=564 ** (489-783)

Supplementary table 1. Characteristics of *Schistosoma mansoni* W chromosome (female) specific primer pairs

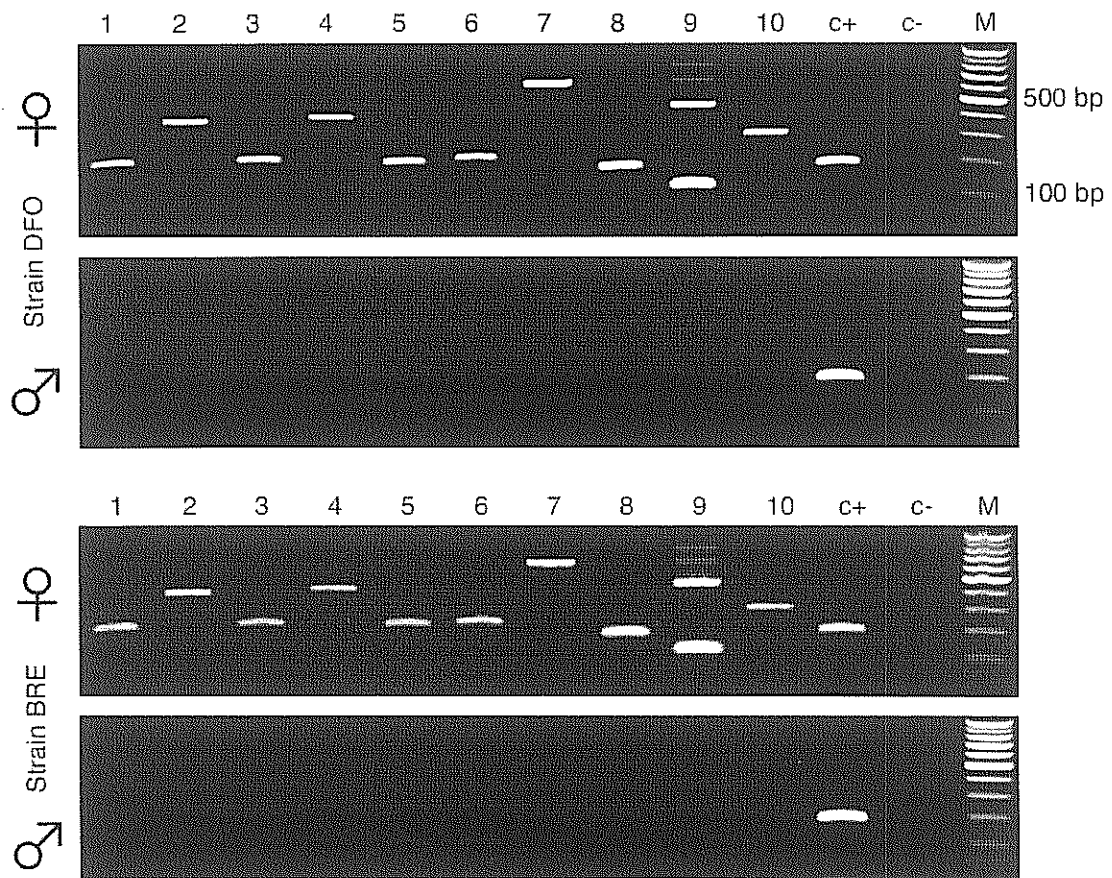
* see supplementary table 2

** ftp://ftp.tigr.org/pub/data/Eukaryotic_Projects/s_mansoni/preliminary_annotation/homology_evidence/sma1.repeats.gz (Najib M. El-Sayed, personal communication)

Condition	Number of cycles	Elongation time (s)	Annealing temperature (°C)
1	25	60	60
2	20	30	60

Supplementary table 2. PCR conditions

Figure 1.



Annexe 2 :

Article en cours d'écriture sur le suivi d'une souche de *S. mansoni* depuis sa récupération sur le terrain en 2005 et durant trois ans de maintien en laboratoire : « Follow-up of the genetic diversity and a parasite life history trait of a *Schistosoma mansoni* strain from field to laboratory ».

**Follow-up of the genetic diversity and a parasite life history trait of a
Schistosoma mansoni strain from field to laboratory**

Bech N^{(1)*}, Beltran S^{*⁽¹⁾}, Portela J, Rognon A, Boissier J, Theron A

Laboratoire de Biologie et d'Écologie Tropicale et Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-EPHE-UPVD. Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France.

* co-first-authors

⁽¹⁾ Corresponding authors: N. Bech, S. Beltran

Email: nicolas.bech@univ-perp.fr

sophie.beltran@univ-perp.fr

Tel: +33 4 68 66 20 50

Running title: Follow-up of *Schistosoma mansoni* strain from field to laboratory.

Abstract:

Schistosoma mansoni is an endoparasite causing a serious human disease called schistosomiasis. The quantification of parasite genetic diversity is an essential component to understand schistosomiasis epidemiology and disease transmission patterns. In this study, we used 15 microsatellites markers to investigate variation of genetic diversity between a founder field isolate and the nine successive laboratory generations during three years of laboratory maintenance. In parallel, we measured a parasite life trait (snail infection rate) in order to test a potential link between neutral genetic diversity and fitness. Our analyses demonstrate genetic differentiation between generations and a significant isolation by time that is likely to be the results of successive bottlenecks. However, even if snail infection rate decreases sharply between field isolate and the first laboratory generation, this parasite life trait does not evolve between other laboratory generations and thus does not depend on the continuous neutral genetic diversity loss. Hypotheses to explain these results (like “matching allele”) and perspectives are proposed in discussion.

Keywords : *Schistosoma mansoni* strain, microsatellites markers, genetic diversity, snail infection rate, matching allele

Introduction

Schistosomes (Platyhelminth, Digenea) are endoparasites causing a serious human disease called schistosomiasis. Schistosomiasis ranks second only to malaria in terms of parasite-induced human morbidity and mortality, with more than 200 million people infected (Chitsulo *et al.*, 2000; Crompton, 1999). The quantification of parasite genetic diversity is so an essential component to understand schistosomiasis epidemiology and disease transmission patterns (Curtis *et al.*, 2002; Jarne, Théron, 2001). Several studies base on DNA analyses performed directly on parasites from field populations demonstrated a high genetic diversity level (Curtis *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2002a; Shrivastava *et al.*, 2005; Sire *et al.*, 1999; Sire *et al.*, 2001; Theron *et al.*, 2004).

In contrast, analyses on laboratory strains showed a significant loss of diversity (Loverde *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 1997; Shrivastava *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 2006; Stohler *et al.*, 2004). As an example, it has been shown that only 10% and 14% of alleles are found in the laboratory populations compared to the field populations (Stohler *et al.*, 2004).

Founder effect, repeated bottlenecks and potential selection pressures, exerted by an experimental host (Bremond *et al.*, 1993; Loverde *et al.*, 1985), can occur during laboratory maintenance and probably represent the main factors at the origin of the reduced genetic diversity, observed in laboratory strains. Such discrepancy in level of genetic variation between field populations and laboratory strains may have implications on testing drug or vaccine efficiency for instance (Bergquist NR *et al.*, 2005; McManus, Loukas, 2008; Pearce, 2003).

The demonstration of genetic diversity loss between field populations and laboratory strains has concerned isolates and strains from different origins and we do not know how the reduction of genetic diversity occurs at the passage from field to laboratory and during the successive generations of parasites. Moreover, no parasite fitness trait was followed concomitantly to the reduction of neutral genetic diversity during laboratory maintenance.

In this study, we use 15 microsatellites markers to analyse the evolution of genetic diversity between a field isolate of *Schistosoma mansoni* adult worms, directly collected from naturally infective murine hosts, and at the origin of the laboratory strain, maintained for the nine laboratory generations, during three years. In parallel, we measure the evolution of parasite infectivity toward *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host.

Materials and methods

Schistosome strain founder and laboratory maintenance

Six naturally *S. mansoni* infected rats (*Rattus rattus*) were trapped in May 2005 at Dans Fond, one of numerous transmission sites located along the marshy forest focus of Grande Terre island in Guadeloupe, West Indies (Theron, Pointier, 1995). Adult schistosomes were collected from each rat using a standard perfusion method (Duvall & Dewitt 1967). They were carefully washed in physiological saline solution and stored in 70% ethanol or maintained at -80°C. A total of 20 males and 21 females were used for genetic analysis and represent the founder generation called "G0". This is the field generation.

Miracidia hatched from eggs collected from the livers of these naturally-infected rats were used to infect 50 *Biomphalaria glabrata* snails individually exposed to 10 larvae. Forty three of the 46 surviving exposed snails were infected and shedded cercariae (i.e. 95.55% of infection). In the laboratory, five mice (Swiss OF1) were infected with cercariae from these snails (see Boissier & Moné (2000) for snail and mouse infection protocol) to establish the first laboratory generation called "G1". Each laboratory generation of the schistosome strain represents one cycle rotation. The next generations (G2 to G9) passed through five mice (160 cercariae at exposure) and approximately 24 infected snails (10 miracidia at exposure).

Sampling and measure of the parasite life trait

Adult worms from G0, G1, G2, G4, G5 and G9 were collected for the genetic study and their corresponding offspring (miracidia) was used to expose individually 50 *B. glabrata* snails with 10 larvae at each generation. Parasite infectivity was measured as the number of snails positively infected divided by the total number of surviving snails.

Genotyping

DNA was extracted using a recently published protocol (Beltran *et al.*, 2008). All samples were genotyped with 15 microsatellite markers, SmC1, SmDO11, SmDA28 (Curtis *et al.*, 2001), R95529, SmD57, SmD28, SmD25, SCMSMOXII, L46951,(Durand *et al.*, 2000), SmBR16, SmBR10, SmBR13 (Rodrigues *et al.*, 2007), SmS7-1 (Blair *et al.*, 2001), SmBR1, SmBR6 (Rodrigues *et al.*, 2002b). The relevant DNA fragment was amplified using Polymerase Chain Reaction (PCR). To maximise efficiency and minimize costs, these PCRs were performed in four

multiplexes using the QIAGEN multiplex kit. The PCR amplifications of loci: R95529, SmC1, SmDO11, SmBR16 and SmD57 were grouped in the multiplex 1; loci: SmDA28, SmBR1, SmS7-1, SmD28, SCMSMOXII were grouped in the multiplex 2; and loci: SmD25, L46951, SmBR6, SmBR10 and SmBR13 were grouped in the multiplex 3. These multiplexes were carried out according to the manufacturer's standard microsatellite amplification protocol in the final volume of 10 μ L and with 57°C for annealing temperature. PCR products were diluted in Sample Loading Solution (Beckman Coulter) with red-labeled size standard (CEQ™ DNA size standard kit, 400, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and electrophoresed on an automatic sequencer (CEQ™ 8000, Beckman Coulter). Genotypes were determined using the fragment analyzer package from Beckman Coulter.

Genetic analyses

We used the software MICROCHECKER (Oosterhout *et al.*, 2004) to identify the presence of null alleles or scoring errors due to stuttering. Deviation from Hardy–Weinberg expectancies and linkage disequilibria were analysed using the global tests in FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). The level of significance was adjusted for multiple testing using a Bonferroni correction. Furthermore, polymorphism was estimated over all loci and for each generation using the number of alleles (A), allelic richness (An), expected heterozygosity (He) and Fis computed with FSTAT v.2.9.3.2. Finally, observed heterozygosity (Ho) was calculated with the software GENEPOP (Raymond, Rousset, 1995).

Genetic structure

To detect the presence of genetic structuring between parasite laboratory generations, we calculated pairwise Fst values according to (Weir, Cockerham, 1984). We described the distribution of microsatellites variability using Principal Component Analysis (PCA) on individuals' genotypes. This PCA was conducted on GENETIX software v.4.05.2 (Belkhir *et al.*, 1996). Genetic structuring was also examined using the software STRUCTURE v. 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000). We chose the admixture model and the option of correlated allele frequencies among generations. This software permitted the assignment of individuals to a user-defined number of clusters (K). The maximal probability value of K was obtained by comparing the

likelihood of the data for different values of K , from 1 to 6. Each simulation was replicated 20 times as recommended (Evanno *et al.*, 2005).

We also used the Mantel test implemented in Fstat to test for 'isolation by time' by regressing pairwise estimated F_{st} against time (in days). Finally, we investigated whether recent bottlenecks appeared during the generations. This test compared the observed heterozygosity with the expected heterozygosity according to Infinite Allele Model (IAM) (Kimura, Crow, 1964), and Two Phase Model (TPM) (Di Rienzo *et al.*, 1994) given the number of alleles in the given generation. We performed the Wilcoxon signed ranks test implemented in BOTTLENECK software (Cornuet, Luikart, 1996) with 1000 iterations. We did not consider the Stepwise Mutation Model (SMM), (Kimura, Ohta, 1978) because this mutation model is not really appropriate for microsatellite markers (Ellegren, 2000; Estoup *et al.*, 2002).

Statistical analyses to follow-up the diversity indices and parasite life trait in course of generations

We observed the evolution of genetic diversity indices (expected heterozygosity H_e and allelic richness A_n), and of snail infection rate (parasite life trait) in course of generations. We used linear regression test, implemented in the GRAPH PAD software for Windows, in order to test the link between the genetic diversity indices (A_n and H_e) and time (in days). We have used Fisher's exact tests, also implemented in the GRAPH PAD software for Windows, in order to test a variation in snail infection rate between field and laboratory generations.

Results

Data analysis

Marker validation and distribution of the genetic diversity

After Bonferroni correction and according to the method implemented in the Micro-checker software, several markers exhibited null alleles but all were randomly distributed across loci and generations and became no significant at a global level. Moreover, these null alleles did not affect Hardy-Weinberg expectancies. Departure from Hardy-Weinberg on all markers and all generations was not detected; no Fis values were significantly different from 0 (P-value threshold after Bonferroni correction, $P= 0.00056$). No evidence for linkage disequilibria was detected either (P-value threshold after Bonferroni correction, $P= 0.00048$). All microsatellites loci were polymorphic with an allelic richness (A_n) ranging from 1.00 to 8.00 and an expected heterozygosity (H_e) ranging from 0.000 to 0.882 over all generations (Table 1).

Markers (Accession Number)		Generations						
		G0	G1	G2	G4	G5	G9	All
	N	41	12	59	16	64	54	246
R95529 (R95529)	He	0,636	0,811	0,549	0,245	0,398	0,188	0,471
	Ho	0,487	0,900	0,600	0,267	0,439	0,208	0,483
	A	9,000	8,000	7,000	3,000	4,000	2,000	10,000
	An	5,581	8,000	4,969	2,637	3,323	1,915	4,386
	Fis	0,234	-0,110	-0,092	-0,087	-0,101	-0,106	-0,044
SmC1 (AF325694)	He	0,681	0,656	0,540	0,665	0,618	0,608	0,628
	Ho	0,700	0,600	0,500	0,750	0,683	0,574	0,635
	A	5,000	3,000	4,000	3,000	3,000	3,000	5,000
	An	3,686	3,000	3,206	3,000	2,982	2,995	3,716
	Fis	-0,028	0,085	0,074	-0,129	-0,105	0,055	-0,008
SmD57 (AF202967)	He	0,826	0,850	0,814	0,842	0,832	0,803	0,828
	Ho	0,590	0,700	0,655	0,938	0,887	0,944	0,786
	A	11,000	7,000	9,000	8,000	8,000	6,000	12,000
	An	7,174	7,000	6,449	7,055	6,366	5,128	7,614
	Fis	0,286	0,176	0,196	-0,114	-0,067	-0,176	0,050
Sr.BR16 (LO4480)	He	0,689	0,767	0,670	0,658	0,670	0,580	0,672
	Ho	0,700	0,900	0,630	0,813	0,780	0,688	0,752
	A	5,000	5,000	4,000	3,000	3,000	3,000	5,000
	An	4,127	5,000	3,789	3,000	3,000	2,935	3,632
	Fis	-0,016	-0,174	0,059	-0,234	-0,164	-0,185	-0,119

SmDO11 (AF325698)	He	0,845	0,828	0,823	0,823	0,838	0,496	0,776
	Ho	0,775	0,600	0,818	1,000	0,871	0,574	0,773
	A	10,000	7,000	12,000	7,000	8,000	5,000	13,000
	An	7,346	7,000	7,269	6,200	6,442	3,186	6,954
	Fis	0,082	0,275	0,006	-0,215	-0,040	-0,158	-0,008
SmDA28 (AF325695)	He	0,547	0,424	0,544	0,500	0,503	0,467	0,498
	Ho	0,659	0,583	0,446	0,933	0,571	0,151	0,557
	A	5,000	2,000	4,000	2,000	2,000	2,000	6,000
	An	2,918	2,000	2,983	2,000	2,000	2,000	2,495
	Fis	-0,203	-0,375	0,180	-0,867	-0,135	0,677	-0,121
SmBR1 (L81235)	He	0,178	0,341	0,164	0,186	0,220	0,174	0,211
	Ho	0,190	0,417	0,179	0,200	0,250	0,189	0,237
	A	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	3,000	3,000
	An	1,905	2,000	1,873	1,970	1,945	2,049	1,940
	Fis	-0,096	-0,222	-0,089	-0,077	-0,135	-0,084	-0,117
SmS7-1 (AF330105)	He	0,420	0,159	0,320	0,290	0,444	0,020	0,276
	Ho	0,341	0,167	0,196	0,200	0,270	0,020	0,199
	A	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
	An	2,000	1,978	1,993	1,998	2,000	1,204	1,990
	Fis	0,187	-0,048	0,387	0,311	0,392	0,000	0,205
SmD28 (AF202966)	He	0,484	0,527	0,315	0,129	0,031	0,000	0,248
	Ho	0,537	0,364	0,364	0,133	0,031	0,000	0,238
	A	3,000	2,000	3,000	2,000	2,000	1,000	3,000
	An	2,823	2,000	2,170	1,897	1,289	1,000	2,178
	Fis	-0,108	0,310	-0,156	-0,037	-0,008	NA	0,000
SCMSMOXII (M85305)	He	0,581	0,714	0,498	0,617	0,615	0,638	0,611
	Ho	0,611	0,636	0,522	0,533	0,623	0,636	0,594
	A	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
	An	3,738	3,996	3,409	3,867	3,516	3,902	3,775
	Fis	-0,051	0,108	-0,049	0,135	-0,012	0,002	0,022
SmBR10 (DQ448293)	He	0,547	0,409	0,534	0,500	0,502	0,463	0,493
	Ho	0,659	0,545	0,434	0,923	0,547	0,185	0,549
	A	5,000	2,000	4,000	2,000	2,000	2,000	6,000
	An	2,918	2,000	2,968	2,000	2,000	2,000	2,471
	Fis	-0,203	-0,333	0,188	-0,846	-0,088	0,600	-0,114
L4695† (L46951)	He	0,557	0,477	0,395	0,477	0,508	0,493	0,485
	Ho	0,634	0,545	0,404	0,750	0,310	0,646	0,548
	A	4,000	3,000	2,000	2,000	3,000	2,000	4,000
	An	3,254	2,909	1,999	2,000	2,791	2,000	2,595
	Fis	-0,138	-0,143	-0,025	-0,571	0,390	-0,310	-0,133
SmBR13 (DQ137790)	He	0,840	0,882	0,817	0,737	0,840	0,506	0,770
	Ho	0,854	0,909	0,811	1,000	0,875	0,630	0,846
	A	10,000	8,000	8,000	5,000	7,000	4,000	10,000
	An	7,270	7,810	6,510	4,761	6,498	2,800	6,451
	Fis	-0,016	-0,031	0,007	-0,357	-0,042	-0,243	-0,114
SmBR6	He	0,571	0,477	0,392	0,462	0,498	0,498	0,483

(AF009659)	Ho	0,634	0,545	0,396	0,692	0,297	0,722	0,548
	A	4,000	3,000	3,000	2,000	3,000	2,000	4,000
	An	3,444	2,909	2,341	2,000	2,753	2,000	2,678
	Fis	-0,111	-0,143	-0,010	-0,500	0,403	-0,450	-0,135
SmD25 (AF202965)	He	0,365	0,255	0,438	0,564	0,571	0,398	0,432
	Ho	0,366	0,273	0,510	0,923	0,383	0,431	0,481
	A	4,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	4,000
	An	2,804	2,905	2,896	2,954	2,977	2,195	2,959
All	Fis	-0,003	-0,071	-0,164	-0,636	0,350	-0,084	-0,101
	He	0,584	0,572	0,521	0,513	0,539	0,422	0,525
	Ho	0,582	0,579	0,498	0,670	0,521	0,440	0,548
	A	5,533	4,067	4,733	3,333	3,733	2,933	6,067
	An	4,066	4,034	3,655	3,156	3,325	2,487	3,722
	Fis	0,003	-0,013	0,044	-0,307	0,035	-0,042	-0,047

Table 1: Summary informations for the 15 microsatellites markers for the generations of *Schistosoma mansoni*. Name and GenBank accession numbers, N: sample size by generation, He: expected heterozygosity, Ho: observed heterozygosity, A: number of alleles, An: allelic richness and Fis.

Genetic structuring

The genetic structuring analyses, based on 15 microsatellite markers and conducted during the three years of laboratory maintenance, showed high genetic structuring among the different generations. Pairwise F_{st} values (mean $F_{st}=0.0593$) detect different genetic substructures within all generations. P-values were significant on all comparisons except between G0 / G1 and between G4 / G5 (table 2). G9 seems to show F_{st} values larger than the other comparisons. This genetic pattern was corroborated by the Principal Component Analysis which revealed three generation groups. G0 and G1 constituted the first group, G2, G4 and G5 were grouped in the second group and G9 formed, on its own, the third group (figure 1).

	G0	G1	G2	G4	G5	G9
G0	-	0.16000	0.00333	0.00333	0.00333	0.00333
G1	0.0196	-	0.00333	0.00333	0.00333	0.00333
G2	0.0153 *	0.0414 *	-	0.00333	0.00333	0.00333
G4	0.0449 *	0.0968 *	0.0415 *	-	0.02667	0.00333
G5	0.0331 *	0.0760 *	0.0290 *	0.0044	-	0.00333
G9	0.1020 *	0.1699 *	0.0925 *	0.0575 *	0.0662 *	-

Table 2: Pairwise F_{st} values for each generation comparison (bellow diagonal), and their significance level (above diagonal). P-value threshold was adjusted with the Bonferroni correction, $P= 0.003333$. Stars indicate the level of significance.

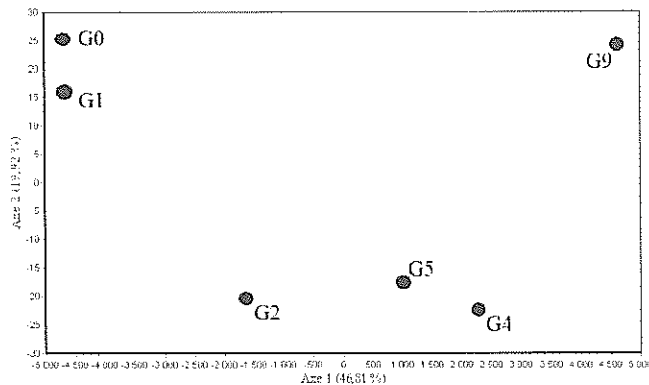


Figure 1: Results of Principal Component Analysis based on microsatellite data for the different generations of *Schistosoma mansoni*.

In concert with these results, Bayesian analyses of genetic structuring detect the highest posterior probability for two clusters ($K=2$). Most individuals of the first five generations (G0, G1, G2, G4 and G5) were assigned to cluster 1 while most individuals of the generation G9 were assigned to cluster 2 (table 3). Please note that G4 and G5 present the same likelihood to be assigned to both clusters 1 and 2 and so, they represent genetic intermediaries between two inferred clusters. In course of time, the distribution of genetic diversity changes until it becomes different from the initial genetic structuring. G9, which is the last laboratory generation, appears particularly more different from the other ones. Furthermore, Mantel test identified significant positive correlation ($N=15$, $F=19.888$, r squared = 0.6047; $P = 0.0006$) between F_{st} values and time, indicating a strong ‘isolation in course of time’ between generations (figure 2).

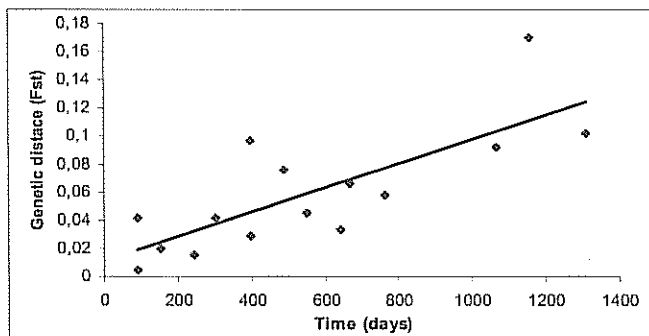


Figure 2: Pairwise genetic differentiation plotted against time between generations.

Pop	Given inferred clusters	
	1	2
G0	0,938 ± 0.005	0,062 ± 0.005
G1	0,877 ± 0.004	0,123 ± 0.004
G2	0,890 ± 0.002	0,110 ± 0.002
G4	0,432 ± 0.002	0,568 ± 0.002
G5	0,573 ± 0.001	0,427 ± 0.001
G9	0,045 ± 0.001	0,955 ± 0.001

Table 3: Proportion of membership of each generation in each of the 2 clusters.

In all generations, from field generation G0 to laboratory generations G1 to G9, tests for heterozygosity excess revealed recent genetic bottlenecks signals according to both IAM and TPM mutation models (table 4).

generations	Probability (Wilcoxon signed ranks test)		sign of bottleneck
	I.A.M.	T.P.M.	
G0	0,00066	0,04163	yes
G1	0,00168	0,02063	yes
G2	0,00008	0,00107	yes
G4	0,00011	0,00168	yes
G5	0,00021	0,00134	yes
G9	0,00084	0,01279	yes

Table 4: Results from BOTTLENECK software for the Wilcoxon signed ranks test which compares observed heterozygosity and expected heterozygosity according to Infinite Allele model (IAM) and Two Phase Model (TPM). Tests were performed on each generations of *Schistosoma mansoni*.

Follow-up of diversity indices and parasite life trait in course of time

In the course of generations, genetic diversity indices and the snail infection rate have evolved. Linear regression test showed a significant loss of genetic diversity with time: decrease in heterozygosity and allelic richness was correlated to the number of generations or days (N=6, F=73.136, r squared=0.8673, p=0.0069 for heterozygosity and r squared=0.9481, p=0.0010 for allelic richness). Concerning the parasite life trait, we have obtained 96% of snail infection rate for the field generation G0 and 38%, 30%, 41%, 39% and 38% of snail infection rate after 1, 2, 4, 5 and 9 passages through laboratory mice, respectively. Very significant difference in snail infection rate was detected between the field generation G0 and the laboratory generations G1 to G9 (Fischer's exact tests between G0 and all the laboratory generations, P-values<0.002), without variation between the laboratory generations (Fischer's exact tests between all the laboratory generations, P-values non significant) (figure 3).

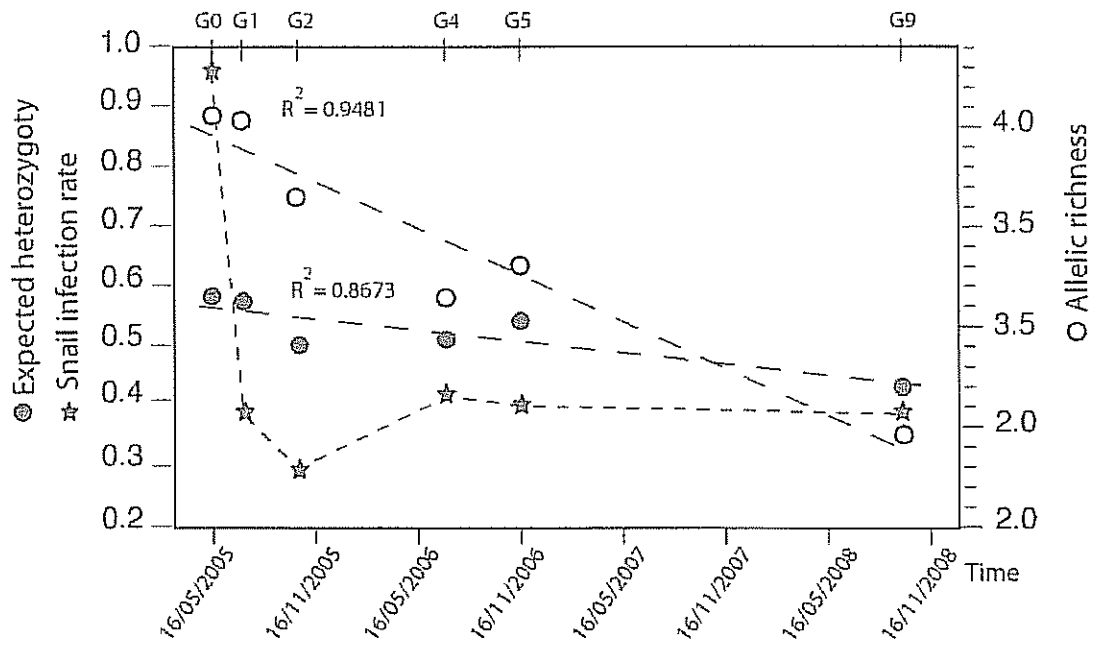


Figure 3: Loss of genetic diversity indices and snail infection rate with time. The two diversity indices, allelic richness with white circles and expected heterozygosity with black circles, decrease with the time, over the course of the generations. Variation in snail infection rate with black stars, in course of time, was detected between the field generation G0 and the laboratory generations G1 to G9.

Discussion

We report for the first time the follow-up of genetic diversity on a parasite strain of *S. mansoni* from field founder population to nine laboratory generations. Our molecular analyses reveal a significant decrease of genetic diversity indices (An and He) in course of generations and finally different genetic substructures among all generations. As a result of successive bottlenecks and genetic drift resulting from conditions of laboratory maintenance (see Theron et al. 2008 for explanations), significant differences in allelic frequencies appear between generations (results not shown) with some allelic frequencies decreasing and reaching almost zero. Results of the Bayesian analyses demonstrated two clusters of individuals with gradual assignments. Individuals from generations G0, G1 and G2 are mainly assigned to cluster 1, individuals from generation G9 to the cluster 2, while individuals of generations G4 and G5 could be considered as genetic intermediates between the two clusters. Laboratory hosts (usually rodents), used to maintain the life cycle of *S. mansoni* and differing from the natural hosts (mainly humans), could induce selection pressures. However, in our case, the *S. mansoni* field population originates from a murine host (*Rattus rattus*) and the experimental host used to maintain the strain in laboratory is also a murine host (Mouse SWISS OF1). These obtained results on genetic diversity follow-up seem more probably due to laboratory maintenance as proposed by Theron et al. in 2008. What it is surprising in our experiment is the very limited decrease of genetic indices between the G0 and the G1, whereas it is attempted that these genetic indices decrease more sharply. A hypothesis to explain this limiting decrease of genetic indices is that the infection of the first experimental hosts (at the first generation G1) was performed using the same genetic pool than in field conditions G0 (all the infecting natural molluscs were used to infect experimental mice).

We show for the first time the follow-up of a parasite life trait (i.e. the snail infection rate) on a parasite strain of *S. mansoni* from field founder population to nine laboratory generations. A decrease of more than 50% of snail infection rate is observed between the field generation G0 and the first laboratory generation G1. After this drastic decrease, stability in snail infection rate is observed in our follow-up of the strain life trait, in course of the 9 laboratory passages. These results are similar to those of the study of Theron *et al.* in 2008, showing a snail infection rate of about 100% in field population and a stability of snail infection rate in course of the 3 tested

laboratory passages (51%, 59.8% and 54.1% of snail infection rate after exposure to 20 miracidia, after 1, 2 and 3 passages through laboratory mice, respectively). To explain the loss of compatibility between snail and schistosome in going from field to laboratory, the authors proposed genetic effects and particularly possible mechanism of matching alleles and bottlenecks (Theron *et al.*, 2008). Indeed, the success or failure of a challenge by one parasite would depend on the matched/mismatched status of the host and parasite genotypes, as in matching allele models (Agrawal, Lively, 2003; Theron, Coustau, 2005). In this case, one snail may have a modest probability to match with one miracidium; but when the number of miracidia increases, the probability of matching also increases until about 100% when enough miracidia are used to infect snail in field conditions. According to this hypothesis, if the laboratory passage involves a genetic bottleneck and loss of alleles in parasite population, whatever the number of miracidia, the probability of matching does not go to 100%. It is attempted that loss of alleles in parasite population would conduct to a decrease in snail infection rate. It is thus important to highlight the causes of the unexpected stability, observed in the parasite life trait, in course of laboratory maintenance.

Despite a continuous decrease of genetic diversity in course of the parasite strain follow-up, there is not an associated continuous decrease in the parasite life trait (i.e. the snail infection rate). There is thus no link between continuous parasite genetic diversity loss and this parasite life trait. The fact that infections are entirely experimental could play a role in the stability of the infectivity rate in snails in course of laboratory generations, but this argument is not sufficient to explain the absence of expected evolution of this trait with the loss of parasite genetic diversity. The explanation of the observed stability in the parasite life trait could be found in the fact that, during the 9 laboratory passages, the observed loss of neutral microsatellite alleles can not necessary imply a loss in functional alleles also more so as a recent study showed that a large polymorphism of mucine called by the authors “controlled chaos”, key factors for the compatibility of schistosomes interacting with their snail host, can be generated in parasite individuals (Roger *et al.*, 2008). Our study is realised only on neutral microsatellite allele and does not take into account DNA functional markers. An analysis of DNA functional markers linked with an analysis of DNA neutral markers and a more long time follow-up of the strain to observe an eventual decrease of the measured parasite life trait could allow better understanding

the functional and neutral variability of parasite strains and their compatibility with their hosts, with potential implications in term of epidemiology and fighting against schistosomiasis.

Acknowledgement

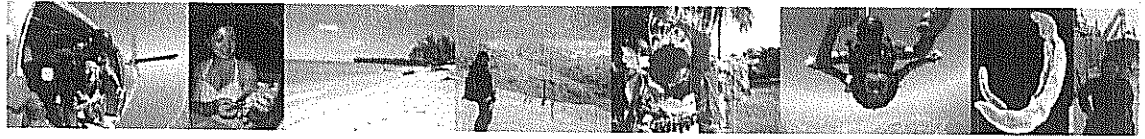
We wish to thank Bernard Dejean and Jean-François Allienne for technical assistance. This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS, and the Agence Nationale de la Recherche (Program Monogamix ANR-08-BLAN-0214-02).

References

- Agrawal AF, Lively CM (2003) Modelling infection as a two-step process combining gene-for-gene and matching-allele genetics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 323-334.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France)*.
- Beltran S, Galinier R, Allienne JF, Boissier J (2008) Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **103**, 501-503.
- Bergquist NR, Leonardo LR, GF M (2005) Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends in Parasitology* **21**, 112-117.
- Blair L, Webster JP, Barker GC (2001) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schistosoma mansoni* from Africa. *Molecular Ecology Notes* **1**, 93-95.
- Bremond P, Pasteur N, Combes C, Renaud F, Theron A (1993) Experimental host-induced selection in *Schistosoma mansoni* strains from Guadeloupe and comparison with natural observations. *Heredity* **70**, 33-37.
- Chitsulo L, Engels D, Montessoro A, Savioli L (2000) The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* **77**, 41-51.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Crompton DWT (1999) How much human helminthiasis is there in the world? *Journal of Parasitology* **85**, 397-403.
- Curtis J, Sorensen RE, Kristen Page L, Minchella DJ (2001) Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for other schistosome species. *Molecular Ecology Notes* **1**, 143-145.
- Curtis J, Sorensen RE, Minchella DJ (2002) Schistosome genetic diversity: the implications of population structure as detected with microsatellite markers. *Parasitology* **125** Suppl, S51-59.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, *et al.* (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *PNAS* **91**, 3166-3170.
- Durand P, Sire C, Theron A (2000) Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. *Molecular Ecology* **9**, 997-998.
- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* **16**, 551-558.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* **11**, 1591-1604.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>.
- Jarne P, Theron A (2001) Genetic structure in natural populations of flukes and snails : a practical approach and review. *Parasitology* **123**, S27-S40.
- Kimura M, Crow JF (1964) The Number of Alleles That Can Be Maintained in a Finite Population. *Genetics* **49**, 725-738.

- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2868-2872.
- Loverde PT, De Wald J, Minchella DJ, Bosshardt SC, Damian RT (1985) Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* **71**, 297-301.
- McManus D, Loukas A (2008) Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical Microbiology Review* **21**, 225-242.
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology* **4**, 535-538.
- Pearce EJ (2003) Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Acta Tropica* **86**, 309-313.
- Pinto PM, Brito CF, Passos LK, Tendler M, Simpson AJ (1997) Contrasting genomic variability between clones from field isolates and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **92**, 409-414.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Rodrigues NB, Coura Filho P, de Souza CP, *et al.* (2002a) Populational structure of *Schistosoma mansoni* assessed by DNA microsatellites. *International Journal for Parasitology* **32**, 843-851.
- Rodrigues NB, Loverde PT, Romanha AJ, Oliveira G (2002b) Characterization of new *Schistosoma mansoni* microsatellite loci in sequences obtained from public DNA databases and microsatellite enriched genomic libraries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97 Suppl 1**, 71-75.
- Rodrigues NB, Silvia MR, Pucci MM, *et al.* (2007) Microsatellite-enriched genomic libraries as a source of polymorphic loci for *Schistosoma mansoni*. *Molecular Ecology Notes* **7**, 263-265.
- Roger E, Grunau C, Pierce RJ, *et al.* (2008) Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite (*Schistosoma mansoni*) Interacting with Its Invertebrate Host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2**, e330.
- Shrivastava J, Gower CM, Balolong EJ, *et al.* (2005) Population genetics of multi-host parasites-the case for molecular epidemiological studies of *Schistosoma japonicum* using larval stages from naturally infected hosts. *Parasitology* **131**, 617-626.
- Sire C, Durand P, Pointier JP, Theron A (1999) Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: a field study using random-amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Parasitology* **85**, 436-441.
- Sire C, Durand P, Pointier JP, Theron A (2001) Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*) : infrapopulation differentiation at microspatial scale. *International Journal for Parasitology* **31**, 1609-1616.
- Sorensen RE, Rodrigues NB, Oliveira G, Romanha AJ, Minchella DJ (2006) Genetic filtering and optimal sampling of *Schistosoma mansoni* populations. *Parasitology* **133**, 443-451.
- Stohler RA, Curtis J, Minchella DJ (2004) A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* **34**, 595-601.
- Theron A, Coustau C (2005) Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *Journal of Helminthology* **79**, 187-191.
- Theron A, Coustau C, Rognon A, Gourbiere S, Blouin MS (2008) Effects of laboratory culture on compatibility between snails and schistosomes. *Parasitology* **135**, 1179-1188.

- Theron A, Pointier JP (1995) Ecology, dynamics, genetics and divergence of trematode populations in heterogenous environments : the model of *Schistosoma mansoni* in the insular focus of Guadeloupe. *Research and Reviews in Parasitology* **55**, 49-64.
- Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P (2004) Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology* **129**, 571-585.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.



MONOGAMIE ET CHANGEMENTS DE PARTENAIRE CHEZ UN PARASITE MONOGAME : SCHISTOSOMA MANSONI

La monogamie est un système d'appariement qui lie une seule femelle à un seul mâle. Cette monogamie peut être définie comme sociale et génétique (au-delà de l'observation du couple, la descendance est seulement issue de ce couple, aucun changement de partenaire n'apparaît), ou comme sociale et non génétique (dans ce cas, des infidélités ou des divorces peuvent être observés). Ce système d'appariement est très rare dans le monde animal. Il concerne moins de 1% des animaux et la majeure partie des études sur la monogamie a été réalisée sur des vertébrés (notamment sur les oiseaux dont 90% des espèces présentent ce système monogame). Plus rares sont les études réalisées sur les invertébrés (quelques cas de monogamie étudiée chez des crustacés, des insectes...). Pourtant l'étude de la monogamie à un niveau taxonomique inférieur permet de mieux comprendre ses caractéristiques en éliminant la complexité sociale (apprentissage, imitation...) présente chez les vertébrés.

Schistosoma mansoni est un parasite (responsable de la bilharziose) qui présente plusieurs aspects intéressants du point de vue système d'appariement : (1) la femelle vit dans le canal gynétophore de son mâle, nous observons bien un couple formé d'une seule femelle et d'un seul mâle, il s'agit donc d'une monogamie sociale ; (2) *S. mansoni* est l'espèce monogame de rang taxonomique le plus bas à notre connaissance, ce qui permet d'éliminer au maximum les biais de complexité sociale cités précédemment ; (3) enfin, cette espèce parasite présente des avantages d'un point de vue expérimental : les sexes et génotypes des individus utilisés peuvent et sont contrôlés en laboratoire et des populations 'naturellement' clonales sont à notre disposition. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la monogamie chez cet invertébré parasite monogame.

Plusieurs questions sont développées durant cette thèse : qui est monogame parmi les Schistosomatidae et pourquoi? Est-ce une monogamie sociale et génétique ou sociale et non génétique (i.e. des changements de partenaire sont-ils observés) ? Quels sont les facteurs impliqués dans ces changements de partenaire (dissimilarité entre les partenaires du couple, biais de sex ratio en faveur des mâles, différences neutres, fonctionnelles et phénotypiques entre les mâles, effet du système immunitaire de l'hôte vertébré) ? C'est par l'association de réflexions et d'expérimentations que nous tentons de répondre à ces questions.