



**HAL**  
open science

# Aspects fonctionnel et évolutif de l'immunité mémoire chez l'escargot vecteur de la Bilharziose intestinale *Biomphalaria glabrata*.

Rémi Pichon

► **To cite this version:**

Rémi Pichon. Aspects fonctionnel et évolutif de l'immunité mémoire chez l'escargot vecteur de la Bilharziose intestinale *Biomphalaria glabrata*.. Immunité adaptative. Université de Perpignan, 2023. Français. NNT : 2023PERP0016 . tel-04211287

**HAL Id: tel-04211287**

**<https://theses.hal.science/tel-04211287>**

Submitted on 19 Sep 2023

**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.



# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par  
**UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA**

**Préparée au sein de l'école doctorale**

Energie Environnement ED305

**Et de l'unité de recherche**

IHPE

(Interactions Hôtes-Pathogènes et Environnements)

**Spécialité :**

Biologie

**Présentée par**

PICHON Rémi

**Aspects fonctionnels et évolutifs de l'immunité  
mémoire chez l'escargot vecteur de la bilharziose  
intestinale, *Biomphalaria glabrata***

**Soutenue le 23 juin 2023 devant le jury composé de**

Mme Christine BRAQUART-VARNIER, PR, Université de Poitiers	Rapporteur
Mme Aurélie TASIEMSKI, PR, Université de Lille	Rapporteur
M. Christoph GRUNAU, PR, Université de Perpignan	Examineur
Mme Christine COUSTAU, DR, CNRS, Sophia Antipolis Nice	Présidente de jury
M. Arthur TALMAN, CR, IRD, Montpellier	Examineur
M. Benjamin GOURBAL, PR, Université de Perpignan	Directeur de thèse
M. Richard GALINIER, IR, CNRS, Perpignan	Co-encadrant de thèse





*Thèse*  
*pour l'obtention du grade de docteur spécialité biologie*

Présentée par :

**PICHON Rémi**



**Aspects fonctionnels et évolutifs de l'immunité mémoire  
chez l'escargot vecteur de la bilharziose intestinale,  
*Biomphalaria glabrata***

**Soutenue le 23 juin 2023 devant le jury composé de**

Mme Christine BRAQUART-VARNIER	PR, Université de Poitiers	Rapporteur
Mme Aurélie TASIEMSKI	PR, Université de Lille	Rapporteur
M. Christoph GRUNAU	PR, Université de Perpignan	Examineur
Mme Christine COUSTAU	DR, CNRS, Sophia Antipolis Nice	Examineur
M. Arthur TALMAN	CR, IRD, Montpellier	Examineur
M. Benjamin GOURBAL	PR, Université de Perpignan	Directeur de thèse
M. Richard GALINIER	IR, CNRS, Perpignan	Co-encadrant de thèse

Image de *Biomphalaria glabrata* retiré de sa coquille, dans lequel des sporocystes primaires de *Schistosoma mansoni* se développent. (Photo retouchée par Manon Blin)

Cette thèse a été suivie par :

- **Mme Christine Coustau** directrice de recherche au CNRS Sophia Antipolis de Nice
- **M. Michalis Averof** directeur de recherche CNRS de l'institut de génomique fonctionnelle de Lyon
- **M. Rémy Merret** chargé de recherche CNRS de l'université de Perpignan.

Je remercie les membres de ce comité de suivi individuel (CSI) pour le suivi bienveillant que vous avez porté sur ma thèse ainsi que pour la pertinence de vos observations et commentaires sur mes travaux de recherche.

# Remerciements

Je souhaite, dans un premier temps, adresser mes remerciements aux membres du jury de cette thèse. Mme Christine Coustau, tout d'abord, merci infiniment pour votre soutien précieux en tant que membre de mon comité de suivi de thèse. Votre expertise et votre engagement ont été d'une valeur inestimable pour ma recherche. Christine Braquart-Varnier, merci pour votre expertise et le regard critique que vous avez eu sur mes travaux. Aurélie Tasiemski, je vous remercie pour la pertinence de vos questions et l'intérêt que vous avez porté sur ces travaux de thèse. Arthur Talman, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre précieuse contribution. Vos conseils avisés vont grandement enrichir ces travaux de recherche. Christoph Grunau, merci beaucoup pour votre expertise et bien-sûr votre soutien tout au long de ces quatre années de thèse.

A mes deux patrons maintenant ! Et oui faut bien y passer. Reprendre des études après avoir goûté aux trous de combats, à la boue, aux marches interminables et aux rations, c'est à la fois plus reposant mais aussi extrêmement difficile une fois le pas franchi.

Benjamin. Le soutien que tu m'as apporté depuis mon retour aux études est inestimable et je ne trouve pas les mots adéquats afin d'exprimer cela. Malgré ton emploi du temps disons... chargé, tu as toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses questions, états d'âmes et problèmes existentiels. Je te remercie en tout cas de la confiance que tu m'as accordée au cours de cette thèse. Tu as su me faire expérimenter, apprendre et aimer la recherche à coup de pavé montpelliérain, de casse-croûte sur le trottoir de la boulangerie, de milliers d'infestations et de litres d'hémolymphe de *Biomphalaria*.

Richard. Maître d'œuvre de ce laboratoire au sens propre comme au figuré. Merci pour toutes ces années, c'est aussi grâce à vous que j'ai eu le courage de poursuivre cette aventure en thèse. Merci pour avoir installé la clim, monté les étagères, peint, entretenu le patio, choisi les chaises de bureau et accessoirement, fait un peu de biologie moléculaire ;). Au final, merci pour votre humour, votre bienveillance, votre regard scientifique et votre patience. Je sais maintenant calculer des dilutions sans qu'il y ait besoin de les vérifier, on n'aura pas tout perdu !

David. Le directeur de thèse officieux, mais officiellement toujours là pour poser les questions qui déstabilisent par leur pertinence, de mes premiers stages au laboratoire à mes dernières heures de contrat doctorales ! Je tenais à vous remercier pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant toutes ces années.

Plus généralement, je tenais à remercier l'ensemble des personnels du laboratoire IHPE. Il est rare d'apprécier chaque jour passé dans un endroit depuis pratiquement 5 années, malgré les difficultés que peuvent rencontrer des doctorants ! Donc merci. Jeff, pour ta bonne humeur, tout ce que tu m'as appris et surtout pour avoir fait en sorte que le labo ne s'écroule pas durant toutes ces années ; Diane et Camille, pour le dernier OM direction la vie civile ; Damien et Olivier, pour votre bonne humeur et vos blagues bien nulles. Tout le monde n'est pas apte à comprendre l'humour décomplexé, mais c'est ce qui m'a donné l'envie de me lever tous les matins et de venir au laboratoire, même les jours les plus compliqués. Je tiens tout de même à dire ici que mes blagues sont de bien meilleure qualité et toujours de mauv... bon goût ! Enfin, merci à l'ensemble des personnels techniques mais aussi aux chercheurs de Perpignan et de Montpellier qui, par leur savoir, leur bienveillance et leur disponibilité, permettent aux étudiants d'évoluer dans un environnement scientifique de très grande qualité. Merci aussi à Silvain Pinaud, à qui je dois la base de mon sujet d'étude de thèse sur les hémocytes, et pour toute l'aide apportée sur les analyses bioinfo car je n'aurais pas eu assez d'une thèse pour les comprendre seul.

Julien, la manip comportement des Biomph est bientôt terminée, un jour peut-être on en fera un papier ! En tout cas, merci d'avoir été là ces 4 années, même pendant ton mi-temps, j'ai énormément appris à ton contact et apprécié chaque discussion passée avec toi. Promis, le rafale aura une belle vie chez moi ; ).

Les doctorants, sans qui toutes ces années de thèse auraient été un vrai calvaire. Comme aurait pu dire Otis, heu... Sarah « Moi, si je devais résumer ma vie aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres, des gens qui m'ont tendu la main, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où j'étais seule chez moi. ». Merci, Sarah et Mathilde. Le stock de pompotes et de bonbons va me permettre de démarrer mon futur postdoc avec sérénité et une bonne hyperglycémie digne d'un bon doctorant. Manon, pour m'avoir soutenu depuis nos stages de master au laboratoire, même si je n'oublierai pas cette bille de paintball bien placée sur la fesse ! Philippe, pour ta bonne humeur et ton amitié. Elodie, je n'oublierai pas ta blague à la fin de ma thèse, elle résume très bien ce par quoi je suis passé. Amélie, même si tu vas probablement juger ces remerciements comme Pipo, merci pour cette dernière année et j'espère que tu vas continuer la tradition du restaurant « spécialité américaine » le vendredi, sans quoi les autres doctorants vont manquer de gras. Pipo, même si nos discussions scientifiques n'atteignaient pas le niveau que tu attendais, j'ai énormément apprécié de faire cette thèse à tes côtés. Toi aussi ta thèse touche à sa fin, donc va dormir un peu et mange un repas complet !



Maud, c'était un plaisir de travailler avec toi, depuis que tu es partie, j'ai redescendu tous les produits vers des étagères plus accessibles ;).

Enfin, Luuuuuuuc ! On n'aura pas eu les années de thèse les plus faciles, mais une chose est sûre, c'est qu'elles auraient pu être bien pires voire impossibles si je n'avais pas eu un binôme et un ami comme toi au laboratoire. L'aventure n'est pas encore finie mais bon... ok... je te laisse retrouver ta femme, mais part pas trop loin quand même !! Finalement, si tu cherches les roues de ta voiture, Julien a dû en garder une copie dans son ordinateur.

Je terminerai ces quelques lignes de remerciements par les plus importants. Un immense merci à ma famille pour m'avoir supporté, dans tous les sens du terme... A mes parents, qui sont toujours là pour moi dans les bons comme les mauvais moments. Grâce à vous, j'ai pu être un soldat accompli et maintenant, un docteur diplômé. Sans vous, je n'aurais jamais pu faire aussi facilement ce grand écart ! Je n'oublie bien sûr pas mémé, qui a su supporter un petit fils de 30 ans à la maison et le gaver de clafoutis à la cerise. Mon frère et ma sœur qui, même de loin, m'ont supporté durant toutes ces années. Finalement, merci à toi Anaïs, tu dois être encore en train de corriger mes fautes d'orthographe et tournures de phrases, mais la réussite de cette thèse est aussi la tienne. Nous allons pouvoir maintenant démarrer une nouvelle vie.

<b>Introduction</b> -----	<b>1</b>
<b>A. Immunité et mémoire immunitaire</b> -----	<b>1</b>
1. Une brève histoire de l'immunité-----	1
2. Evolution du système immunitaire-----	3
3. La découverte du mécanisme de mémoire du système immunitaire inné, « trained immunity », chez les vertébrés-----	5
4. Le « priming » immunitaire ou mémoire immunitaire innée chez les invertébrés-----	9
5. Une vision préliminaire des mécanismes de la mémoire immunitaire innée chez les invertébrés-----	9
<b>B. Le modèle <i>B. glabrata</i> / <i>S. mansoni</i> pour l'étude de la mémoire immunitaire innée</b> -----	<b>14</b>
1. Le système de défense interne du mollusque-----	17
2. Caractérisation de la primo réponse : du point de vue du parasite-----	18
3. Caractérisation de la primo réponse : du point de vue de l'hôte-----	19
4. La réponse immunitaire de <i>Biomphalaria glabrata</i> -----	21
5. La caractérisation phénoménologique du priming chez <i>B. glabrata</i> -----	23
6. La réponse de seconde infestation et les premières données « omiques »-----	24
7. Le rôle des hémocytes dans cette réponse immunitaire innée-----	27
<b>C. La mémoire immunitaire innée : mise en lumière de son support cellulaire, de sa régulation, et des mécanismes moléculaires sous-jacents</b> -----	<b>29</b>
<b>Chapitre I : La réponse immunitaire mémoire des hémocytes</b> -----	<b>31</b>
<b>A. Introduction sur la mémoire immunitaire innée chez <i>B. glabrata</i></b> -----	<b>33</b>
1. L'épigénétique pour se souvenir-----	34
2. Le métabolisme pour apprendre à se souvenir-----	35
3. Les mécanismes de la mémoire immunitaire innée des invertébrés-----	37
<b>B. Innate immune memory in <i>Biomphalaria glabrata</i> snail: an epigenetic and metabolic trained immunity-related phenotype</b> -----	<b>41</b>
<b>C. Caractériser la réponse métabolique des hémocytes, un défi avant tout technique</b> -----	<b>83</b>
1. Exploration du métabolisme de <i>B. glabrata</i> -----	83
2. Des approches directes et indirectes de la mesure des métabolites dans les cellules-----	84
3. Utilisation de kits de dosage et de la technique Ysi-----	86
4. La technologie Seahorse-----	88
<b>D. Discussion</b> -----	<b>95</b>
1. La mémoire immunitaire innée portée par les hémocytes-----	96
2. Des mécanismes communs avec la « trained immunity »-----	98
<b>Chapitre II : La caractérisation du compartiment cellulaire support de la réponse mémoire immunitaire innée</b> -----	<b>105</b>
<b>A. Introduction sur les hémocytes de <i>B. glabrata</i></b> -----	<b>107</b>
1. Localisation de l'organe hématopoïétique-----	108
2. La microscopie pour caractériser les hémocytes circulants-----	108
3. De nouvelles approches de caractérisation des populations hémocytaires-----	110
<b>B. Des nouvelles technologies de séquençage pour caractériser les populations hémocytaires de <i>Biomphalaria</i> : l'apport du « single cell RNA sequencing »</b> -----	<b>112</b>
1. Pourquoi utiliser la technologie de « single cell RNA sequencing »-----	112
2. La méthode choisie pour les hémocytes de <i>B. glabrata</i> -----	113
3. Les objectifs de caractérisation des hémocytes de <i>B. glabrata</i> et leur rôle dans la mémoire immunitaire en réponse à <i>S. mansoni</i> -----	115
<b>C. Single cell RNA sequencing reveals hemocyte heterogeneity in <i>Biomphalaria glabrata</i>: Plasticity over diversity.</b> -----	<b>117</b>

<b>D. Deciphering the innate memory response of <i>Biomphalaria glabrata</i> to <i>Schistosoma mansoni</i> at a single cell level.</b>	<b>120</b>
<b>E. Discussion Générale des approches de « single cell RNA sequencing »</b>	<b>142</b>
<b>Chapitre III : Développement d'outils de transgénèse et de validation fonctionnelle du métabolisme dans la MII chez <i>B. glabrata</i></b>	<b>148</b>
<b>A. Transformation génétique par transgénèse chez <i>Biomphalaria glabrata</i></b>	<b>151</b>
1. L'outil de transposition	151
2. La méthode de transgénèse par l'utilisation de transposase chez <i>B. glabrata</i>	155
3. Résultats préliminaires et perspectives	158
4. Conclusion et objectifs à court terme sur les embryons et les cellules Bge	163
<b>B. Le rôle du métabolisme cellulaire dans l'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez <i>B. glabrata</i></b>	<b>164</b>
1. Le métabolisme cellulaire acteur clé de l'acquisition de la MII	164
2. Des drogues ciblant le métabolisme comme outils de validation fonctionnelle	167
3. Résultats préliminaires sur l'utilisation des drogues	170
4. Conclusion et perspectives	181
<b>Discussion générale</b>	<b>184</b>
<b>A. La réponse moléculaire globale des hémocytes de <i>B. glabrata</i></b>	<b>184</b>
<b>B. Les mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée</b>	<b>185</b>
<b>C. L'épigénétique et le métabolisme dans l'acquisition de la MII par les hémocytes</b>	<b>187</b>
<b>D. Perspective de caractérisation des mécanismes moléculaires de la MII</b>	<b>188</b>
<b>E. La mémoire immunitaire innée, un mécanisme porté par le mollusque mais manipulé par le parasite ?</b>	<b>195</b>
<b>F. Le rôle du parasite dans le phénomène d'acquisition de la MII chez <i>B. glabrata</i></b>	<b>196</b>
<b>G. Le rôle de la MII en milieu naturel sur la transmission du parasite et l'épidémiologie de la maladie</b>	<b>197</b>
<b>H. Conclusion</b>	<b>199</b>
<b>Bibliographies</b>	<b>202</b>
<b>ANNEXE 1</b>	<b>224</b>
<b>ANNEXE 2</b>	<b>226</b>
<b>ANNEXE 3</b>	<b>228</b>

# Introduction

## ***A. Immunité et mémoire immunitaire***

Le travail réalisé durant cette thèse a pour ambition de caractériser plus finement les mécanismes et les acteurs impliqués dans l'interaction entre un mollusque, ici *Biomphalaria glabrata*, et son parasite naturel, *Schistosoma mansoni*, l'agent responsable de la bilharziose intestinale humaine. Ainsi, par l'utilisation de nouvelles technologies de séquençage haut débit notamment, je souhaite apporter une nouvelle vision centrée sur le mollusque, du dialogue immunobiologique qui peut exister entre ces deux protagonistes. Nous pouvons alors décrire, pour ce mollusque, un organisme dont les mécanismes immunitaires ont longtemps été mésestimés, des processus immunitaires complexes que nous retrouvons très conservés dans le règne du vivant, que nous pourrions peut-être utiliser dans de nouvelles stratégies de lutte et de contrôle de la transmission à l'Homme de la maladie parasitaire.

Ainsi donc, cette thèse s'intéresse de près à une caractéristique particulière de l'immunité innée chez *Biomphalaria glabrata*, que l'on appelle immunité innée mémoire ou « priming » immunitaire.

### ***1. Une brève histoire de l'immunité***

Avant toute chose, il apparaît important de préciser ce qui se cache sous ce terme d'immunité. Immunité vient du latin *immunitas*, que nous pourrions traduire par “exempter de”, et qui, dans l'antiquité, renvoie principalement à un privilège de certains citoyens d'être exemptés, notamment de service militaire (Moulin, 1983). Une telle définition est certes bien loin de ce que nous allons étudier, cependant elle fait référence à une certaine notion de protection. Protection pressentie il y a des siècles de cela, en Asie, grâce à des procédés traditionnels de pseudo-vaccination contre la variole, appelée variolisation (Plotkin, 2014). Mais ce n'est que des centaines d'années plus tard que l'on s'intéresse scientifiquement à ces phénomènes et, à partir du XVIII<sup>ème</sup> siècle avec les travaux d'Edward Jenner, que l'on commence à se rapprocher d'une définition de l'immunité plus en termes médicaux. Jenner découvre alors qu'il est possible de se protéger contre la variole en inoculant aux patients un agent pathogène retrouvé chez la vache, et bénin chez l'Homme, appelé la vaccine (Opal, 2010). Un siècle plus tard, c'est au tour de Louis Pasteur d'étudier l'immunité, ou la capacité d'un organisme à devenir réfractaire à certaines maladies. Cette immunité s'acquiert à la suite d'une première rencontre bénigne avec le pathogène responsable de la maladie (Moulin, 1983).

Pasteur va alors utiliser cette immunité pour développer les premiers vaccins, notamment celui contre la rage, en utilisant cette fois-ci le pathogène atténué (mort dans le cas présent), ici un virus de la famille des Rhabdovirus et du genre *Lyssavirus* (Schwartz, 2022). C'est à partir de cette époque que Pasteur fait la rencontre d'un zoologiste ukrainien, Elie Metchnikoff. Ce dernier a mené des recherches sur la digestion intracellulaire des invertébrés (Metchnikoff, 1883), et démontre pour la première fois la capacité de certaines cellules à se défendre contre des corps étrangers. Il appela ces cellules des phagocytes, et la fonction la phagocytose. Il confirmera *in vivo* ses premières observations sur la Daphnie (*Daphnia magna*), lorsque cette dernière est infectée par un champignon ascomycète (*Metchnikowia bicuspidate*) (Metschnikoff, 1884). Metchnikoff identifiera un lien entre l'immunité de l'organisme et son identité (Tauber, 1994). Ce seront les premières recherches sur la théorie du soi et du non-soi, définie des années plus tard par Ehrlich et Burnet. Il posera ensuite, grâce à ses recherches sur les cellules de l'immunité, les bases de la théorie cellulaire de l'immunité, qui placera ces cellules phagocytaires au centre de la réponse immunitaire à un pathogène. Cette théorie de l'immunité cellulaire entre alors en concurrence avec la théorie de l'immunité humorale portée par Emil Adolf von Behring et Paul Ehrlich, qui met en évidence la présence de composés humoraux dans le sérum capable d'inactiver les toxines de bactéries (Kaufmann, 2019). Ces deux théories vaudront à leurs auteurs de partager le prix Nobel de médecine en 1901 et 1908.

Toutes ces découvertes sur la vaccination, ainsi que les théories cellulaires et humorales, sont le point de départ d'une nouvelle science qu'est l'immunologie, définie comme une branche des sciences biologiques qui étudie les mécanismes de défense d'un organisme contre des agents pathogènes. C'est donc une science relativement jeune qui va renvoyer dos à dos les deux théories de l'immunité cellulaire et humorale dans un premier temps, jusqu'aux années 1960 où les travaux de Jacques Miller vont réunifier ces deux théories. Il montrera l'implication des lymphocytes T (« dérivé du thymus ») et B (« non dérivé du thymus ») dans la réponse mémoire immunologique, leurs différenciations et leurs fonctions dans la production des anticorps, et donc des facteurs humoraux, et l'immunité acquise (Miller & Sprent, 1971). Ces années vont également voir la naissance de théories nouvelles et particulièrement, le modèle du soi et du non-soi proposé par Frank Burnet (Burnet, 1969), appuyé notamment par la découverte du complexe majeur d'histocompatibilité, mécanisme majeur dans la reconnaissance du soi et du non-soi (Dausset, 1985; Charron, 1992). A partir de ce moment, l'immunité cellulaire, principalement portée par l'immunité innée, et l'immunité humorale, portée par l'immunité acquise, commencent à être étudiées en tant que deux mécanismes faisant tous deux parties de

la réponse immunitaire des organismes. Les anticorps sont caractérisés, les mécanismes de recombinaison (système VDJ, sélection clonale) à la base de la diversité des anticorps sont aussi démontrés et l'importance des lymphocytes B dans la réponse humorale ne fait plus de doute.

L'immunité acquise domine dès lors la plupart des études d'immunobiologie jusqu'aux travaux de Charles Janeway, qui viennent alors montrer l'extrême complémentarité qui peut exister entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Il émet l'hypothèse de la présence de « pattern recognition receptors » (PRR) à la surface de certaines cellules de l'immunité innée, capables de reconnaître des motifs spécifiques à la surface des pathogènes (PAMP pour « pathogen-associated molecular patterns ») et donc que ces cellules permettent l'activation de l'immunité adaptative (Janeway, 1989; Janeway Jr & Medzhitov, 1998). Cette théorie est alors renforcée par la découverte de récepteurs toll-like (TLR) présents à la fois chez les mammifères et chez les insectes, découverte majeure dans la compréhension de la diversification des systèmes immunitaires au cours de l'évolution (Hoffmann & Reichhart, 2002; Beutler, 2009; Kaufmann, 2019).

Ainsi, l'immunité pourrait être définie comme l'ensemble des mécanismes qu'un organisme est capable de mettre en place. D'une part, au niveau moléculaire et cellulaire, afin de reconnaître et de se défendre contre les organismes pathogènes. D'autre part, au niveau de l'identification et l'élimination des cellules aberrantes, chez les organismes métazoaires, où l'immunité jouerait un rôle central dans le turn-over cellulaire.

## ***2. Evolution du système immunitaire***

Toutes les découvertes de ces siècles passés nous permettent ainsi de diviser l'immunité en deux grandes voies, à la fois distinctes et complémentaires, que sont l'immunité innée (ou immunité naturelle) et l'immunité acquise (ou immunité adaptative et mémoire). L'immunité innée a longtemps été considérée comme peu spécifique et peu régulée, donnant une protection immédiate contre les organismes, principalement par l'intermédiaire de barrières physiques, épithéliales, et l'action de l'immunité portée par les cellules (macrophages, etc.) (Anaya *et al.*, 2013). Alors que l'immunité adaptative repose, comme nous l'avons vu précédemment, sur l'action combinée des lymphocytes B et T permettant la reconnaissance, la production d'anticorps et donc une spécificité de réponse, la destruction de l'agent pathogène et surtout une mémoire des antigènes détectée (Cooper, 2012). Nous allons voir par la suite qu'il existe

certaines de grandes différences entre ces deux mécanismes immunitaires, mais que le système immunitaire inné n'est pas aussi "primitif" qu'il y paraît.

Chez les invertébrés, dont fait partie le gastéropode *Biomphalaria glabrata*, l'organisme modèle de cette thèse, l'immunité innée se trouve être la seule ligne de défense immunitaire de ces organismes. La majeure partie des études présentées précédemment a été menée sur des organismes dits vertébrés, et place l'immunité adaptative comme le stade ultime des systèmes immunitaires. Cependant, cette immunité adaptative n'est retrouvée que dans une petite fraction des organismes vivants à la surface de la planète, les vertébrés à mâchoire (gnathostomes), soit environ 1% des espèces vivantes (Purvis & Hector, 2000) alors que tous les êtres vivants possèdent un système immunitaire inné. Alors, comment expliquer que l'immunité adaptative, ou un processus semblable, n'ait pas vu le jour chez les organismes invertébrés, alors que ces espèces représentent la majorité des espèces vivantes sur terre et sont confrontées en toute logique aux mêmes pathogènes que les vertébrés ? Autrement dit, comment ne pas supposer que les invertébrés qui, finalement, ont conquis tous les écosystèmes de la planète et font preuve d'une incroyable diversité et capacité adaptative, n'aient pas eux aussi un système immunitaire d'une grande complexité et pourvu de processus de mémoire immunologique ?

L'hypothèse qui prédominait, lors des premières études sur le système immunitaire des invertébrés, était basée sur un dogme communément accepté, considérant que les organismes invertébrés étaient biologiquement moins complexes que les vertébrés (Klein, 1989). On décrivait alors leur petite taille et leur durée de vie courte, comme des traits les empêchant de développer assez de cellules immunitaires capables de produire une diversité de récepteurs assez importante pour détecter l'entière des pathogènes qu'ils seraient susceptibles de rencontrer. Medzhitov et Janeway pensaient alors que « ce qui est avantageux pour les vertébrés n'est pas nécessairement avantageux pour les invertébrés » (Medzhitov & Janeway, 1997). Ils faisaient donc l'hypothèse que l'acquisition de la mémoire immunitaire adaptative chez les vertébrés était due à des différences de stratégies de reproduction des espèces que l'on nomme stratégie K et stratégie r (MacArthur & Wilson, 1967; Pianka, 1970). Les organismes invertébrés privilégiant une stratégie r, autrement dit une durée de vie courte, un développement rapide et une grande production de descendance (forte reproduction), et les organismes vertébrés privilégiant une stratégie K, et donc une durée de vie plus longue avec un développement plus lent et une reproduction où plus d'énergie serait allouée à une descendance moins nombreuse. Ainsi, les invertébrés n'auraient aucun besoin d'acquiescer un système immunitaire coûteux en énergie pour une vie aussi courte, et donc avec une possibilité moindre

de rencontrer des pathogènes ou de rencontrer plusieurs fois le même pathogène au cours de leur vie. A l'inverse, les vertébrés, et leur longue durée de vie les exposant à de nombreux pathogènes et ce de manière répétée, ont eu la nécessité de développer un système immunitaire spécifique, capable de mémoire immunitaire. Cependant, ces théories nécessitent d'être reconsidérées à la lumière de la grande diversité biologique du monde vivant... Nous pouvons retrouver dans la nature, pléthore d'invertébrés plus gros que certains vertébrés, à titre d'exemple et pour grossir le trait, nous pourrions citer le calmar géant (*Architeuthis dux*) mesurant plusieurs mètres de long (Paxton, 2016). D'autres invertébrés encore ont une longévité surprenante capable d'égaliser certains vertébrés, comme la moule perlière d'eau douce *Margaritifera margaritifera* (Bauer, 1992) qui peut vivre au-delà de 100 ans, ou encore la praire d'Islande, *Arctica islandica* (Ridgway & Richardson, 2011) qui peut vivre plusieurs centaines d'années, ou bien certains coraux dépassant allègrement les milliers d'années (Roark *et al.*, 2009). Ainsi, nous ne pouvons pas attribuer le fait que ces invertébrés n'aient pas acquis de systèmes immunitaires adaptatifs seulement à cause de leur supposée faible complexité ou de leurs stratégies reproductives.

La question s'avère donc bien plus complexe, d'autant plus que ces invertébrés sont aussi fréquemment en contact avec une grande diversité de pathogènes (Loker *et al.*, 2004). Et donc un système aussi rigide que celui défini historiquement par la reconnaissance de certains PAMP (lipopolysaccharides, peptidoglycanes, flagellines, etc.) ne suffit pas à expliquer la capacité de ces organismes à reconnaître toute la diversité de pathogènes. Il doit alors exister des molécules et mécanismes plus complexes qui expliqueraient la diversité de réponse du système immunitaire inné. Bien que ce type de mécanisme ait déjà été pressenti, d'un point de vue phénoménologique, chez les invertébrés des années plus tôt, ce que nous détaillerons plus loin, la caractérisation précise de ces mécanismes, est alors venue encore une fois de l'étude du système immunitaire des vertébrés et la découverte de mécanismes de « trained immunity ».

### ***3. La découverte du mécanisme de mémoire du système immunitaire inné, « trained immunity », chez les vertébrés***

Comme nous l'avons vu précédemment, le système immunitaire des vertébrés est partagé entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Jusqu'à présent, nous acceptions le fait que seule l'immunité adaptative était capable de mémoire. Autrement dit, seule l'immunité adaptative était capable de produire des molécules de reconnaissance suffisamment variables et en quantité pour reconnaître la grande majorité des pathogènes, et se rappeler de cette rencontre



afin d'y répondre plus efficacement lors de rencontres successives. C'est pourquoi ce système a été, durant l'histoire de l'immunologie, scrupuleusement étudié et utilisé dans le but de développer des stratégies de traitement contre les maladies humaines, au point même de faire « oublier » aux scientifiques que ce système immunitaire adaptatif n'est pas le seul. Certes, le système immunitaire inné est présent, mais pendant longtemps relégué à une réponse non spécifique, faiblement régulée et sans capacité de mémoire. La réponse immunitaire innée est principalement médiée par une réponse cellulaire déclenchée par la reconnaissance de pathogènes par des PRR et impliquant des phagocytes. Ce système immunitaire inné comporte aussi une composante importante, dite humorale (composés solubles), impliquant des molécules de reconnaissance soluble (PRR), des cascades enzymatiques liées au système du complément, des lectines, des peptides antimicrobiens, le lysozyme et bien d'autres (Martin *et al.*, 2016). Ces molécules, qu'elles soient associées à la réponse cellulaire ou humorale, concourent toutes à la destruction du pathogène par la lyse, ou la phagocytose notamment, de ces derniers. Ces mécanismes peuvent être activés rapidement à la suite d'une infection, à la différence du système immunitaire adaptatif qui nécessite plusieurs jours de mise en place.

Mais depuis maintenant plusieurs dizaines d'années, ces certitudes sur le système immunitaire inné sont remises en question. Dès les années 60, des chercheurs mettent en évidence la présence d'un phénomène dit de protection croisée chez des organismes vertébrés (Mackness, 1964, 1969). Cette protection croisée est induite par des cellules lymphoïdes activées par des macrophages, à la suite d'une première rencontre avec un pathogène, permettant ensuite une meilleure réponse cette fois-ci non spécifique, donc non portée par les anticorps, contre une seconde infection. Plus récemment, des études montrent que le vaccin BCG (Bacille Calmette-Guérin) dirigé contre *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent responsable de la tuberculose chez l'Homme, est capable d'induire une réponse spécifique de mémoire du système immunitaire adaptatif, mais est aussi capable d'induire une immunité croisée contre des infections à *Candida albicans*, *Schistosoma mansoni* et *Mycobacterium tuberculosis* (Bistoni *et al.*, 1986; Blok *et al.*, 2015; Palmieri *et al.*, 2021). Cette protection, alors moins spécifique du fait de la reconnaissance de motifs communs à plusieurs pathogènes (PAMPs), est le résultat de la réponse de cellules de l'immunité innée, qui se retrouvent être « entraînées » après un premier contact avec un pathogène et donc prêtes à répondre plus efficacement à une seconde rencontre (Netea & van der Meer, 2017). Cette nouvelle capacité du système immunitaire inné à exprimer une mémoire immunologique, est alors appelée « trained immunity » (immunité entraînée) (Netea *et al.*, 2011). Cette immunité entraînée est déclenchée

comme l'immunité adaptative, par une première rencontre avec un pathogène, un stimulus ou même par une vaccination, et permet à l'hôte de mieux se défendre face à une seconde infection. Les deux systèmes divergent au niveau du caractère aspécifique de la réponse aux pathogènes de l'immunité entraînée, et sur le fait que cette immunité repose sur l'activation de cellules de l'immunité innée et d'une réponse inflammatoire augmentée (Netea et al., 2011).

Ainsi donc, depuis une décennie maintenant, la recherche s'est efforcée de décrire précisément les mécanismes moléculaires qui soutiennent cette immunité entraînée chez les vertébrés. Ce sont donc à ce jour les recherches les plus avancées dans le domaine de l'immunité innée mémoire (Bekkering *et al.*, 2021). Elles se sont intéressées, dans un premier temps, aux cellules qui portent cette immunité entraînée, qui sont principalement les cellules myéloïdes comme les monocytes, les macrophages et cellules dendritiques, mais aussi des lignées de cellules lymphoïdes du système inné comme les cellules NK et les cellules lymphoïdes innées (CLI) (Vetvicka *et al.*, 2021). Ces cellules, à la suite d'une première rencontre avec un pathogène, se retrouvent être « entraînées ». Elles subissent donc de profonds changements, à la fois métaboliques (Domínguez-Andrés, Joosten, *et al.*, 2019) mais aussi épigénétiques (que nous développerons plus en détail dans le chapitre I), leur permettant de produire une meilleure réponse, plus rapide, plus forte mais non spécifique lors d'une seconde rencontre avec un stimulus (Netea *et al.*, 2016; Bekkering *et al.*, 2021) (Figure 1). Pour contre balancer cette immunité entraînée, nous retrouvons ce qui est appelé l'«immune tolerance» ou tolérance immunitaire, qui correspond à des cellules de l'immunité incapables de répondre à une seconde infection, principalement pour protéger l'organisme d'une réponse inflammatoire trop importante pouvant endommager les tissus (Foster *et al.*, 2007; Divangahi *et al.*, 2021) ( Figure 1 ). La description de ces mécanismes sera développée plus loin, dans la première partie de cette thèse (cf. Partie I). Ce type de réponse immunitaire entraînée n'est pas seulement présente chez les cellules myéloïdes matures comme les macrophages, mais aussi dans leurs cellules progénitrices dans l'organe hématopoïétique et dans la moelle osseuse (Mitroulis *et al.*, 2018).

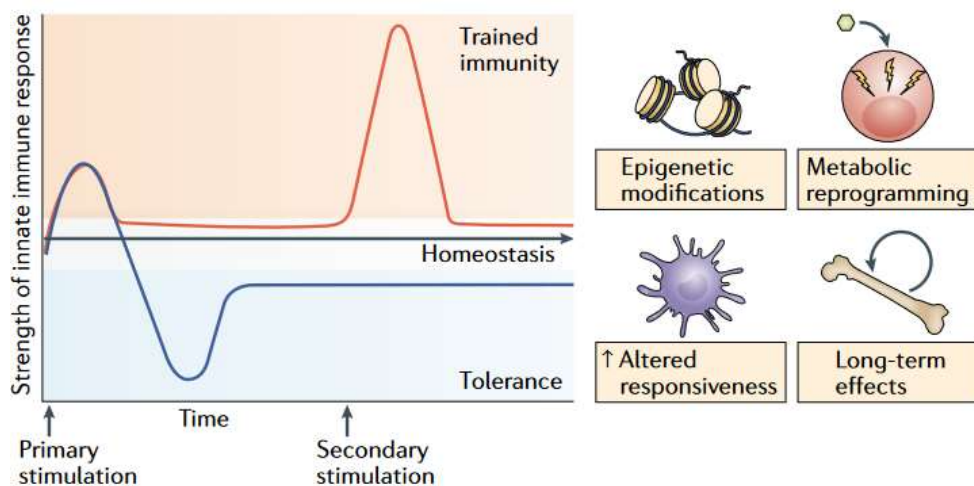


Figure 1: Schéma représentant la réponse mémoire du système immunitaire inné décrit chez les vertébrés. La « trained immunity » impliquant une reprogrammation épigénétique et métabolique sur le long terme, à la suite d'une première rencontre avec un pathogène, conduisant à une réponse exacerbée du système immunitaire lors d'une seconde rencontre. Parfois, la réponse inflammatoire peut devenir trop forte et incontrôlable, nécessitant un mécanisme contraire, « immune tolerance », permettant de maintenir l'homéostasie ainsi que l'intégrité de l'organisme (Netea et al., 2020).

Nous avons donc fait, en l'espace d'une dizaine d'années, un bon spectaculaire dans la compréhension des mécanismes de l'immunité innée mémoire, ou immunité entraînée chez les vertébrés, rendant compte d'une complexité encore insoupçonnée, et surtout capable de mémoire comme le système immunitaire adaptatif. Cependant, cette mémoire du système immunitaire inné n'a, en fin de compte, rien de vraiment nouveau. En effet, des travaux réalisés sur les plantes ont mis en évidence leur capacité à exprimer une forme de mémoire immunologique connue sous l'acronyme SAR pour « Systemic Acquired Resistance » (Kachroo & Robin, 2013; Reimer-Michalski & Conrath, 2016). À la suite de la détection d'un pathogène par la cuticule des plantes, un signal systémique est lancé à toutes les cellules de l'organisme, les préparant ainsi à répondre à l'arrivée imminente du pathogène. Les molécules permettant cette induction sont aujourd'hui très étudiées (Kachroo & Robin, 2013) et les mécanismes épigénétiques qui soutiennent cette réponse SAR commencent à être mieux caractérisés (Jaskiewicz *et al.*, 2011; Luna & Ton, 2012). Et si l'on remonte encore le temps, nous retrouvons des données suggérant l'existence de phénomènes mémoriels de l'immunité innée chez des organismes dépourvus d'immunité adaptative, les invertébrés (Kurtz, 2005). Mais, bien que les mises en évidence phénoménologiques de mémoire immunitaire innée chez les invertébrés soient plus anciennes que les découvertes dont nous venons de parler sur les vertébrés, peu d'études ont réussi à ce jour à décrire les mécanismes moléculaires sous-jacents.

#### ***4. Le « priming » immunitaire ou mémoire immunitaire innée chez les invertébrés***

Chez les invertébrés, le « priming immunitaire » ou mémoire immunitaire innée (Kurtz, 2005; Gourbal *et al.*, 2018) a surtout été démontré sur la base d'expériences phénotypiques, démontrant une meilleure survie des individus suite à une première rencontre avec un pathogène ou un stimulus immunitaire (Melillo *et al.*, 2018). Les premières expériences sur des organismes invertébrés, qui ont montré une discrimination du soi et du non soi, ont été faites par des xénogreffes (greffon provenant d'une espèce différente au receveur) sur des colonies de coraux (Theodor, 1970). Ces greffes étaient alors rejetées par les organismes, alors que les iso-greffes (donneur et receveur génétiquement identiques) ne l'étaient pas. Cela a permis de mettre en évidence que ces organismes ne s'appuyaient pas seulement sur la reconnaissance de PAMP, mais étaient aussi capables de reconnaître du non soi non pathogénique aussi appelé allorecognition (Kurtz, 2005). D'autres études ont alors été menées dans le même sens, et ont montré que des greffons, provenant d'organismes génétiquement différents, étaient rejetés beaucoup plus rapidement lors de la deuxième greffe sur des organismes « simples » comme les éponges ou les annélides (Cooper, 1968; Hildemann *et al.*, 1979). Nous avons donc là une spécificité et un processus de réponse mémoire du système immunitaire inné (Kurtz, 2005). Depuis ces études, et boostées par les découvertes faites sur l'immunité entraînée des vertébrés, pléthore d'expériences ont été menées sur l'immunité mémoire des invertébrés, permettant de caractériser de plus en plus d'espèces avec ces capacités immunitaires (Kurtz, 2005; Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2022; Prigot-Maurice *et al.*, 2022).

#### ***5. Une vision préliminaire des mécanismes de la mémoire immunitaire innée chez les invertébrés***

En ce qui concerne les mécanismes qui soutiennent ces phénomènes de mémoire immunitaire chez les invertébrés, peu de choses sont encore décrites en comparaison des modèles vertébrés. De plus, la grande diversité d'espèces au sein des invertébrés, ainsi que la grande diversité de mécanismes immunitaires associés à chacun d'eux, rendent la tâche complexe lorsqu'il s'agit de définir un mécanisme synthétique supportant la mémoire immunitaire chez ces organismes (Loker *et al.*, 2004). Certaines espèces comme la guêpe, *Polistes dominula*, sont capables de produire une résistance face à *E. coli* lorsqu'elles ont été préalablement mises en contact avec une levure, *Saccharomyces cerevisiae*, mais les

mécanismes impliqués dans cette réponse ne sont pas décrits (Meriggi *et al.*, 2019). Le vers de farine, *Tenebrio molitor*, capable d'acquérir une résistance contre un champignon *Metarhizium anisopliae* lorsqu'il est immunisé par l'injection préalable de lipopolysaccharides (LPS), un déterminant membranaire des bactéries (Moret & Siva-Jothy, 2003). Donc, certaines réponses immunitaires peuvent être croisées et non spécifiques aux pathogènes utilisés lors de la première infection, tout comme lors de l'immunité entraînée des vertébrés. Certaines réponses non spécifiques et croisées peuvent aussi se caractériser par une réponse cellulaire accrue comme chez l'anophèle (*Anopheles gambiae*), chez qui l'infestation par le parasite protozoaire du genre *plasmodium*, permet une meilleure protection bactérienne et, finalement, une meilleure résistance à une réinfestation par le parasite. Cette résistance passe, cette fois-ci, par une différenciation et une augmentation du nombre d'hémocytes (Rodrigues *et al.*, 2010). Chez certains mollusques comme l'huître, l'injection de molécules capables de mimer l'ARN double brin viral (Poly(I.C)) déclenche une réponse immunitaire de type mémoire antivirale dirigée en partie contre OsHV-1 (réponse antivirale) par la surexpression de gènes immunitaires de l'hôte maintenus sur de longues périodes de temps (Lafont *et al.*, 2020).

Mais de façon surprenante, la mémoire peut aussi s'avérer spécifique, ce qui peut paraître peu attendu chez des organismes dépourvus de molécules de reconnaissance diversifiées, et ne possédant pas de système immunitaire adaptatif et donc d'anticorps et cellules lymphoïdes capables de produire une quasi-infinité de récepteurs immuns. Certaines espèces comme la drosophile (*Drosophila melanogaster*) sont capables de développer une spécificité de résistance à la première infection à certains organismes. Comme *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Beauveria bassiana*, mais cette première infection avec l'un ou l'autre de ces pathogènes ne protégera pas cette mouche contre une seconde infection avec un autre pathogène (Pham *et al.*, 2007; Brehélin & Roch, 2008). Cette réponse implique encore une fois les cellules de l'immunité innée, les hémocytes, et plus précisément les phagocytes ainsi que certaines voies d'activation très particulières, comme la voie des récepteurs Toll (Pham *et al.*, 2007). Nous pouvons retrouver cette spécificité de réponse mémoire chez de nombreux invertébrés, face à des microorganismes comme des bactéries, virus, champignons, mais aussi face à des organismes plus « complexes » comme des parasites eucaryotes protozoaires et métazoaires (Milutinović & Kurtz, 2016), mais aussi en réponse à certains stimulants pouvant s'apparenter à de la vaccination, avec l'utilisation notamment de pathogènes inactivés, ou de composés issus de pathogènes, comme dans les études de vaccination de la crevette (*Penaeus monodon*). Une réponse à des infections de virus provoquant le « white spot syndrome virus (WSSV) » peut

être déclenchée en utilisant des protéines de l'enveloppe du virion (Witteveldt *et al.*, 2004; Prigot-Maurice *et al.*, 2022). Nous pouvons donc retrouver cette mémoire, parfois spécifique, chez les insectes (Sadd & Schmid-Hempel, 2006), les crustacés (Roth & Kurtz, 2009; Chang *et al.*, 2018; Low & Chong, 2020), les nématodes (Willis *et al.*, 2021) ou encore les mollusques (Portela *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2016). Mais alors, comment un tel système reposant sur une si forte spécificité peut-il avoir lieu chez des organismes dépourvus de système adaptatif tel qu'on le connaît chez les vertébrés ?

Une des explications possibles serait la présence de mécanismes de réarrangement somatique permettant la production d'une grande diversité de récepteurs. Chez les vertébrés à mâchoire, gnathostomes, ces mécanismes de diversification sont aujourd'hui très étudiés et bien connus. Cela passe par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) présentant une grande diversité de protéines réceptrices capables de présenter aux lymphocytes T et B les peptides du non-soi reconnus par le complexe (Charron, 1992). Cela passe aussi par des récepteurs spécifiques, produits par réarrangement somatique des gènes supporté en partie par les gènes RAG1 et RAG2, permettant la création de gènes codants pour la superfamille des immunoglobulines (Ig) des lymphocytes B et des récepteurs des lymphocytes T (T cell receptor: TCR) (Du Pasquier, 2001, 2006).

Chez les invertébrés, certains récepteurs sont capables d'une certaine spécificité, et peuvent discriminer des bactéries gram – et des bactéries gram + chez la drosophile, et d'induire l'activation de voies particulières comme la voie des récepteurs Toll ou bien la voie de signalisation Imd (« immune deficiency ») (Boutros *et al.*, 2002; Rutschmann *et al.*, 2002). L'induction seule de ces voies et récepteurs ne suffit pas à expliquer la capacité du système immunitaire inné des invertébrés à détecter un si grand nombre de pathogènes et surtout de s'en rappeler sur le long terme (Kurtz, 2005). Cependant, nous pouvons trouver plusieurs études sur des molécules bien plus diversifiées, hypervariables, comme nous avons pu le décrire pour le système vertébré. Sauf que dans le cas des invertébrés, cette diversification n'est pas associée à une sélection clonale des cellules qui participent à la défense de l'hôte (Bowden *et al.*, 2007; Cerenius & Söderhäll, 2013). Donc, la diversité chez les invertébrés reste bien moindre que la diversité chez les vertébrés en termes de variants possibles générés.

Parmi ces molécules hypervariables, nous pouvons citer en exemple les VCBP (« Variable Chitin-Binding Protein ») exprimées par les cellules immunitaires de l'Amphioxus (*Branchiostoma floridae*) (Cannon *et al.*, 2002; Prada *et al.*, 2006) et du tunicier *Ciona intestinalis* (Liberti *et al.*, 2014). Ces molécules sont décrites comme ayant une forte

ressemblance structurale avec les immunoglobulines et les récepteurs des lymphocytes T des vertébrés (Cerenius & Söderhäll, 2013) et se retrouvent exprimées par les hémocytes chez *Ciona intestinalis* et probablement impliquées dans la réponse immunitaire et la phagocytose (Dishaw *et al.*, 2011, 2016). Les VCBP ont été montrées comme étant codées par un grand nombre de gènes présents dans le génome de l'Amphioxus. La diversité de ces molécules serait due au grand nombre de régions inversées répétées et aux différentes insertions intra-géniques dans les régions codantes pour ces VCBP (Dishaw *et al.*, 2008). Nous pouvons aussi identifier les récepteurs de la famille des sp185/333, exprimés par l'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*) en fonction des molécules détectées par l'organisme, et qui se retrouvent fortement exprimées dans les coelomocytes suite à une infection, bien que leur fonction dans l'immunité reste encore à être prouvée (Dheilly *et al.*, 2009).

Enfin deux autres molécules hypervariables ont pu être identifiées chez les invertébrés, les DSCAMs pour « Down syndrome cell adhesion molecules » que l'on peut retrouver chez la drosophile (Watson *et al.*, 2005), la daphnie (Brites *et al.*, 2008) ou encore l'anophèle (Dong *et al.*, 2006) et les FREPs (« Fibrinogen-related Proteins »), que l'on retrouve chez beaucoup d'invertébrés mais qui ont été principalement décrites chez le mollusque *B. glabrata* (Adema *et al.*, 1997; Zhang & Loker, 2004; Moné, Gourbal, *et al.*, 2010). Ce sont les deux molécules hypervariables les plus étudiées chez les invertébrés et, comme les autres précédemment citées, ce sont les molécules les plus prometteuses permettant d'expliquer la spécificité dans le modèle mémoire de l'immunité innée. Les DSCAMs sont des molécules appartenant à la famille des immunoglobulines, et les études sur ces molécules ont mis en évidence leur implication dans la réponse spécifique des invertébrés et leur participation dans différents processus de l'immunité, tels que l'induction de la phagocytose ou encore la transduction du signal immunitaire (Shi & Lee, 2012; Ng & Kurtz, 2020; Li, 2021). La forte similarité d'action des DSCAMs ainsi que la grande capacité de diversification de ces molécules (plusieurs milliers de variants pouvant être générés) ont poussé certains scientifiques à voir ces molécules comme une alternative aux anticorps des vertébrés, mais cette fois-ci chez les invertébrés, avec bien sûr une diversification des DSCAMs bien plus faible comparée aux anticorps (Stuart & Ezekowitz, 2008; Li, 2021).

Les FREPs sont des molécules qui vont nous intéresser plus particulièrement car elles concernent le modèle d'étude de cette thèse, le gastéropode d'eau douce *Biomphalaria glabrata*. Ces molécules sont constituées d'un ou deux domaines de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) en position N-terminale et d'un domaine fibrinogène (FBG) en position C-terminale. Cette molécule est produite et sécrétée dans l'hémolymph de l'animal

par les hémocytes (Adema *et al.*, 1997; Zhang & Loker, 2004; Moné, Gourbal, *et al.*, 2010). Elles sont le fruit de plusieurs mécanismes de diversification tels que des réarrangements somatiques, permettant la diversification de son domaine IgSF notamment par des événements de mutation (Gordy *et al.*, 2015), d'épissage alternatif (Zhang *et al.*, 2004; Gordy *et al.*, 2015) ou encore des événements de rétrotransposition (Zhang & Loker, 2003). Chez certaines FREPs (comme la FREP3), les études ont montré une diversité importante de séquences de cette molécule, soit 34 pour la seule étude d'un domaine IgSF1 (Zhang *et al.*, 2004). Ces molécules sont extrêmement intéressantes en ce qui concerne l'immunité du mollusque. Certaines de ces FREPs se sont révélées capables de former des complexes avec des antigènes du parasite *S. mansoni*, nommés SmPoMucs (« *S. mansoni* polymorphic mucins »), des mucines agissant comme des PAMP et qui pourraient être un ligand initiant la réponse immunitaire du mollusque (Moné, Gourbal, *et al.*, 2010). De plus, ce complexe FREP/SmPoMuc possède entre autre un troisième partenaire, une BgTEP (*B. glabrata* « Thioester-containing protein ») (Portet *et al.*, 2017, 2018; Duval *et al.*, 2020) connue dans d'autres systèmes invertébrés comme chez le moustique (Blandin & Levashina, 2004), et qui pourrait jouer un rôle d'opsonisation et ainsi participer à la destruction du parasite (ressemblant à la voie des lectine du système du complément). Pour finir, certaines FREPs sont aussi retrouvées sur-exprimées en réponse à une infestation, mais aussi une ré-infestation par *S. mansoni*, et la baisse d'expression par knock-down de plusieurs variants de FREPs par la technique de l'ARN interférence est capable de reverter partiellement le phénotype d'infestation, et donc aussi d'immunité mémoire du mollusque face au parasite *S. mansoni* (Pinaud *et al.*, 2016).

Nous n'avons donc, à ce stade, plus aucun doute quant à la présence de mécanismes de mémoire portés par le système immunitaire inné chez les invertébrés. Cependant, bien que ces mécanismes soient actuellement parfaitement décrits dans les modèles vertébrés, nous ne connaissons qu'un fragment infime des mécanismes moléculaires sous-jacents chez les invertébrés. La grande diversité des espèces qui forment ce groupe, et la grande diversité des réponses immunitaires qui en découlent, rendent la tâche de caractérisation des mécanismes de cette réponse immunitaire innée mémoire plus complexe encore. Il est donc aujourd'hui plus que nécessaire de développer des approches, les plus exhaustives possible, afin de caractériser finement les mécanismes impliqués dans cette réponse mémoire. Et c'est exactement ce que je propose de réaliser dans cette thèse, en me focalisant sur le mollusque d'eau douce *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), l'hôte intermédiaire du parasite *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), agent responsable de la bilharziose intestinale chez l'Homme. Cette



interaction entre *S. mansoni* et *B. glabrata* se retrouve principalement dans les régions d'Amérique du Sud, que le parasite a colonisé récemment dans l'histoire, et principalement lors des différentes traites négrières vers le nouveau monde où *B. glabrata* était déjà présent (Morgan *et al.*, 2001). Cette nouvelle rencontre avec le genre *Biomphalaria*, dans le nouveau monde, permettra l'apparition de phénotypes d'interactions, un gradient de compatibilité entre l'hôte et le parasite qui ne sont plus visibles en Afrique, où le parasite coexiste depuis plus longtemps avec son hôte. Ceci fait donc de *B. glabrata* un modèle d'étude de choix, afin d'étudier les interactions hôte/parasite et les bases moléculaires associées.

### **B. Le modèle *B. glabrata*/*S. mansoni* pour l'étude de la mémoire immunitaire innée**

Le parasite, *Schistosoma mansoni*, est un ver trématode de la famille des *Schistosomatidae*. Il est responsable d'une maladie, la schistosomiase ou Bilharziose intestinale chez l'Homme. Cette maladie affecte encore aujourd'hui près de 200 millions de personnes dans le monde, principalement en Afrique et en Amérique du Sud, et est considérée comme la maladie parasitaire (parasite eucaryotes) humaine la plus répandue dans le monde après le paludisme (World Health Organization, 2018). Ce parasite possède un cycle de vie dit complexe, nécessitant deux hôtes extrêmement différents. Un hôte définitif humain (Webster *et al.*, 2016), et un hôte intermédiaire obligatoire mollusque, comme *Biomphalaria glabrata*, un gastéropode de la famille des *planorbidae*. La reproduction sexuée du parasite se produit dans les veines mésentériques de l'hôte définitif, par appariement d'un vers mâle et d'un ver femelle capables de pondre 350 œufs par jour (Cheever *et al.*, 1994) (Figure 2A). Certains de ces œufs (Figure 2B) peuvent alors être emportés par le flux sanguin de l'hôte et se retrouvent bloqués au niveau du foie et enkystés, quand d'autres n'arrivent pas à passer la barrière de l'intestin et restent bloqués dans les tissus. C'est alors l'accumulation dans le temps, de ces œufs, dans les tissus de l'hôte qui provoque une réaction inflammatoire de l'organisme et les symptômes de la maladie (sang dans les fesses, hépato-splénomégalie, etc.) dysfonctionnement hépatique (cirrhose et cancer hépatique) responsable de la mortalité chez l'Homme. Finalement, environ 30% des œufs produits par le couple de Schistosomes sont capables de traverser la paroi intestinale de l'hôte pour se retrouver dans la lumière de l'intestin et finalement dans le milieu extérieur (Cheever *et al.*, 1994). De l'œuf éclot alors un miracidium (larve nageante), au contact de l'eau douce (Figure 2C). Ce stade de larve nageante du parasite doit alors trouver très rapidement son hôte intermédiaire obligatoire, ici *B. glabrata*, pour continuer son

développement. Le miracidium pénètre alors entièrement dans le mollusque et commence sa transformation en sporocyste primaire (SPI) (Figure 2D). Ces SPI vont alors bourgeonner et donner naissance à des dizaines, voire des centaines de sporocystes secondaires (SPII), par multiplication asexuée ou clonale. Ces SPII vont alors déchirer le tégument du SPI et commencer leur migration (Figure 2E) à travers les tissus de l'animal, environ 7-10 jours suivant l'infestation du mollusque (Schutte, 1975; Jourdane & Théron, 1987). Ces SPII vont alors se diriger vers l'hépatopancréas de leur hôte, où ils vont s'accumuler, se développer et commencer leur différenciation en cercaire (Figure 2F), le dernier stade de développement intramolluscal du parasite, ce que l'on appelle la cercariogénèse (Fournier & Théron, 1985). Au même moment, certains SPII peuvent entrer en sporocystogénèse et se mettre à reproduire des sporocystes dans le mollusque (Hansen, 1973; Jourdane & Théron, 1987). Cependant, les mécanismes qui permettent un tel revirement du développement du parasite sont encore inconnus, probablement rares et donc extrêmement difficiles à mettre en évidence. Les cercaires nouvellement formées (Figure 2G) vont entamer une nouvelle migration à travers les tissus du mollusque, en direction du manteau de l'animal (Portela *et al.*, 2013; Tucker *et al.*, 2014) où ils pourront regagner le milieu extérieur et l'eau douce. Ce seront des milliers de cercaires qui seront produites à partir d'un mollusque. La cercaire trouve alors son hôte définitif humain, traverse l'épiderme de celui-ci et va se différencier en schistosomule. Ce schistosomule va alors utiliser le système circulatoire sanguin pour poursuivre son développement dans les poumons, le foie et le système porte hépatique, où le parasite va acquérir un dimorphisme sexuel et trouver son partenaire avant de rejoindre les veines mésentériques et boucler son cycle de vie.

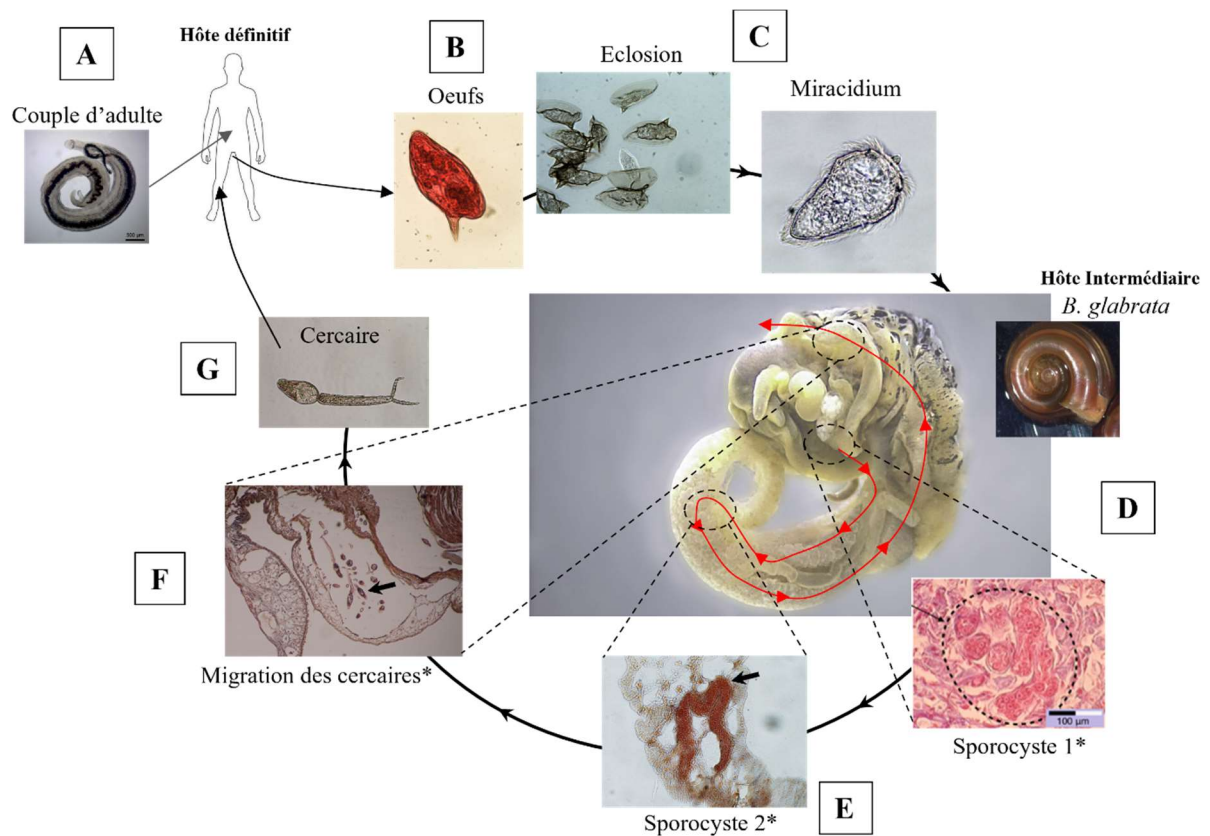


Figure 2: Représentation schématique du cycle de vie complexe de *S. mansoni*, centré principalement sur un de ses hôtes intermédiaires, *B. glabrata*. Les flèches rouges correspondent au parcours du parasite dans le mollusque. Les flèches noires représentent le cycle de développement du parasite. Les traits en pointillés schématisent un zoom de certaines parties du mollusque et les stades de développement du parasite associés. \* Images provenant d'articles scientifiques (Portela et al., 2013; Pinaud et al., 2016).

Jusqu'à présent, la recherche internationale sur cette maladie, provoquée par ce parasite, s'est fortement focalisée sur les interactions qui pouvaient exister entre le parasite et son hôte définitif l'Homme. De ces recherches sont nées des chimiothérapies extrêmement efficaces, permettant de tuer les parasites adultes, par l'utilisation d'une molécule, le praziquantel. Cette molécule est abondamment utilisée dans le cadre des actions de prévention et de lutte (thérapie de masse) contre la schistosomiase, menées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Ross *et al.*, 2015). Cependant, son utilisation intensive peut devenir problématique. Outre le fait qu'une telle distribution intensive ne peut être viable sur le long terme, et que ce type de molécule ne prévient pas les réinfestations ultérieures, l'utilisation d'une seule molécule, aussi efficace soit-elle, peut aussi provoquer l'apparition de résistances médicamenteuses dans les populations traitées (Ismail *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2012). Il est donc nécessaire de diriger la recherche vers d'autres moyens de lutte plus intégratifs, en impliquant, comme cela est déjà fait, les populations (éducation, amélioration des systèmes sanitaires, amélioration des accès à l'eau potable, etc.), mais aussi en développant de nouveaux traitements ou vaccins (Molehin *et al.*, 2022). Autrement dit, lorsque l'on en revient au cycle de vie du parasite, la plupart des

efforts de lutte sont seulement consacrés sur une moitié du cycle parasitaire du schistosome, en oubliant une partie importante de son cycle de vie qu'il effectue chez son hôte intermédiaire. Ce n'est que récemment que l'OMS a proposé d'intensifier les recherches du côté des hôtes intermédiaires gastéropodes (Adema *et al.*, 2012), et notamment par le contrôle *in situ* des populations de mollusques et l'utilisation de molluscicides (World Health Organization, 2017). Mais on l'aura bien compris, là encore, déverser des produits chimiques nocifs pour les hôtes intermédiaires du parasite *Schistosoma* est probablement aussi nocif pour une grande partie de la diversité biologique des milieux traités, et du coup ne peut être qu'une solution à court terme. Alors pourquoi ne pas s'intéresser aux interactions qui peuvent exister entre le parasite et son hôte intermédiaire ? Le but sera d'identifier et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques, capables de bloquer la transmission du parasite, non plus seulement depuis son hôte définitif, mais depuis son hôte intermédiaire mollusque. Quels sont les mécanismes immunobiologiques impliqués dans cette interaction hôte/parasite ? C'est à cette question que le laboratoire IHPE s'intéresse depuis maintenant plusieurs décennies. Et il devient évident que l'étude et la compréhension des mécanismes immunobiologiques qui sont mis en œuvre, dans le dialogue entre le parasite et son hôte gastéropode, sont d'une importance fondamentale dans la détermination de nouveaux outils de lutte contre la maladie, mais aussi se révèlent particulièrement intéressants d'un point de vue fondamental et évolutif.

### ***1. Le système de défense interne du mollusque***

A l'instar des autres invertébrés, *B. glabrata* possède un système de défense interne basé sur deux grandes composantes de l'immunité innée : la composante humorale, ou autrement dit la présence de composés dans l'hémolymphe de l'animal capables de tuer et/ou de reconnaître les pathogènes qui réussissent à entrer dans l'organisme, et la composante cellulaire, portée probablement par plusieurs types de cellules résidant dans les tissus du mollusque (Van der Knaap & Loker, 1990) et surtout par des cellules mobiles, que l'on appelle de façon générale des hémocytes, qui circulent librement dans le système circulatoire semi-ouvert de l'organisme. D'après la littérature, nous pouvons distinguer de deux à cinq sous-populations hémocytaires différentes, caractérisées par des observations microscopiques, que l'on peut grossièrement regrouper en deux catégories : des cellules agranulaires (hyalinocytes et blast-like cells) et des cellules granulaires (granulocytes). Cependant à ce jour, nous ne savons encore que peu de choses sur les hémocytes de *Biomphalaria* qui restent une véritable boîte noire. Les descriptions morphologiques ne suffisent pas, à elles seules, à définir toutes les sous-populations

hémocytaires présentes. Les hémocytes semblent avoir une certaine hétérogénéité dans leur morphologie, dans les molécules qu'elles expriment mais aussi dans leurs fonctions de phagocytose et de cytotoxicité (Bayne *et al.*, 1980a; Granath Jr & Yoshino, 1983; Joky *et al.*, 1983; Martins-Souza *et al.*, 2006; Cavalcanti *et al.*, 2012). Pour aller plus loin dans la description de ces hémocytes, une attention toute particulière pour ces cellules sera portée dans la deuxième partie de cette thèse (Cf. Chapitre II). Cependant, une chose est sûre, c'est que ces hémocytes jouent un rôle extrêmement important dans l'élimination des pathogènes mais aussi un rôle primordial dans l'élimination de *S. mansoni* par l'action combinée, en primo infestation, d'une réponse cellulaire menant à une encapsulation du parasite et à la libération de facteurs humoraux détruisant le parasite (Li *et al.*, 2020).

## **2. Caractérisation de la primo réponse : du point de vue du parasite**

Immédiatement après avoir pénétré à travers le tégument de son hôte, le parasite va s'installer dans les tissus du mollusque, principalement au niveau du pied de l'animal, et va entamer une série de transformations complexes (Figure 2). De par la complexité d'observation de ces transformations *in vivo*, des expériences *in vitro* ont pu être réalisées et montrent que le miracidium commence, tout d'abord, à perdre les plaques ciliées qui lui permettaient de se mouvoir dans l'eau (Pan, 1996; Wu *et al.*, 2009). De façon concomitante, le miracidium commence sa transformation en sporocyste par la refonte de son syncytium tégumentaire (Samuelson & Caulfield, 1985; Pan, 1996), et c'est à ce moment précis que le parasite est le plus vulnérable aux attaques du système immunitaire du mollusque. Si le parasite n'est pas capable de déjouer les défenses de l'hôte, alors il peut être reconnu par le système immunitaire, encapsulé par les hémocytes et, en moins de 24h, éliminé (Pan, 1996). Afin de déjouer les défenses de l'hôte, plusieurs possibilités s'offrent alors au parasite, comme celle de mimer les protéines du mollusque sur son tégument par exemple, afin d'échapper à la détection du système immunitaire et d'éviter d'être reconnu par l'hôte (Figure 3B-C) (Yoshino & Bayne, 1983). Ou encore d'utiliser des molécules comme les « *S. mansoni* polymorphic mucins » ou SmPoMucs (Figure 3D-E), décrites comme extrêmement importantes dans l'explication du polymorphisme de compatibilité et de résistance de certains hôtes face au parasite décrit entre *B. glabrata* et *S. mansoni* (Gourbal *et al.*, 2015; Mitta *et al.*, 2017). Le parasite serait aussi capable de contrer la réponse immunitaire du mollusque, voire même de neutraliser/moduler la réponse de l'hôte et donc d'induire une immunosuppression, en libérant des facteurs (produits d'excrétion/sécrétion) dans l'hémolymphe du mollusque (Wu *et al.*, 2009). Parmi ces facteurs,

nous pouvons citer la protéine « venom allergen like » (SmVAL9) (Figure 3F) capable d'altérer la production de certaines metalloproteinases (BgMMP1) du mollusque et donc d'altérer la matrice extracellulaire et l'immunité de son hôte (Yoshino *et al.*, 2014). Le parasite peut aussi agir sur les hémocytes de l'hôte en synthétisant des produits d'excrétion/sécrétion (Figure 3G), ou encore des metalloproteases (SmLeish, Figure 3H). Ces molécules permettent au parasite d'échapper à l'encapsulation par les cellules immunitaires du mollusque et à sa destruction, notamment par des composés réactifs de l'oxygène produit par les hémocytes (Lodes & Yoshino, 1989). Il existe encore probablement une multitude d'autres exemples de facteurs produits par le parasite pour déjouer les défenses de l'hôte (Wu *et al.*, 2009), mais ce qui nous intéressera le plus est, au final, la réponse de l'hôte à cette intrusion.

### **3. Caractérisation de la primo réponse : du point de vue de l'hôte**

Avant de pouvoir déclencher une réponse immunitaire face au parasite, le mollusque doit être capable de détecter, de reconnaître le parasite. Nous avons vu précédemment que les invertébrés, comme *B. glabrata*, possédaient une panoplie de récepteurs (PRRs: Pathogen Recognition Receptors) capables de reconnaître spécifiquement certains composés de surface cellulaires des pathogènes ou des motifs moléculaires qui leurs sont spécifiques, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Parmi ces molécules de reconnaissance, nous pouvons citer les « Peptidoglycan recognition protein » (PGRP), qui peuvent être groupées en deux catégories : les formes longues et les formes courtes. Ce sont des molécules capables de reconnaître spécifiquement les peptidoglycanes, des parois cellulaires des bactéries retrouvées chez *Biomphalaria* (Deleury *et al.*, 2012; Coustau *et al.*, 2015), dont quatre transcrits (générés par épissage alternatif) de ces récepteurs ont pu être identifiés (Zhang *et al.*, 2007) : deux formes longues et une forme courte, ont été caractérisées comme possédant une activité amylase, ou autrement dit une activité de dégradation du peptidoglycane (Zhang *et al.*, 2007). Une autre molécule similaire a été montrée dans cette étude, une GGBP (« Gram-Negative Bacterial Binding Protein ») capable de reconnaître les motifs LPS (lipopolysaccharides) des bactéries Gram négatif notamment, et  $\beta$ -1,3-glucane des champignons, et de posséder une activité de glucanase. Ces deux types de molécules extracellulaires jouent probablement un rôle plus complexe encore, car elles sont définies comme étant capables d'activer d'autres récepteurs hémocytaires, comme par exemple une « toll-like receptor » (TLR), retrouvée chez *B. glabrata* (BgTLR), ainsi que certaines des voies de signalisation associées comme la voie IMD (« Immune-deficiency ») et aboutissant à l'induction de facteurs de transcription tels que

NF- $\kappa$ B (Zhang *et al.*, 2007; Emmanuel A. Pila, Tarrabain, *et al.*, 2016). Ces TLR ont initialement été décrites comme ayant un rôle dans la réponse immunitaire contre des bactéries, virus et champignons (Kawai & Akira, 2005). Ces études montrent que ces récepteurs jouent aussi un rôle contre les trématodes comme *S. mansoni*. Exprimée par une partie des hémocytes de *Biomphalaria*, l'inactivation du gène codant pour la BgTLR induit aussi une réduction de la phagocytose par ces cellules (Emmanuel A. Pila, Tarrabain, *et al.*, 2016).

Nous pouvons aussi retrouver une grande diversité de protéines de type lectines, capables de lier spécifiquement certains carbohydrates/glycanes. Ces lectines, chez *Biomphalaria*, regroupent par exemple les C-types lectines, les H-lectines ou encore les FREP (Fibrinogen-Related Protein) et des lectines dérivées des FREPs. Ces dernières présentent également un ou deux domaines IgSF associés à différents domaines C-terminaux appartenant aux lectine de type C et nommées C-type lectin-related proteins (CREPs) ou bien encore possédant un domaine galectine et nommées Galectin-Related Protein (GREP)) (Adema *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004; Dheilily *et al.*, 2015) (Figure 3A). Cette famille de molécules hypervariables (FREPs) est codée par une famille multigénique (Zhang, Nian, *et al.*, 2008) qui permet un grand nombre de modifications somatiques induisant une grande diversification de ces molécules à la base du principe de polymorphisme de compatibilité dans le couple *S. mansoni/B. glabrata* (Mitta *et al.*, 2012). En effet, il a été montré, par des approches de « knock-down », que certaines de ces FREP (ici la FREP3) jouaient un rôle important dans la capacité de résistance au parasite. De plus, d'autres expériences d'immuno-précipitation de ces molécules ont mis en évidence la capacité de certaines (ici la FREP2) à se lier spécifiquement à certains déterminants moléculaires des parasites, les SmPoMuc (Moné, Gourbal, *et al.*, 2010; Hanington *et al.*, 2012). Ces expériences ont aussi montré que nous pouvions retrouver d'autres molécules associées aux FREP, comme la TEP (Thioester Containing Protein) (Portet *et al.*, 2018 ; Duval *et al.*, 2020; Marquez *et al.*, 2022) ou encore une toxine probablement capable de former des pores dans les membranes, de la famille des «  $\beta$  pore forming toxin », la biomphalysine (Galinier *et al.*, 2013) Figure 3D.

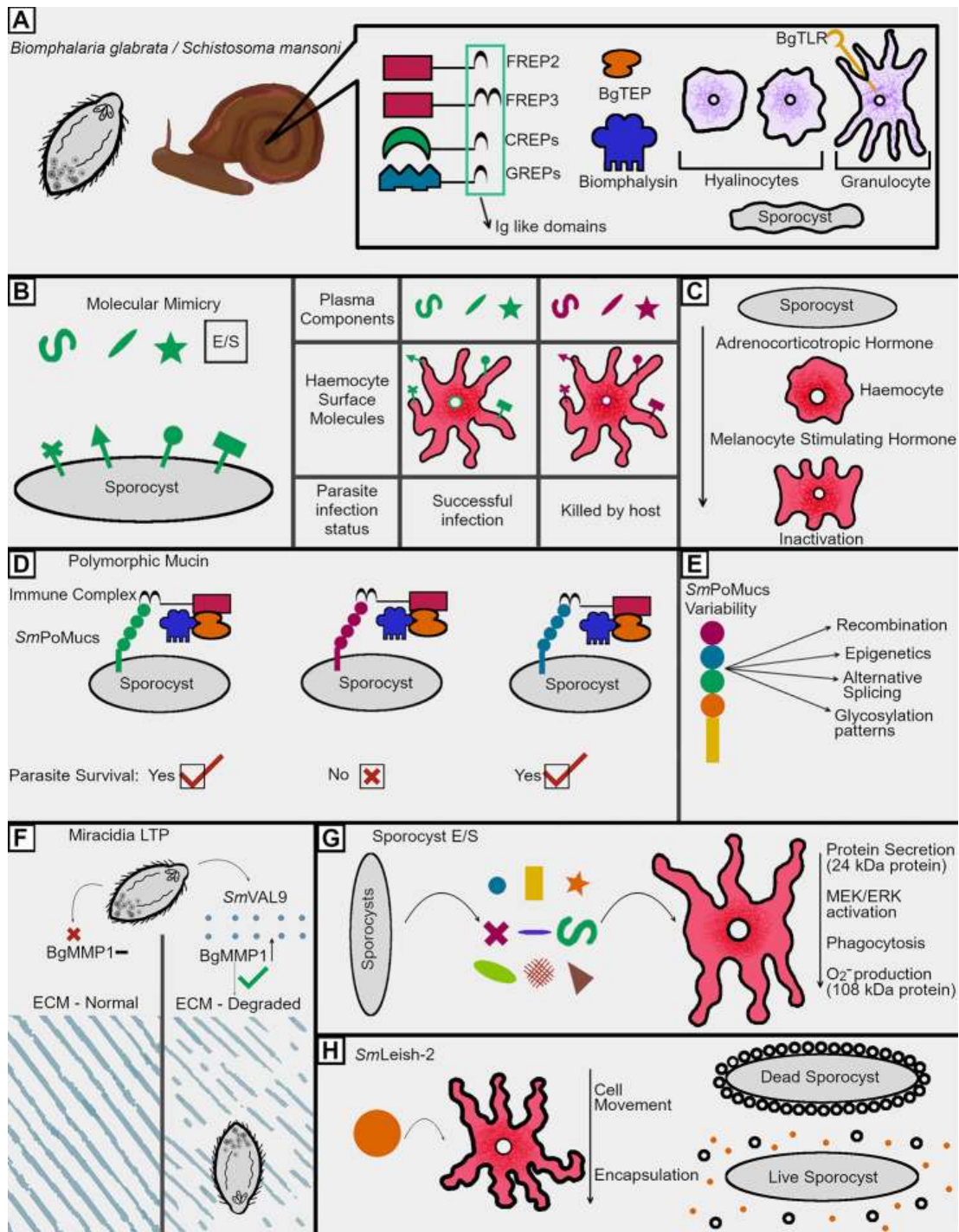


Figure 3: Représentation schématique des principales tactiques d'immunosuppression du parasite dirigés contre les différents mécanismes de l'immunité du mollusque. Schéma tiré de (Hambrook & Hanington, 2021).

#### 4. La réponse immunitaire de *Biomphalaria glabrata*

Lors d'une première rencontre avec le pathogène, trois phénotypes d'interaction immunobiologique ont été décrits (Figure 3). Si le parasite parvient à passer la barrière physique de l'épithélium du mollusque, il peut mettre en place, avec succès, un ou plusieurs des mécanismes que nous avons décrits plus haut, et donc être capable d'agir directement sur le



système immunitaire de l'hôte, ou bien encore leurrer ce système immunitaire. Le parasite sera alors invisible aux défenses de l'hôte et continuera son développement normalement. C'est ce qui a été défini comme étant une interaction hôte/parasite compatible (Mitta *et al.*, 2012).

Le parasite peut aussi être immédiatement reconnu par le système immunitaire de l'hôte, du fait des nombreuses molécules que nous avons décrites précédemment, et qui permettent au mollusque de reconnaître une large diversité de déterminants moléculaires spécifiques aux pathogènes. C'est ce que nous appellerons, dans ce cas, une interaction incompatible (Mitta *et al.*, 2012), qui produira les deux autres phénotypes d'interaction immunobiologique montrés en Figure 4 : la réponse dite cellulaire impliquant principalement les hémocytes et la réponse humorale produite en partie par les hémocytes et d'autres tissus/organes de l'organisme.

La première interaction (Figure 4) correspond donc à une réaction de l'organisme hôte favorisant une réponse immunitaire cellulaire. Les parasites, après avoir été reconnus par le système immunitaire, sont très rapidement entourés par les hémocytes. Ces derniers vont alors former une capsule autour du parasite (Souza *et al.*, 1997), capsule dans laquelle aucune étude n'a encore réussi à déterminer les populations hémocytaires directement impliquées. Cependant, dans cette capsule, le parasite sera éliminé, probablement grâce, entre autre, à des composés réactifs de l'oxygène (ROS) que les hémocytes produiront (Hahn *et al.*, 2000, 2001a, 2001b; Humphries & Yoshino, 2008; Moné *et al.*, 2011).

Le troisième phénotype d'interaction immunologique est médié par une réponse humorale capable de tuer le parasite après son entrée dans l'escargot (Pila *et al.*, 2017). Ce type de réponse est minoritaire lors d'une primo infestation par le parasite et pourrait impliquer divers facteurs humoraux de reconnaissance ou la capacité de tuer le parasite tels que des lectines (FREPs), divers PRR (TEP), des cathepsin mais aussi certaines toxines comme les biomphalysines (Hanington, Lun, *et al.*, 2010; Ittiprasert *et al.*, 2010; Moné, Gourbal, *et al.*, 2010; Lockyer *et al.*, 2012). Tous ces facteurs humoraux interviennent en même temps que la réponse cellulaire et sont, pour la plupart, produits par les hémocytes de l'hôte.

Finalement, ces trois interactions immunobiologiques peuvent se produire à la suite de la primo infestation et la réponse cellulaire d'encapsulation reste la réponse majoritairement observée chez le mollusque afin d'éliminer le parasite. Alors que lorsque l'on ré-infeste ce mollusque, la réaction de ce dernier est complètement différente de ce qui se passe en primo infestation.

## 5. La caractérisation phénoménologique du priming chez *B. glabrata*

Il a récemment été démontré que l'escargot *B. glabrata* était capable de mémoire immunologique. Mais les premières observations de priming immunitaire chez *Biomphalaria* remontent à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle avec les travaux de Sire *et al.* en 1998. Jusqu'alors, aucune expérience n'avait réussi à montrer phénotypiquement une quelconque acquisition de résistance à *S. mansoni*. Celle-ci se caractérise notamment par une acquisition progressive de la résistance entre 3 et 7 jours suivant la première infestation par *S. mansoni* et, passé ce délai, une acquisition d'une résistance totale à une seconde infestation par le même parasite qui se maintient tout au long de la vie de l'animal. Ces premières recherches ont cependant associé cette acquisition de résistance à une compétition intra-molluscale entre les parasites déjà implantés dans l'escargot, suite à la première infestation, et les parasites issus de la ré-infestation (Sire *et al.*, 1998). Cependant, cette hypothèse s'est trouvée remise en question par les travaux qui ont suivi sur ce sujet et qui montrent, par des approches de vaccination du mollusque avec des extraits de miracidium broyés, que les escargots sont capables d'induire une protection partielle à la suite d'une seconde infestation (que nous appelons challenge) parasitaire (Portela *et al.*, 2013). Cette étude a aussi émis l'hypothèse d'un lien fort entre la mise en place du priming immunitaire à la suite de la primo infestation, et le développement intra-molluscal du parasite. Elle a aussi montré une grande spécificité de ce priming immunitaire, par l'utilisation de challenges homologues ou hétérologues, et en démontrant que la protection acquise décroît, à mesure que la distance génétique entre le parasite utilisé lors de la première infestation et le parasite utilisé lors de la seconde, augmente (Portela *et al.*, 2013). De plus, alors que la réponse immunitaire observée à la suite de la primo infestation est principalement cellulaire, et implique l'action directe des hémocytes par la création d'une capsule hémocytaire autour du parasite, la réponse immunitaire suite au challenge est exclusivement humorale (Sire *et al.*, 1998; Portela *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2016). En effet, le parasite dégénère dans les tissus de l'hôte sans qu'il y ait de contacts observables entre les parasites et les hémocytes avec une protection pouvant atteindre 100% (Figure 4). Le caractère humoral de cette réponse a ensuite été montré par approches de transfert de plasma provenant de mollusques « primés », autrement dit primo infestés par *S. mansoni*, à des mollusques dits naïfs (n'ayant jamais rencontré le pathogène). Ces transferts de plasma ont alors permis de faire baisser significativement la prévalence de l'infestation chez ces mollusques naïfs, ce qui a permis de démontrer qu'il existait des composés humoraux circulant dans le plasma des individus « primés/challengés » capables de tuer le parasite (Pinaud *et al.*, 2016).

Cette réponse de mémoire immunitaire innée (MII) basée sur une réponse de type humoral est totalement nouvelle chez les invertébrés. Il est donc crucial de s'intéresser plus précisément aux mécanismes moléculaires qui sont à la base des phénomènes observés, pour ensuite caractériser les molécules impliquées dans cette réponse humorale et dans l'élimination du parasite.

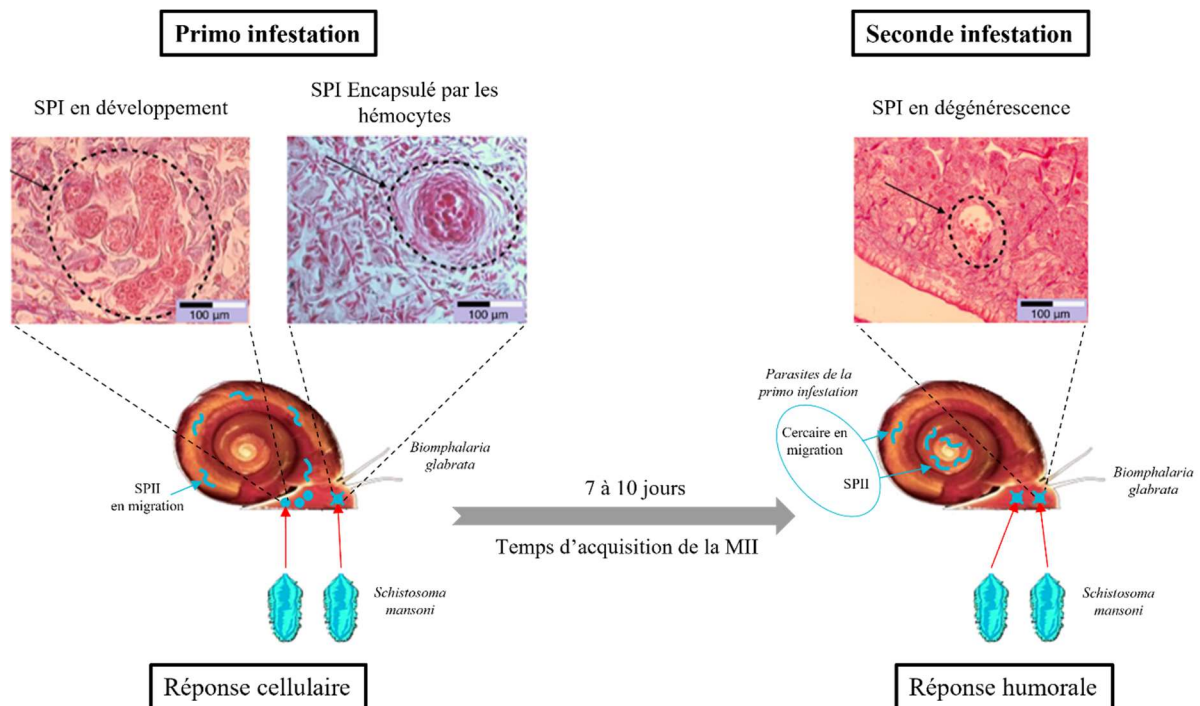


Figure 4: Représentation schématique de l'acquisition d'un phénotype de mémoire immunitaire innée (MII) par *B. glabrata*. Photos tirées de (Pinaud et al., 2016).

## 6. La réponse de seconde infestation et les premières données « omiques »

Ce n'est que très récemment que des études ont tenté de décrire les différents processus moléculaires induits à la suite d'un challenge du mollusque, en utilisant des approches de séquençage massif des ARN sur mollusque entier couplé à une analyse globale du protéome du plasma (Pinaud *et al.*, 2016). Cette étude, portée par le laboratoire IHPE, a pu mettre en évidence, pour la première fois dans ce modèle, un processus de régulation de l'expression des gènes inattendu.

Jusqu'à présent, dans la littérature, deux principaux processus de régulation de l'expression génique ont été décrits (Figure 5) pour expliquer l'acquisition de la mémoire immunitaire (Coustau *et al.*, 2016). Le premier processus nommé « sustain response » ou réponse maintenue (Figure 5A), correspond à une réponse transcriptionnelle qui perdure tout

au long de la vie de l'animal, après avoir été déclenchée par une stimulation initiale, une primo infestation dans notre cas, avec un pathogène. Cette réponse a été récemment observée chez les huîtres (Lafont *et al.*, 2020), et permet une meilleure protection contre les virus par l'utilisation d'une molécule mimant un agent viral (Poly(I :C)) (Green & Montagnani, 2013; Lafont *et al.*, 2017). Chez *B. glabrata*, nous pouvons retrouver ce type de réponse maintenue (Coustau *et al.*, 2016; Pinaud *et al.*, 2016) pour certains gènes induits lors d'une cinétique d'infestation et de réinfestation par *S. mansoni*. Parmi ces gènes, nous pouvons retrouver plusieurs PRR, des molécules de reconnaissance comme les FREPs, ou les C-type lectines (Pinaud *et al.*, 2016).

Le second processus, appelé réponse de type « recalled response » ou réponse rappelée (Figure 5B), correspond à la surexpression de gènes immunitaires à la suite d'une première infestation. Ces gènes retrouvent alors, au cours du temps, une expression basale, et ces mêmes gènes sont alors rappelés, réactivés plus rapidement lors de la seconde rencontre avec le pathogène, avec parfois une expression plus importante, permettant de lutter contre le pathogène (Coustau *et al.*, 2016). Ce type de réponse commence à être décrit dans plusieurs modèles (Zhang *et al.*, 2014; Torre *et al.*, 2017), comme chez l'amphioxus par exemple qui, en réponse à une deuxième rencontre avec des bactéries de même type (gram négatif ou gram positif), est capable de répondre plus rapidement à l'infection en exprimant des gènes connus comme étant impliqués dans la voie alternative du complément, et donc dans la réponse immunitaire (Wang *et al.*, 2009). Ce type de réponse mémoire n'a cependant pas été retrouvé, ou très succinctement, dans les premières analyses de transcriptomique sur le mollusque entier dans le modèle *B. glabrata* / *S. mansoni* (Pinaud *et al.*, 2016).

Cependant, chez *B. glabrata*, un troisième processus appelé "immune shift" ou basculement immunitaire (Figure 5C) a été caractérisé grâce aux analyses transcriptomiques sur le mollusque entier. Ce type de réponse est totalement nouveau dans la littérature et se définit, dans un premier temps, par un basculement de la réponse majoritairement cellulaire à la suite de la primo infestation, vers une réponse accrue et spécifique à la suite du challenge, mais cette fois-ci exclusivement humorale. Ce qui se traduit, au niveau transcriptomique, par la surexpression d'un sous-ensemble de gènes immunitaires en réponse à la primo infestation. Ces gènes reviennent à un état basal d'expression, et lorsque survient le challenge avec la même souche de parasite, ce sont de nouveaux gènes, différents de ceux impliqués dans la primo réponse, qui se retrouvent surexprimés pour tuer le parasite (Pinaud *et al.*, 2016). Parmi les gènes induits à la suite du challenge, les auteurs ont retrouvé diverses molécules de reconnaissance que nous avons déjà citées, comme des FREP, des récepteurs mannose de

macrophage, des C-type lectines et des protéines antimicrobiennes LBP/BPI. Les auteurs ont également mis en évidence la présence de transcrits codants pour la biomphalysine. Cette protéine appartient à la famille des «  $\beta$ -pore forming toxins » ( $\beta$ -PFT) capables de former des pores transmembranaires dans les téguments des parasites, dans le cas de *B. glabrata*, qui entraînent ainsi la mort du parasite *schistosoma* (Galinié *et al.*, 2013). Ces biomphalysines sont surexprimées tôt après le challenge, sécrétées dans l'hémolymphe de l'escargot, probablement par des cellules entraînées à la suite de la primo infestation, et seraient donc d'excellents candidats pour expliquer la réponse humorale suite au challenge (Pinaud *et al.*, 2016, 2019).

Bien qu'à ce jour d'énormes progrès ont été réalisés pour décrypter les bases moléculaires de la réponse immunitaire mémoire de *B. glabrata*, toutes les expériences se sont focalisées soit sur des évidences phénoménologiques, soit sur des analyses transcriptomiques mais seulement sur mollusque entier. Nous ne connaissons toujours pas les cellules ou organes capables de porter cette mémoire immunitaire, et donc nous ne connaissons toujours pas les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'acquisition de cette mémoire immunitaire et de son expression.

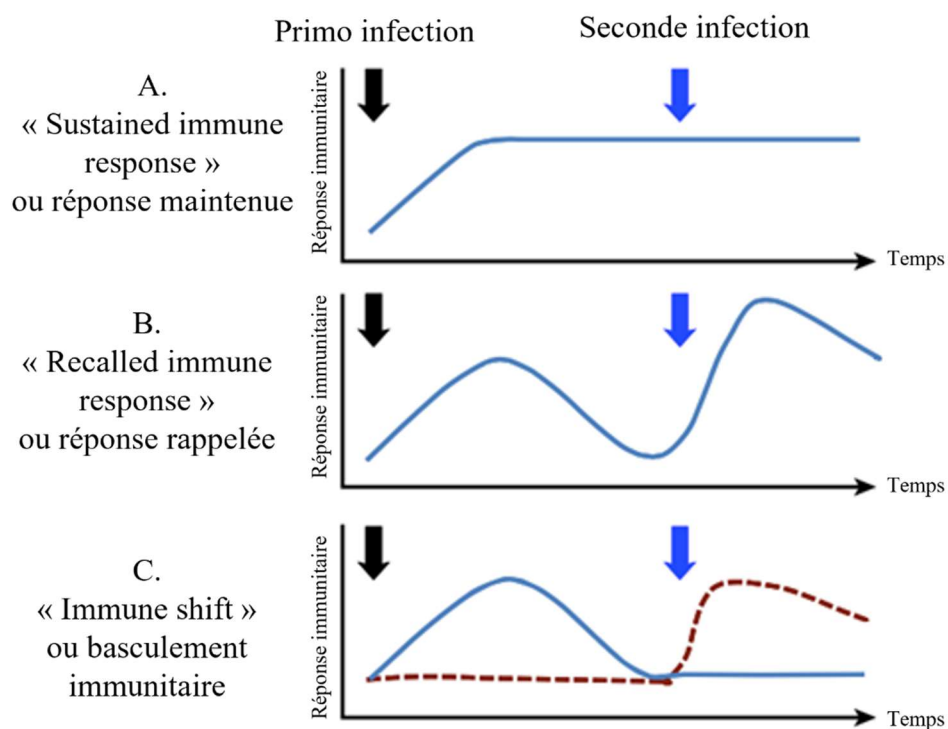


Figure 5: Représentation schématique des différentes réponses de mémoire immunitaire innée chez les invertébrés. Schéma modifié de (Coustau *et al.*, 2016).

## 7. *Le rôle des hémocytes dans cette réponse immunitaire innée*

Chez les vertébrés, nous savons qu'à la suite d'une rencontre avec un pathogène, les cellules de l'immunité comme les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques ou encore les cellules NK se retrouvent être entraînées et prêtes à répondre à une nouvelle rencontre avec un pathogène. Ces cellules subissent alors de profonds changements épigénétiques et métaboliques, permettant un maintien sur le long terme de cette mémoire du système immunitaire inné (Dominguez-Andres & Netea, 2019). Tous ces mécanismes sont aujourd'hui de mieux en mieux décrits, et nous connaissons même les cellules qui portent cette « trained immunity » chez les vertébrés. Mais ce n'est pas du tout le cas dans les modèles invertébrés comme *B. glabrata*. En effet, la plupart des études qui traitent du priming chez ce mollusque n'ont décrit que des phénotypes de mémoire immunitaire (Sire *et al.*, 1998; Portela *et al.*, 2013), ou bien ne se sont intéressées qu'à la réponse globale du mollusque face au parasite (Pinaud *et al.*, 2016). Or aujourd'hui, nous ne connaissons toujours pas les cellules ou organes capables de porter cette MII.

Si nous regardons un peu plus globalement cette réponse de « priming » chez les invertébrés, il semble que les hémocytes jouent un rôle très important dans la réponse de « priming », notamment chez les insectes (Cooper & Eleftherianos, 2017), comme chez le moustique, *Anopheles gambiae*, où la différenciation des hémocytes permet à l'organisme d'acquérir une MII. En réponse à une infestation par *Plasmodium*, une réponse mémoire se met en place, et est caractérisée par une augmentation de l'abondance de certains types d'hémocytes, les granulocytes (Rodrigues *et al.*, 2010). Chez certains mollusques comme *Crassostrea gigas*, les hémocytes sont au cœur de la réponse de mémoire immunitaire, avec l'augmentation du nombre d'hémocytes, leur rapide régénération et l'augmentation de leur capacité de phagocytose, en réponse à *Vibrio splendidus* (Zhang *et al.*, 2014). Enfin, l'importance des hémocytes peut aussi se transmettre entre les générations, comme chez l'abeille, *Apis mellifera*, qui voit la descendance issue de parents « primed », produire trois fois plus d'hémocytes différenciés que la descendance issue de parents non « primed » (Hernández López *et al.*, 2014). Nous pourrions alors imaginer que ces cellules de l'immunité des invertébrés, que nous avons montrées être responsables d'une forme de réponse mémoire chez certaines espèces, pourraient être finalement le support de la mémoire immunitaire innée (Gourbal *et al.*, 2018). Chez *Biomphalaria*, les hémocytes sont capables de tuer le parasite, lors d'une première rencontre avec ce dernier, par une réaction d'encapsulation et de libération de composés réactifs de l'oxygène notamment (Figure 6). Nous savons également que ces

hémocytes sont aptes à produire d'autres composés humoraux (Figure 6), que nous pouvons retrouver dans l'hémolymphe de l'animal (Castillo *et al.*, 2020), comme par exemple la biomphalysine. Cette dernière a la capacité de tuer le parasite, et se retrouve différenciellement exprimée à la suite d'une deuxième rencontre avec le parasite. Les hémocytes sont, probablement, les premiers acteurs immunitaires lors de la primo infestation par *S. mansoni* et à capter le signal de cette infestation. Ils sont aussi capables de produire des composés humoraux qui pourraient jouer un rôle dans la protection du mollusque face à un challenge.

Et pour finir, des études portant sur l'organe hématopoïétique du mollusque ont montré que cet organe, suite à une transplantation depuis des individus dits résistants vers des individus dits sensibles, permettrait l'acquisition d'une protection immunitaire accrue, et donc d'une résistance à l'infestation (Sullivan & Spence, 1994; Barbosa *et al.*, 2006). Ainsi, un faisceau de preuves nous guide vers les hémocytes comme étant probablement l'un des supports de la mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata*, et c'est pourquoi cette thèse portera une attention toute particulière au rôle des hémocytes dans la MII, dans le but de décrire les mécanismes d'acquisition et le support moléculaire et cellulaire de cette mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata*.

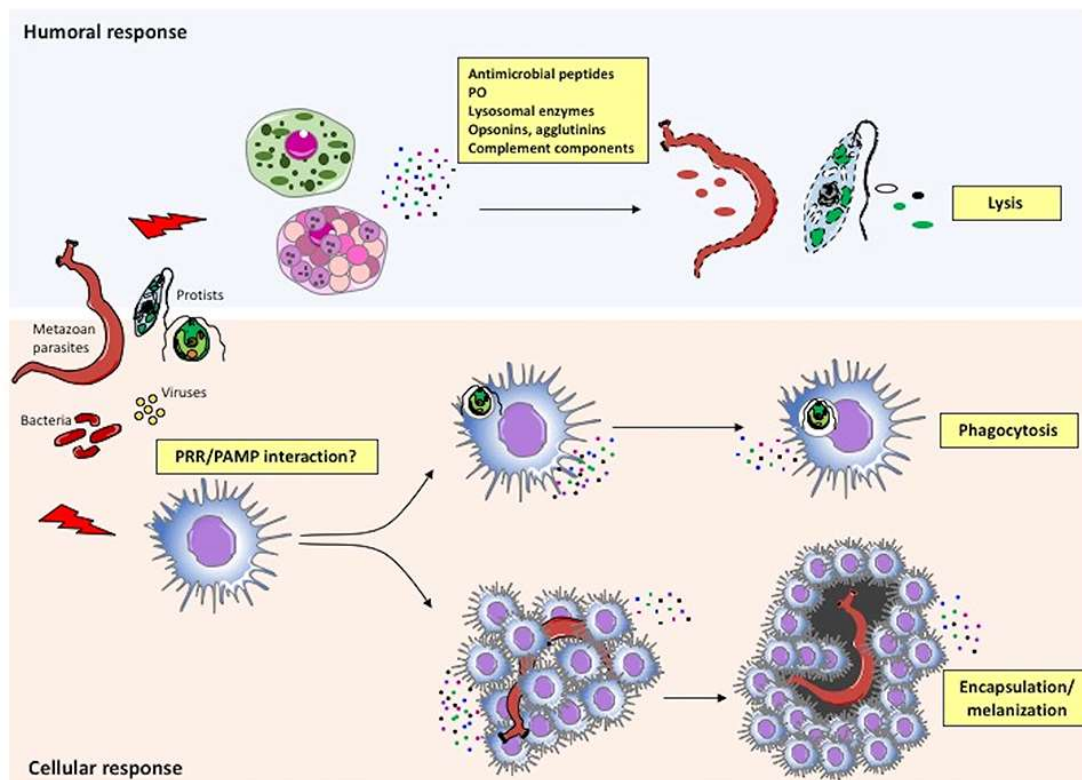


Figure 6: Représentation schématique de la réponse immunitaire chez les invertébrés ainsi que les réponses d'encapsulation et de phagocytose des hémocytes en réponse au pathogène (réponse cellulaire), et dans le même temps la libération dans l'hémolymphe, par les hémocytes ou d'autres cellules, de composés capables de tuer les pathogènes (réponse humorale). Schéma tiré de (Melillo *et al.*, 2018).

### **C. *La mémoire immunitaire innée : mise en lumière de son support cellulaire, de sa régulation, et des mécanismes moléculaires sous-jacents***

Cette thèse s'intéressera en premier lieu à caractériser les cellules ayant la capacité de porter la mémoire immunitaire. Nous chercherons alors à répondre en partie à la question suivante : quelles sont les cellules ou organes capables d'enregistrer, de stocker et d'exprimer au bon moment la mémoire immunitaire innée chez *Biomphalaria* ? Pour répondre à cette question, nous avons fait le choix de diriger nos recherches sur les hémocytes, et cela correspond au premier chapitre de cette thèse. Comme nous l'avons démontré à plusieurs reprises dans cette introduction, ces cellules représentent les meilleures candidates. Nous pourrions nous y intéresser, du fait de leur intérêt dans d'autres modèles invertébrés, tout comme dans la réponse immunitaire de *Biomphalaria*, mais également du fait du parallèle qui peut être fait avec la « trained immunity » chez les vertébrés et l'importance que les cellules immunitaires du système inné jouent dans le support de cette mémoire immunologique. Ensuite, afin de décrire plus précisément les mécanismes moléculaires qui permettent l'acquisition de cette mémoire, nous avons fait le choix de nous tourner vers les nouvelles techniques moléculaires que l'on dit « omiques ». Ces techniques peuvent prendre en compte l'entièreté de la réponse de ces hémocytes au niveau des modifications de l'ADN (épigénomique), de l'expression des gènes (transcriptomiques), mais aussi de la production de composés métaboliques (métabolomiques) définis dans d'autres modèles (vertébrés et invertébrés) comme jouant un rôle important dans la MII. Cela permettra aussi de montrer un possible lien évolutif entre les mécanismes de mémoire immunologique, observés chez les vertébrés dans le cadre de la « trained immunity », et les mécanismes d'acquisition de la mémoire chez les invertébrés, et plus particulièrement *B. glabrata*. Toutes ces analyses nous ont alors menés vers la nécessité de déterminer les différentes populations hémocytaires présentes chez *Biomphalaria*, et de caractériser le plus finement possible, le rôle de chacune d'elles dans la réponse mémoire du système immunitaire inné de l'escargot. Ceci correspond au second chapitre de cette thèse qui me permettra de donner les premières réponses, quant à la question de savoir quelles sont les populations hémocytaires ayant la capacité de porter la mémoire immunitaire innée chez *Biomphalaria*. Enfin, le troisième et dernier chapitre de cette thèse abordera la question des premiers outils et méthodes que j'estime nécessaires, afin de valider les mécanismes décrits dans le premier chapitre, ainsi que le rôle des hémocytes dans la réponse mémoire du système immunitaire inné chez *B. glabrata*.





**Chapitre I :**  
**La réponse immunitaire mémoire des hémocytes**



Photo précédente : Photos de mollusque *B. glabrata* sous loupe binoculaire

## A. Introduction sur la mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata*

Cette première partie de thèse a pour objectif de donner des éléments de réponses quant à l'implication des cellules de l'immunité de *Biomphalaria*, les hémocytes, dans le processus d'acquisition de la mémoire immunitaire contre *S. mansoni*. Nous serons alors en mesure de mieux comprendre comment, par l'intermédiaire des hémocytes entre autres, *B. glabrata* est capable d'enregistrer, de stocker et d'activer à bon escient la mémoire immunitaire innée.

Comme nous avons pu le décrire en introduction, l'acquisition de la MII chez *B. glabrata* est le résultat d'un enchaînement de mécanismes très particuliers, principalement décrits par diverses approches phénoménologiques qui ont montré une meilleure résistance à une réinfestation par *S. mansoni* (Sire *et al.*, 1998). Mais aussi à la suite de vaccination avec des molécules de parasite (Portela *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2019) ou encore par des approches moléculaires et transcriptomiques qui ont permis une meilleure caractérisation du phénomène (Pinaud *et al.*, 2016). La mémoire immunitaire innée chez *Biomphalaria* se caractérise alors par un shift phénotypique passant d'une réponse principalement cellulaire impliquant directement et physiquement les hémocytes (encapsulation, phagocytose, etc.) à la suite de la primo infestation par *S. mansoni*, à une réponse exclusivement humorale déclenchée par la seconde (challenge) infestation (Figure 4, cf. introduction §II.e.). Ce shift phénotypique serait alors concomitant à un autre shift, cette fois-ci transcriptomique (Figure 5, cf. introduction §II.f.), permettant une réponse immunitaire extrêmement spécifique lors de nouvelles rencontres avec le parasite. Cet « immune shift » ou shift immunitaire comme il a été appelé (Coustau *et al.*, 2016; Pinaud *et al.*, 2016) n'est cependant pas immédiat, et met entre 7 à 10 jours pour se mettre totalement en place (Sire *et al.*, 1998; Portela *et al.*, 2013). Ce délai entre la primo infestation et l'acquisition complète de la mémoire immunitaire suggère l'existence d'autres mécanismes, probablement plus complexes, qui pourraient expliquer à la fois ce temps d'apprentissage du système immunitaire, mais aussi sa capacité à répondre rapidement et efficacement à une deuxième rencontre avec le parasite. Mais alors quels sont ces mécanismes ? Quelles sont les cellules capables de porter ce shift immunitaire, ou autrement dit la mémoire du système immunitaire inné chez *B. glabrata* ?

Pour répondre à ces questions, nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés aux études portées sur les autres organismes invertébrés, mais peu de mécanismes d'acquisition de la mémoire immunologique y sont décrits. Cependant, la plupart des études sur la drosophile, l'huître ou encore sur le moustique pour ne citer que ces exemples, comme nous l'avons vu en introduction, montrent l'importance des cellules immunitaires, les hémocytes, dans la réponse

immunitaire mémoire de ces organismes (Zhang *et al.*, 2014; Weavers *et al.*, 2016; Sheehan *et al.*, 2020). Ainsi, les hémocytes pourraient être une piste intéressante également dans notre modèle d'étude, d'autant plus qu'un nombre toujours plus important d'études sur les organismes vertébrés (Cf introduction §I.c.) démontrent le rôle primordial des cellules de l'immunité innée, comme par exemple les monocytes (macrophages et cellules dendritiques) et les cellules NK dans l'expression de la « trained immunity » (Netea *et al.*, 2011). De plus aujourd'hui, ces études ont réussi à décrire très précisément les divers mécanismes à la base de l'acquisition de ce processus de mémoire immunitaire (Figure 1, cf. introduction §I.C.). L'immunité entraînée des vertébrés est décrite comme « une caractéristique de mémoire des cellules de l'immunité innée, médiée par des changements épigénétiques uniques et des reprogrammations métaboliques ». La mémoire est maintenue dans le temps grâce aux organes hématopoïétiques myéloïdes qui engendrent ces cellules immunitaires (Tercan *et al.*, 2021).

### ***1. L'épigénétique pour se souvenir***

Les premières études sur la mise en place de la mémoire immunitaire entraînée ont donc porté sur les cellules myéloïdes matures comme les macrophages (Netea *et al.*, 2020). Ces cellules, après une première rencontre avec un pathogène, changent radicalement et se retrouvent donc entraînées, et activent très rapidement la transcription de gènes immunitaires nécessaires à la réponse lors d'une seconde rencontre avec le pathogène (Netea *et al.*, 2020). Ces recherches ont mis en évidence que cette réponse transcriptomique était corrélée à plusieurs modifications épigénétiques, comme des modifications de la chromatine au niveau de régions promotrices des gènes (Figure 7) qui se retrouvent exprimées lorsque ces cellules sont stimulées par une nouvelle rencontre avec le pathogène (Quintin *et al.*, 2012). Ces changements chromatiniens passent par la tri-méthylation (H3K4m3), ou encore l'acétylation des histones (H3K27ac), qui ont été montrées dans les modèles vertébrés comme un signe d'ouverture de la chromatine, permettant une meilleure accessibilité des gènes et donc de leur transcription (Saeed *et al.*, 2014). D'autres marques ont aussi été étudiées, comme la tri-méthylation de l'histone 3 en position lysine 9 et lysine 27 (H3K9me3 et H3K27me3) qui se trouvent être deux marques, cette fois-ci, de fermeture de la chromatine et donc pouvant agir comme des marques de répression de l'expression de certains gènes (Bekkering *et al.*, 2021). Ces différentes modifications épigénétiques pourraient alors être contrôlées par l'action de long ARN non codant (lncRNA) (Figure 7) (Fanucchi *et al.*, 2021). D'autres modifications épigénétiques peuvent aussi jouer un rôle dans l'acquisition de la « trained immunity », comme la méthylation

de l'ADN. Cependant, les études sur le sujet sont encore très préliminaires et montrent seulement des changements stables de la méthylation de l'ADN, dans un contexte de tolérance immunitaire dans des cellules stimulées avec des (lipopolysaccharides) LPS, mais pas encore dans un contexte d'immunité entraînée (Novakovic *et al.*, 2016).

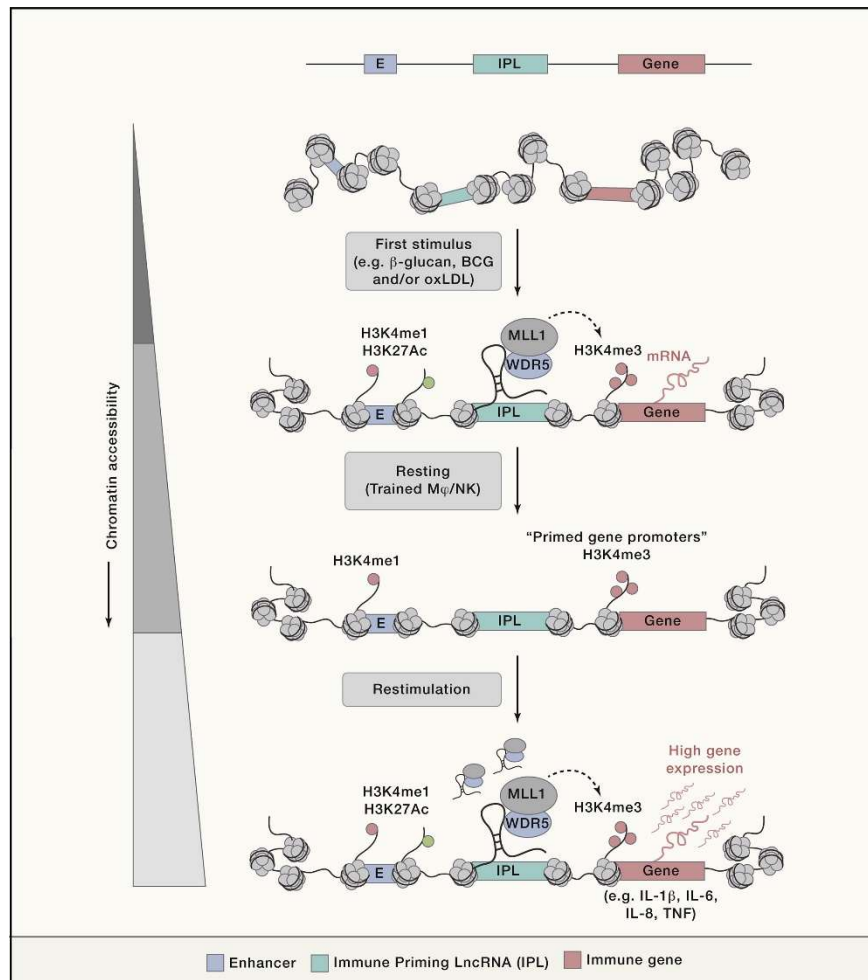


Figure 7: Représentation schématique montrant les possibles mécanismes et molécules responsables des changements épigénétiques au niveau de gènes impliqués dans la réponse de mémoire immunitaire innée, caractérisé chez des organismes vertébrés. Schéma tiré de (Fanucchi *et al.*, 2021).

## 2. Le métabolisme pour apprendre à se souvenir

De façon surprenante, dans l'acquisition de cette mémoire entraînée, c'est l'induction de voies métaboliques cellulaires ciblées qui vont être primordiales. Dans les cellules immunitaires des vertébrés, comme dans toutes les autres, le métabolisme joue un rôle crucial dans la production d'énergie, notamment par la production d'ATP, mais il supporte aussi certains mécanismes de prolifération, de production de ROS/NOS, ou encore la production de cytokines (O'Neill *et al.*, 2016). En ce qui concerne l'acquisition de la mémoire entraînée, le métabolisme est un élément clé de cette réponse immunitaire, car certaines voies métaboliques

peuvent être activées, et ces dernières permettent les changements et le maintien des modifications épigénétiques (Figure 8) que nous avons vus précédemment (Keating & El-Osta, 2015). Ces voies métaboliques, comme la voie de la glycolyse, de la phosphorylation oxydative, du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et du métabolisme des lipides, de la glutamine, de la synthèse du cholestérol ou encore de la voie itaconate, produisent des métabolites intermédiaires agissant comme substrats ou encore cofacteurs (activateur ou répresseur) d'enzymes impliquées dans les changements épigénétiques (Cheng *et al.*, 2014; Arts, Joosten, *et al.*, 2016; Arts, Novakovic, *et al.*, 2016; Domínguez-Andrés, Novakovic, *et al.*, 2019; O'Neill & Artyomov, 2019). Une étude portant sur l'induction de la mémoire immunitaire innée chez des monocytes, par l'utilisation de  $\beta$ -glucane, montre l'induction transcriptomique de certaines voies métaboliques dès 24h suivant l'exposition au  $\beta$ -glucane, et un métabolome complètement différent des contrôles non traités dès 6 jours suivant l'exposition (Arts, Carvalho, *et al.*, 2016). L'une des voies métaboliques les plus importantes, caractérisée dans cette immunité entraînée, est la voie de la glycolyse. Le revirement de la production d'énergie par les cellules, principalement portée par la voie de la Phosphorylation Oxydative (OxPhos) en condition normale, vers la voie de la glycolyse aérobie en condition stimulée, est un marqueur de l'activation des monocytes (Arts, Carvalho, *et al.*, 2016). La production d'énergie par la voie de la glycolyse est moins efficace que l'OxPhos, cependant, les intermédiaires produits par cette voie ont été définis en premier lieu dans les cellules cancéreuses comme permettant la prolifération de ces cellules (Warburg, 1956). Cette réaction, appelée : effet Warburg du nom du chercheur qui l'a décrite pour la première fois, se retrouve donc aussi dans les cellules entraînées comme les macrophages et les cellules dendritiques (Cheng *et al.*, 2014; Arts, Carvalho, *et al.*, 2016; Keating *et al.*, 2020). Grâce à ce revirement de la production d'énergie, les cellules sont capables d'induire et de moduler plus facilement une production d'énergie nécessaire à la réponse inflammatoire. Mais aussi, ce revirement engendre la production de métabolites nécessaires à l'activation d'autres voies métaboliques telles que la voie des pentoses phosphates (PPP) permettant la synthèse de riboses nécessaires à la production des nucléotides. Ce revirement est aussi nécessaire à l'accumulation de métabolites indispensables, comme le fumarate par exemple, aux changements épigénétiques énoncés plus haut (O'Neill *et al.*, 2016). Tous ces changements sont aujourd'hui bien documentés, font l'objet de plusieurs revues de la littérature et peuvent être résumés par la Figure 8 (Saeed *et al.*, 2014; Keating & El-Osta, 2015; Arts, Novakovic, *et al.*, 2016; Domínguez-Andrés, Joosten, *et al.*, 2019; Riksen & Netea, 2020; Bekkering *et al.*, 2021; Fanucchi *et al.*, 2021).

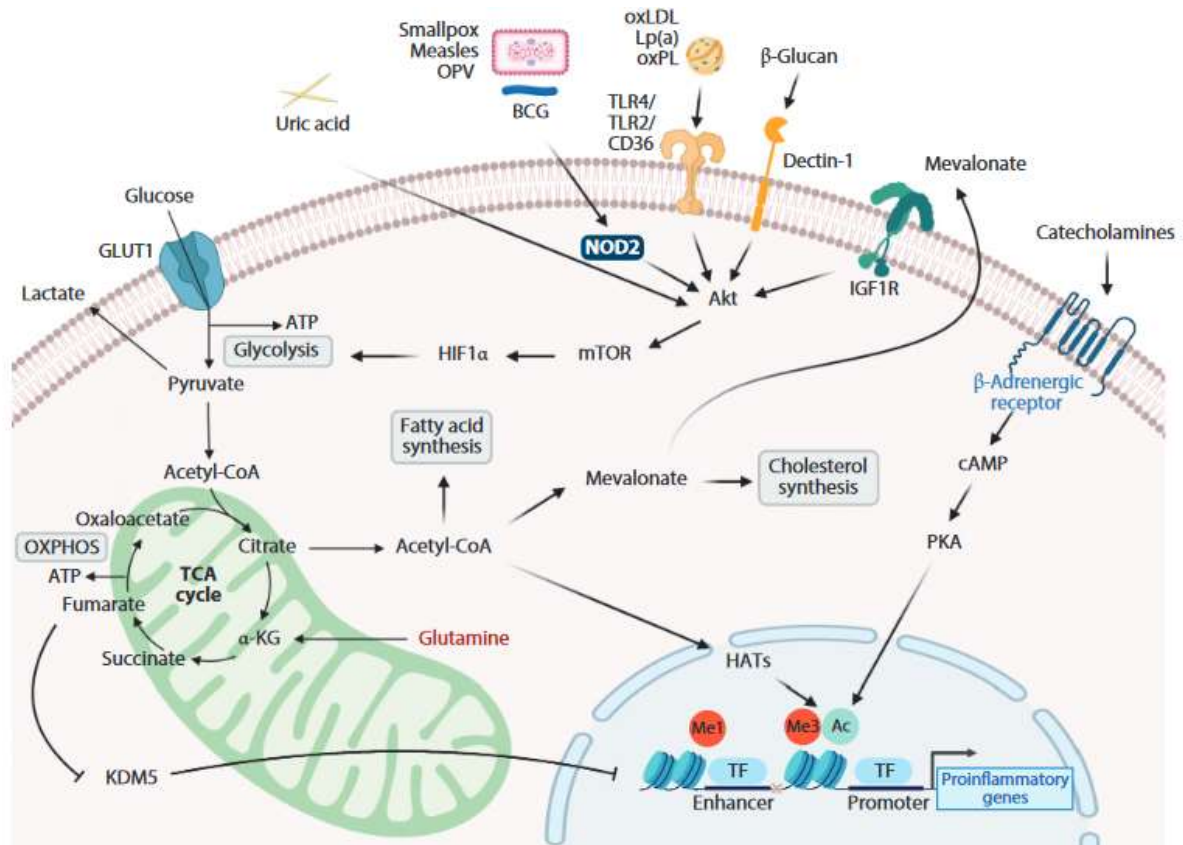


Figure 8: Représentation schématique des mécanismes moléculaires de l'immunité entraînée. En fonction des stimuli utilisés ( $\beta$ -glucane, sucres, etc.), des voies de signalisation particulières (Akt-HIF1 $\alpha$ -mTOR par exemple) sont activées et induisent des modifications de différentes voies métaboliques (glycolyse, cycle du TCA, etc.) de la cellule pour finalement permettre la modification épigénétique (méthylation et acétylation d'histones, etc.) de gènes caractéristiques de la réponse inflammatoire de cellules entraînées (production d'interleukines, etc.). Schema et légende tirés de (Bekkering et al., 2021). Abbreviations: Ac, acétylation;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -ketoglutarate; BCG, bacillus Calmette-Guérin; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; GLUT1, glucose transporter 1; HAT, histone acetyl transferase; HIF1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor 1 alpha; IGF1R, insulin-like growth factor 1 receptor; KDM5, lysin-specific demethylase 5; Lp(a), lipoprotein(a); Me1 and Me3, monomethylation and trimethylation; mTOR, mammalian target of rapamycin; NOD2, nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2; OPV, oral polio vaccine; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein; OXPHOS, oxidative phosphorylation; oxPL, oxidized phospholipid; PKA, protein kinase A; TCA, tricarboxylic acid; TF, transcription factor; TLR, Toll-like receptor.

### 3. Les mécanismes de la mémoire immunitaire innée des invertébrés

Tout comme dit précédemment pour les organismes invertébrés, les mécanismes permettant l'acquisition et le maintien de cette mémoire immunitaire innée ne sont pas ou peu connus, et peu d'études existent pour l'instant dans ce domaine (Gourbal *et al.*, 2018; Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2022). Les recherches se sont pour l'instant consacrées à définir phénotypiquement la réponse mémoire ou « priming » immunitaire des invertébrés, ou bien à caractériser certaines molécules hypervariables ayant un rôle très important dans la reconnaissance des pathogènes, et donc dans l'activation de la MII, comme nous avons pu le voir dans l'introduction générale. Cependant, les mécanismes moléculaires, tels que nous



pouvons les connaître chez les vertébrés, sont encore inconnus chez les invertébrés. Ces potentiels mécanismes ont été récemment relevés ou supposés dans différents travaux de recherche. Les travaux de (Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2022) par exemple, mettent en avant la possible intégration dans le génome de l'hôte, de matériel génétique de virus permettant aux cellules de l'immunité de produire une réponse basée sur de l'ARN interférence. Ce type de mécanisme est montré dans les hémocytes de la drosophile, en réponse à une infection par le virus *Sindbis* (SINV) (Tassetto *et al.*, 2017). L'hypothèse d'endoreplication est aussi avancée. Elle consiste, pour les cellules, à augmenter leur quantité d'ADN sans utiliser la division cellulaire (Zielke *et al.*, 2013; Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2022). Ce mécanisme cellulaire pourrait alors permettre la multiplication de gènes immunitaires dirigés contre certains pathogènes, permettant ainsi de garder une sorte de mémoire du premier stimulus, en donnant la possibilité à ces cellules de répondre plus efficacement et plus rapidement à une rencontre ultérieure avec le même pathogène.

Nous porterons toutefois une attention toute particulière sur le dernier mécanisme proposé, à savoir le support épigénétique de la MII. Nous avons pu voir que chez les modèles vertébrés, les changements épigénétiques, et notamment le réarrangement de la chromatine, étaient à la base des mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée. Mais chez les invertébrés, pouvons-nous imaginer des mécanismes similaires permettant d'expliquer la capacité de mémoire immunologique observée chez ces organismes ? Nous savons que les modifications épigénétiques peuvent être transmises à la descendance (Burton & Greer, 2022) et surtout, nous savons qu'une forme de MII peut être transmise à la descendance chez certains organismes invertébrés, ce que l'on appelle le « priming » immunitaire trans-générationnel (TGIP) (Sulek *et al.*, 2021). Les études de TGIP sur le modèle *Artemia* (Norouzitallab *et al.*, 2016) ou *Manduca sexta*, le sphinx du tabac (Gegner *et al.*, 2019) ont montré des niveaux différenciés d'acétylation et de méthylation de certaines histones H3 et H4 dans la descendance provenant d'individus stimulés. Là encore, nous retrouvons des similitudes avec les mécanismes présents dans les modèles vertébrés et donc, nous pouvons imaginer que ces similitudes ne s'arrêtent pas seulement à ces mécanismes, mais peuvent également se retrouver au niveau métabolique. Mais dans ce domaine, il existe encore moins de littérature. Seule une étude portant sur l'évolution de la spécificité du « priming » immunitaire chez *Tribolium castaneum* en réponse à des souches de bactéries (Ferro *et al.*, 2019), montre des modifications métaboliques similaires aux cellules entraînées des vertébrés. Ces modifications passent par des

gènes considérés comme clés dans certaines voies métaboliques, comme l'hexokinase 2 pour la glycolyse qui est, en réponse à certaines souches de bactéries, retrouvé sous régulé.

Ainsi, un faisceau de preuves tend à rapprocher les mécanismes décrits dans la mémoire entraînée des modèles vertébrés observés dans les cellules immunitaires, de certains mécanismes du « priming » immunitaire des invertébrés. C'est donc dans ce contexte précis, que nous avons cherché à caractériser les mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez *Biomphalaria*, en nous intéressant aux hémocytes. C'est pourquoi nous avons décidé de rechercher ces mécanismes dans les hémocytes, par des approches dites « omiques » nous permettant d'obtenir une vue d'ensemble et détaillée des possibles mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée (MII) de *Biomphalaria*. Il était important de confirmer, dans un premier temps, l'expression du shift transcriptomique défini, au niveau du mollusque entier, comme marqueur de la MII dans les hémocytes du mollusque. Pour cela, nous avons utilisé des approches de « RNA sequencing » au cours d'une cinétique d'infestation et de réinfestation par *S. mansoni*. Couplées à ces analyses, nous nous sommes intéressés aux possibles modifications épigénétiques induites dans les hémocytes au cours de cette même cinétique d'infestation. Les hémocytes possèdent toute la machinerie nécessaire à la méthylation de l'ADN par l'expression des gènes *Bgdnmt1*, *Bgdnmt2* et *Bgmbd2/3* (Geyer *et al.*, 2017). Nous avons donc utilisé deux techniques « omiques » de caractérisation des changements chromatinien (ATAC-seq) (Buenrostro *et al.*, 2015) et des changements de méthylation de l'ADN (WGBSeq pour « Whole-Genome Bisulfite Sequencing ») dans les hémocytes. Enfin, pour aller plus loin dans les mécanismes et définir les liens évolutifs entre ce modèle mollusque et les modèles vertébrés, nous avons fait le choix d'explorer le métabolisme de ces hémocytes, non sans mal, ce qui sera développé en discussion de ce chapitre. Nous savons déjà que suite à une infestation par *S. mansoni*, les cellules du mollusque réagissent en modifiant leur métabolisme dès les premières 24h suivant l'infestation (Mendes *et al.*, 2019). Ce qui est tout à fait intrigant et particulièrement intéressant, c'est que ces changements semblent très similaires à ceux observés lors de l'acquisition de la MII chez les vertébrés, avec une augmentation de la production d'énergie passant par un shift métabolique au profit de la glycolyse, du cycle du TCA et de la voie des PPP notamment (Figure 9).

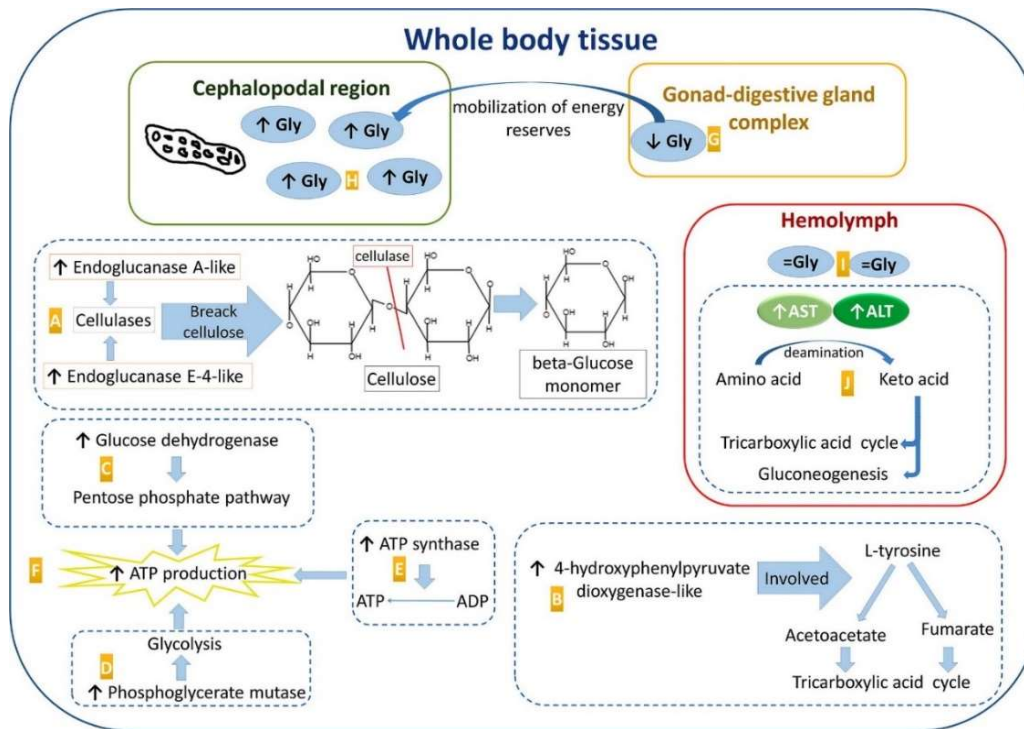


Figure 9: Représentation schématique des changements métaboliques subis par le mollusque *B. glabrata* 24h après une primo infestation par *S. mansoni*. A. voie de dégradation de la cellulose par l'action de cellulases permettant la création de glucose. B. Induction de la production de métabolites particuliers par la conversion de la L-tyrosine. C, D, E, F. Production d'ATP par l'activation de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates (PPP). G, H, I. Relocalisation des réserves énergétiques (glycogène) du mollusque. J. Activation probable du cycle du TCA et de la neoglucogénèse. Schéma repris de (Mendes et al., 2019).

## ***B. Innate immune memory in Biomphalaria glabrata snail: an epigenetic and metabolic trained immunity-related phenotype***

Rémi Pichon <sup>1</sup>, Silvain Pinaud <sup>1,2</sup>, Cristian Chaparro <sup>1</sup>, Manon Fallet <sup>1,3</sup>, Céline Cosseau <sup>1</sup>, Ricardo Lebron <sup>4,5</sup>, Jean-François Allienne <sup>1</sup>, Evgenia Turtoi <sup>6</sup>, Christoph Grunau <sup>1</sup>, Andrei Turtoi <sup>6</sup>, David Duval <sup>1</sup>, Richard Galinier <sup>1</sup>, Benjamin Gourbal <sup>1,\$</sup>

<sup>1</sup> IHPE, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan, France

<sup>2</sup> Cancer Research UK, Cambridge Institute, Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge CB2 0RE, UK

<sup>3</sup> Man-Technology-Environment research centre (MTM), School of Science and Technology, Örebro University SE-701 82 Örebro, Sweden

<sup>4</sup> Department of Genetics, Faculty of Science, University of Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>5</sup> Laboratory of Bioinformatics, Centro de Investigación Biomédica, PTS, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Granada, Spain

<sup>6</sup> Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), Campus Val d'Aurelle, Montpellier, France

### **Article en préparation**

#### ***Summary***

Recently, it has been described that innate immune system of invertebrates can mount a faster and more effective response upon re-exposure to a pathogen. This immunological memory process has been called, innate immune memory for invertebrates. The snail *Biomphalaria glabrata*, constitutes the most fascinating example of innate immune memory (IIM) within invertebrates. In the present study we demonstrate that a transcriptomic shift occurs in hemocyte immune cells following immune challenge. Metabolic and epigenetic reprogramming following the first encounter with *S. mansoni* parasite resulted in this transcriptomic shift following the secondary exposure. Those results highlighted the global metabolomics, chromatin dynamic, gDNA methylation pattern and global transcriptomic regulations occurring for IIM establishment in *Biomphalaria glabrata* snails. These observations help in reconsidering the immunological memory paradigm in invertebrates and the intricate link that exists between Trained Immunity and IIM processes.

**Key words:** *B. glabrata*; *S. mansoni*; Transcriptomic; Epigenetic; Targeted metabolomic; Hemocytes; Innate Immune Memory; Invertebrates.



## ***INTRODUCTION***

In the early 2000s the first demonstrations that invertebrates were able to develop immunological memory have shaken an old established paradigm that considered invertebrate immunity as relying solely on cellular non-sophisticated, and non-specific innate immune processes. Indeed, over the past two decades, an accumulating number of studies have provided evidence that invertebrates have the ability of implementing acquired-like immune response that can be specific and sustainable, protecting them from subsequent infections (Gourbal *et al.*, 2018, Lanz-Mendoza and Contreras-Garduno, 2022, Liu *et al.*, 2022, Milutinovic and Kurtz, 2016, Milutinovic *et al.*, 2016, Sulek *et al.*, 2021). Invertebrate immune system could be “primed” in a sustainable manner, increasing the protection against secondary infection with an already encountered pathogen (Cooper and Eleftherianos, 2017, Kurtz, 2004, Milutinovic and Kurtz, 2016, Portela *et al.*, 2013, Lafont *et al.*, 2020). These immunological memory responses have been named “immune priming” or “innate immune memory” (IIM) for invertebrates (Gourbal *et al.*, 2018). However, the main problem encountered in the literature concerning invertebrates is the heterogeneity of experimental models and protocols used to demonstrate its existence (Milutinovic and Kurtz, 2016). Studies on IIM are indeed extremely heterogeneous in terms of invertebrate taxa studied; host-pathogen interactions (mainly focused on bacteria and macro-parasites); elicitors used (lived or killed pathogens, active molecules, or antigens); routes of inoculation (oral or injection); duration (from few days to months); and degrees of specificity (for review, see (Milutinović and Kurtz, 2016)). This diversity of approaches causes confusing conclusions and IIM in invertebrates remains controversial and questioned by many immunologists (for the controversy see (Hauton and Smith, 2007, Little *et al.*, 2008, Lanz-Mendoza and Contreras-Garduno, 2022)). Molecular data are lacking in most cases or are fragmentary for insect and mollusc models (Coustau *et al.*, 2016, Gourbal *et al.*, 2018, Milutinovic and Kurtz, 2016, Lanz-Mendoza and Contreras-Garduno, 2022). Consequently, it has been very difficult to come up with a universal description of these phenomena and more work is needed to get a comprehensive view of all these processes. Reconciling the scientific community around this concept requires to understand the nature and origin of these convergent or conserved innovations, and to answer the recurrent question of its molecular bases. Knowledge of the mechanisms underpinning IIM in invertebrates is currently just in its infancy.

Studies on the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, have provided some of the most fascinating examples for invertebrate IIM against the agent of human schistosomiasis (Gourbal *et al.*, 2018, Pinaud *et al.*, 2016). Indeed, snails that have previously been exposed to the parasite

*Schistosoma mansoni*, showed increased resistance upon secondary exposure (Pinaud *et al.*, 2016, Portela *et al.*, 2013). This IIM response is acquired in a time dependent manner, persists throughout the snail's life, and is supported by a change from an immune cellular encapsulation response after primary infection toward a hemocyte-mediated humoral immune response after a secondary infection (Pinaud *et al.*, 2016). Using homologous and heterologous primary and secondary snail infections with *Schistosoma* parasite strains, it has been demonstrated that the IIM response is highly specific, involving polymorphic sets of immune recognition molecules and immune effector repertoires that are specific to the pathogen encountered (Pinaud *et al.*, 2019). Finally, whole snail transcriptomic approach has demonstrated that this IIM response is supported by a so-far unreported process of immunological memory response called "immune shift" (Pinaud *et al.*, 2016, Coustau *et al.*, 2016), involving a substantial number of gene transcripts that are expressed exclusively after the secondary infection, such transcripts being not differentially regulated following the primary infection (Pinaud *et al.*, 2016).

One hypothesis can potentially explain this transcriptional immune shift, namely an epigenetic reprogramming of the hemocytes, based on stable chromatin modifications or remodelling, some processes known to occur in invertebrates (Adema *et al.*, 2017, Jenkins and Muskavitch, 2015). Moreover, recent studies have demonstrated that changes in cell metabolic pathways are important drivers of epigenetic reprogramming for innate immune cells in vertebrate trained immunity (Gardiner and Mills, 2016). Accumulations of specific metabolites serve as signalling substrates or cofactors for chromatin-modifying enzymes (Penkov *et al.*, 2019). Interestingly, similar metabolic changes have been demonstrated in *Biomphalaria* snails following pathogen infections (Bonfim *et al.*, 2020, Lima *et al.*, 2016, Mendes *et al.*, 2019, Tunholi-Alves *et al.*, 2019), arguing for a pivotal role of cell metabolism in IIM acquisition.

Thus, to understand how hemocytes can record, store and activate an efficient immune response following a secondary encounter with a same pathogen we will analyse transcriptomic response (RNAseq), epigenome and metabolome changes in hemocytes. We will use (i) DNA methylation by bisulfite sequencing (WGBS), and Chromatin accessibility (ATAC-Seq) analysis to decipher the epigenetic reprogramming and (ii) metabolic changes will be investigated for hemocytes, using mass spectrometry targeted approaches by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) to reveal specific metabolic pathway rearrangements. Such molecular comparative approaches will be conducted for naive, primary, and secondary infected snails. The integration of all these data will be determinant to decipher the dynamic of hemocyte reprogramming in acquisition of IIM.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Ethics statement***

Our laboratory holds permit # A66040 for experiments on animals from both the French Ministry of Agriculture and Fisheries, and the French Ministry of National Education, Research, and Technology. The housing, breeding and animal care of the utilized animals followed the ethical requirements of our country. The researchers also possess an official certificate for animal experimentation from both French ministries (Decree # 87–848, October 19, 1987). Animal experimentation followed the guidelines of the French CNRS. Protocols used had been approved by the French veterinary agency from the DRAAF Languedoc-Roussillon (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt), Montpellier, France (authorization # 007083) and the Ethic committee CEEA-LR (# C66-136-01).

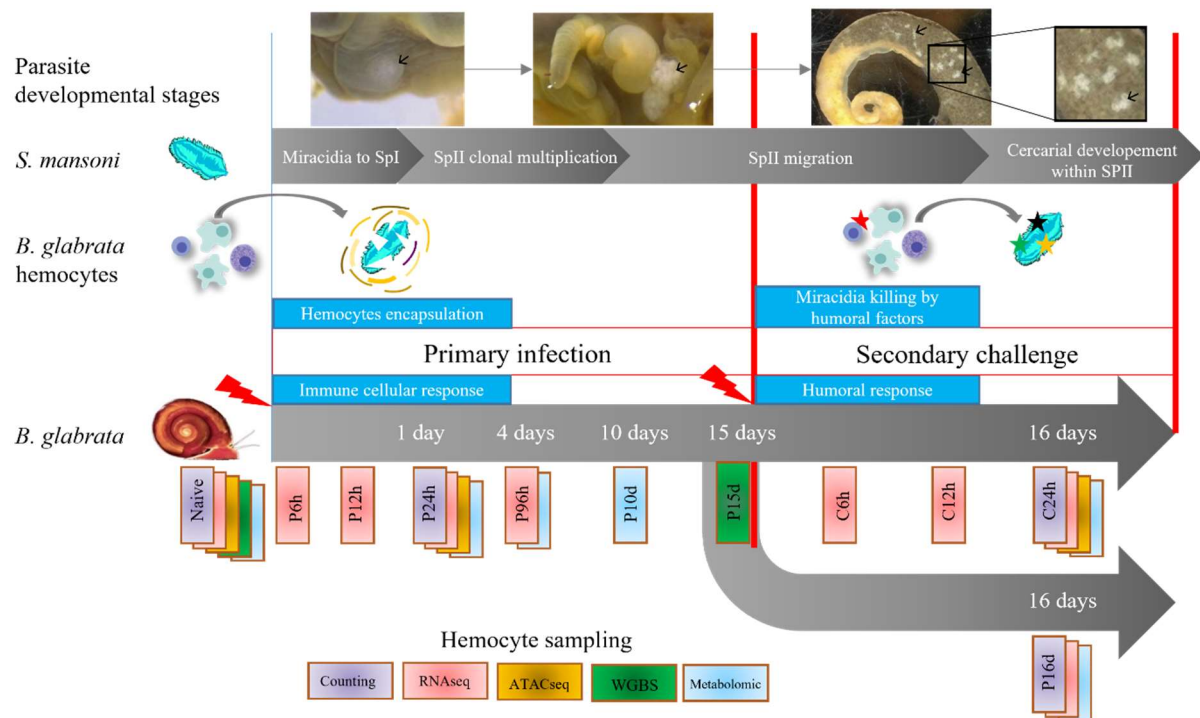
### ***Biological materials, experimental approaches and infection procedures***

The Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata* (BgBRE2, locality of Recife) was used for all the experimental approaches conducted in the present study. Parasite infections were conducted using the 100 % compatible homopatric parasite strain of *Schistosoma mansoni* originating from Brazil (SmBRE, locality of Recife). SmBRE was maintained in its homopatric BgBRE2, and in mice (Swiss OF1), as described previously (Portela *et al.*, 2013, Theron *et al.*, 1997). Briefly, miracidia from SmBRE were hatched from eggs axenically recovered from 60-days infected mouse livers. Livers were collected and homogenized, and the eggs were filtered and washed to obtain miracidia (Guillou *et al.*, 2007).

BgBRE2 Snails (aged of 3-4 months, size between 7-9mm) were individually primary infected with 10 miracidia of SmBRE. Fifteen days after primary infection, snails confirmed as infected (observation across the shell of SpII in the digestive gland, (Fig.1)) were individually secondary challenged with 10 miracidia of SmBRE. During the course of the experiment, different hemocyte sampling were performed in naïve, primary infected and secondary challenged snails at different time points in order to perform molecular analyses as explained in Table 1 and Figure 1. Hemocytes were recovered by foot puncture of hemolymph according to yet established procedure (Mitta *et al.*, 2005). Hemolymph was then spin-down (500 g, 10 min, 26°C) to pellet the hemocytes. Hemocytes were sampled in kinetic from naïve snails, and/or at 6 hours, 12h, 24h, 4 days, 10 days, 15 days and 16 days after primary infection (samples were named P6h, P12h, P24h, P96h, P10d, P15d, P16d), and/or at 6 hours, 12 hours



and 24 hours after a secondary challenge (samples were named C6h, C12h, C24h) (Fig. 1). For the number of snails used and the number of replicates see the Table 1. For all the experiments conducted herein, the prevalence was checked, snails (after hemolymph sampling) were fixed in Raillet fixative solution (0.6% NaCl; 2% acetic acid; 2% formalin) during 48 hours before being dissected under a binocular microscope (Fig.1) to detect and count the primary and/or secondary sporocysts (Allienne *et al.*, 2011). A mollusc was confirmed as infected if at least one primary and/or one secondary sporocyst was identified. Prevalence percentage was calculated as follow:  $P = (\text{number of infected snails} / \text{total number of exposed snails}) * 100$ .



**Figure 1.** Experimental protocol for the kinetic of infestation used to characterize the innate immune memory response of the snail *Biomphalaria glabrata* from Brazil (BgBRE2) primary infected and secondary challenged with its sympatric *Schistosoma mansoni* parasite from Brazil (SmBRE). The different steps of parasite intramolluscal stages development are indicated. Following primary infection, miracidia (snail infective stage) actively penetrate the snail tegument, two-thirds of the miracidia were immediately recognized by the hemocytes (snail immune cells) and killed by encapsulation within 24 hours. The remaining one-third of miracidia settled in snail foot tissues and developed within few hours in sporocysts I (SpI). Within SpI, germinative cells entered in clonal asexual multiplication to form sporocysts II (SpII) (between 2 to 10 days after infection). Then, mature SpII leave SpI by efferation and migrate in snail tissue to reach the digestive gland (between 10 to 15 days). Following secondary challenge, all the miracidia that penetrate in snail tissue were immediately recognized and killed by humoral factors within few hours. No secondary infection occurs, primary infected snails being totally resistant to reinfection (Sire *et al.* 1998, Pinaud *et al.* 2016, Portela *et al.* 2013). Innate immune memory in *Biomphalaria glabrata* is totally acquired at 10 days following primary infection (Sire *et al.* 1998). The hemocyte sampling time-points for counting, RNAseq, ATACseq, WGBS and metabolomic experiments were indicated along the kinetic of primary and secondary infection using purple, pink, yellow, green, and blue rectangles respectively. Red flashes indicated the time point of primary and secondary infections using 10 miracidia of SmBRE.

### ***Total hemocyte and hemocyte population counts***

Total hemocyte counts were estimated on 37 BgBRE2 snails for naive, P24h, P16d and C24h time points, individually enumerated (number of hemocytes /  $\mu\text{l}$  of hemolymph) using a Malassez chamber. Hemocyte population counts were quantified on 10 snails for naive, P24h, P16d and C24h time points. For hemocyte population counts, the hemolymph is poured on a polystyrene slide, and left in a humid chamber for 30 min to allow hemocytes to adhere to the slide. Hemocytes are then stained using MCDh (RAL Diagnostics) protocol (6' in MCDh1, 1' in MCDh2, 2' in MCDh2, 1' in MCDh3, 10'' in MCDh4), then slides are dried and mounted with Dako® fluorescent mounting medium (Agilent, S3023) and the hemocyte populations are counted under light microscope. Significant differences in hemocyte counts were estimated using a Kruskal-Wallis rank sum test associated with Dunn post-hoc test further adjusted by the Benjamini-Hochberg FDR method.

### ***RNAseq approach: mRNA recovery and sequencing***

Pools of hemolymph recovered from 12 BgBRE2 snails were sampled at 6, 12, 24, 96 hours and 16 days after primary infection; these samples were designated P6h, P12h, P24h, P96h and P16d, respectively. Similar pools were recovered at 6, 12 and 24 hours after the secondary challenge and named C6h, C12h, C24h respectively (Figure 1 and Table 1). All these samplings were done in duplicates. Triplicate pools of hemolymph recovered from 12 uninfected snails were used as control (naïve hemocyte samples). All hemolymph samples were centrifuge at 2000g, 5 min at 26°C to pellet the hemocytes before RNA extraction. Trizol® reagent (Sigma Life Science, St. Louis Missouri, USA) was used to extract total RNA regarding the manufacturer guidelines. Quality of extraction was assessed by Bioanalyzer profiling before sending the samples to be sequencing. Libraries preparation (Stranded mRNA, Illumina) and HiSeq 3000 (Illumina) pair-end sequencing (2x75pb) were performed by Fasteris platform (Plan-les-Ouates, Switzerland).

### ***RNAseq data processing***

To perform the differential expression analyses, the Galaxy platform has been used (Giardine *et al.*, 2005). Briefly, quality reads are check using Fastqc tool (de Sena Brandine and Smith, 2019) and adapters were trimmed by Trim Galore Tool version 0.4.3.1 (Krueger, 2015).

High quality and adaptor-free reads (phred>28) from each library were mapped on annotated *Biomphalaria glabrata* genome version 1.6 from VectorBase (Giraldo-Calderon *et al.*, 2015), with RNA STAR version 2.6.0b-2 (Dobin *et al.*, 2013). Htseq-count version 0.9.1 (Anders *et al.*, 2015) was used to estimate the number of reads mapping to all genes. Finally, DESeq2 version 2.11.40.2 (Love *et al.*, 2014) was used to calculate differential expression (DE) of all transcripts during the kinetic compared to the control samples. All raw data were available as a list of DE genes compared to control (naïve snails) with their log<sub>2</sub>FG value (excepted values between -1 and 1 (-1>log<sub>2</sub>FC>1)) and the padj < 0.01 this for each gene and for all the height time-points of the infection kinetic. Another analysis were also conducted to compare the DE genes between challenged samples (C6h, C12h and C24h) and the P16j sample used as control for the secondary challenge infection. For all the tested conditions and biological replicates, the sequencing depth remains homogeneous.

### ***RNAseq enrichment analysis***

Heat map of DE genes is created with Treeview3 (Keil *et al.*, 2016). Genes downregulated, with lower expression than the control sample, are represent in yellow shades. Genes up regulated, with higher expression than the control sample, are represent in blue shades and genes not DE at a specific condition are in black. A hierarchical clustering classification is used, similarity metric is calculated by Euclidean distance and a single linkage makes a linkage method of clustering. This heat map helps us to determine and classify all genes according to their DE pattern, and then an enrichment analysis is conduct for gene clusters of interest. The enrichment analysis is conducted with Blast2GO version 5 (Conesa *et al.*, 2005). The annotation in GO terms of each gene were taken from VectorBase (Giraldo-Calderon *et al.*, 2015). For each GO term, an enrichment test based on the Fisher's exact test was applied.

For a GO term more abundant than expected er is greater than one, while for another GO term less abundant than expected er is lower than one.

Only enhanced functions with a P-value < 0.01 have been kept in all three Gene Ontology (GO) classifications: biological process, cellular component, and molecular function. A list of over- and under-represented functions in our samples in relation to the database mentioned above is then created. Diagrams representation of enriched GO terms is produced using a list of function sort by Revigo software (Supek *et al.*, 2011), using GO IDs and associated P-values. Finally, Venny 2.1 (Oliveros and 2007) is used to create Venn diagrams

for analyzing the number of GO functions shared by different conditions, especially for the secondary challenge time-points. Similar enrichment analyses have been conducted for WGBS and ATACseq approaches. WGBS hyper-methylated and hypo-methylated genes were analysed separately. ATACseq open and closing chromatin regions were analyzed separately.

### ***ATACseq approach: DNA recovery and sequencing***

Fifties BgBRE2 snails were individually exposed to 10 miracidia of SmBRE; 25 snails were secondarily challenged 15 days later with 10 homologous miracidia of SmBRE. For the ATACseq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing) experiment, pools of hemolymph were recovered 24 hours after primary infection or secondary challenge. Around 25  $\mu$ L of hemolymph can be recovered for each snail with around 300 cells by  $\mu$ L. Each experiment was performed on  $\pm$ 80,000 cells. Hemolymph was centrifuge 2000 x g for 5 min at 26°C to pellet cells. Cells were washed with cold CBSS buffer (Mone *et al.*, 2010) then spin down at 500 x g for 5 min at 4°C. Nuclei were extracted from harvest cells as previously described (Buenrostro *et al.*, 2013). Briefly, pellets of cells were gently resuspend in 500 $\mu$ L of cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH = 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Digitonin) before spin down immediately at 500 x g for 10 min at 4°C. Nuclei pellet were immediately submitted to own transposition reaction adapted from previously described procedure : 25  $\mu$ l 2x TD Buffer (Illumina), 1  $\mu$ L Tn5 Transposase (Illumina) and 24  $\mu$ L Nuclease Free water, for 20 min at 37°C. Transposed DNA was purify on Qiagen MinElute Kit regarding manufacturer guidelines (Qiagen, Hilden, Germany). Transposed DNA fragments were amplified in order to constitute sequenced libraries. Briefly, transposed DNA was amplified thanks to NEBNext High-fidelity enzyme (New England BioLab, Ipswich Massachusetts, USA) and Customized Nextera PCR Primer that allow to differentiate libraries during multiplexed sequencing. Number of optimal cycles was estimated thanks to qPCR experiment previously described (Buenrostro *et al.*, 2013). PCR cycle were (1) 72°C 5mn, (2) 98°C 30s, (3) 98° 10s, (4) 63°C 30s, (5) 72°C 1mn, steps 3-5 were repeat 10 times to complete exactly 11 cycles per library. Amplified libraries were purify using Qiagen PCR Cleanup kit (Qiagen, Hilden, Germany), check on electrophoresis BioAnalyzer instrument (Agilent) with DNA 1000 kit before being send for HiSeq 2000 sequencing (Illumina) in 2x75 pair-end by Fasteris platform (Plan-les-Ouates, Switzerland).

### ***ATACseq data processing***

Quality control was performed on FASTQ files with the Fastx-toolkit suite. No trimming was necessary as all files passed our criteria showing average quality values per base above 30. The alignment was performed with Bowtie2 using X 2000 and default parameters. We used Macs2 in order to identify peaks using the following parameters: -f BAM –nomodel –shift -75 –ext size 150 -B. This produced a BedGraph file that was used to call the peaks using bdgpeakcall with parameter -l 100 and -g 25. Afterwards, Bedtools multicov was used to produce the count file with parameter -f 0.5. The count file was used to identify differentially open peaks using DESeq2 on a local Galaxy server. The intersection between open chromatin and differentially expressed genes was done using Bedtools intersect with parameter -u to obtain each gene only once.

### ***WGBS approach: DNA recovery, bisulfite conversion and sequencing***

450 BgBRE2 snails were infected by 10 miracidia of *S. mansoni* and 450 naïve snails were used as control. Fifteen days after primary infection, the hemolymph of the 450 infected snails and 450 naïve snails was recovered by foot puncture. 3ml of hemolymph per biological replicates (150 snails per replicates) was used for DNA extraction for each treatment. Samples were named according to the following nomenclature: Naïve 1, 2, 3 stand for *B. glabrata* controls, P15d-1, 2, 3 stand for *B. glabrata* infected with *S. mansoni* since 15 days. Genomic DNA was extracted from 3ml of pooled hemolymph samples in triplicates for each condition (infected and control). For that, samples were put in 1 ml of lysis buffer (20 mM TRIS pH 8; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0.5% SDS), with 0.3 mg of proteinase K at 55°C for 1 night. Then, DNA was purified by two rounds of phenol-chloroform extraction, precipitated as previously described (Fneich *et al.*, 2013) and dissolved in 40µl water. DNA concentrations were measured with QuBit 2.0 analyser (Invitrogen) using the broad range kit according to manufacturer recommendation. 2.3µg of total gDNA were sent to the sequencing facility except for one sample (Naive3) for which we sent only 1.7µg which was the maximum amount that we had extracted (see Table S4 for details). The Genome Quebec sequencing platform performed bisulfite conversion and WGBS paired-end library construction and sequencing. Sequencing was performed on a Hiseq4000 using 125 nucleotide paired end reads.

### ***WGBS data processing and differentially methylated gene identification***

Bisulfite conversion, BS-seq paired-end library construction, and sequencing were performed at GATC Biotech. Sequencing was performed on an Illumina HiSeq using 125 nucleotide paired end reads. Quality metrics are indicated in Table S2. Reads quality was checked using FastQC. Nucleotide positions with a quality score below 20 were trimmed using Trimalore (paired end, both strands, phred quality score = 20). Reads were then aligned on the *B. glabrata* reference genome (*Biomphalaria glabrata* genome version 1.7 from VectorBase (Adema *et al.*, 2017) with Bismark (Krueger and Andrews, 2011) using the following parameters: maximum insert size = 500, no mismatch allowed sort Bam file by chromosomal position, other parameters used as default). Clustering of the data was performed from BAM files using MethylKit (Akalin *et al.*, 2012). Using MethylExtract (Barturen *et al.*, 2013) and the BAM files from Bismark, the methylation level of each cytosines was synthesized in different file formats (Bed, Wig and VCF). The Wig files were loaded on Integrative Genomics Viewer (IGV) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) for visual inspection of the data (Thorvaldsdottir *et al.*, 2013). Differential methylation analyses were performed with DMRseq package using the following parameters `blocksize= TRUE`, `minnumregion=3`, `deltamax=0.25`, `bpspan=1000`, `mininspan=10`, `maxgapssmooth=2500`, `smooth=TRUE` (Korthauer *et al.*, 2019) as previously optimized for differential methylation analysis on other mollusk species (personal communication <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1366702/v1>). The R scripts used here can be downloaded at [https://github.com/IHPE/DMRseq\\_wrapper](https://github.com/IHPE/DMRseq_wrapper). DMRs were intersected with the annotation of *B. glabrata* genome (version 1.6 from VectorBase) to identify DMRs that occurred within genes (Differentially Methylated Genes (DMGs)) and within promoters (Differentially Methylated Promoters (DMPs)). The +2kb region upstream of the transcription start site was defined as the promoter position. DMGs were used for functional annotation and enrichment analysis with GO enrichment analysis.

### ***Metabolomics approach: sample recovery, metabolite extraction***

All mollusks (BgBRE) were maintained in common garden in a 60 L tank with perforated partitions walls allowing water to circulate between 3 compartments of 20 L. Each compartment permits to separate, the uninfected snails (naive) from the primary infected and the secondary challenged snails. Each day before the snails were collected, tank-water was replaced, and food was removed (24h starvation). Then Hemolymph was recovered for control

(naïve snails) and at 1 day, 4 days, 10 days, 16 days after primary infection, and 1 day after challenge. The number of hemocytes per sample was counted in Malassez cells and a volume of hemolymph corresponding to 60 000 hemocytes was recovered. For each time point of the kinetics, 5 pools of 20 snails were sampled. The hemocytes were centrifuged (2700 x g, 5 min, 4°C), washed once with 500 µl of CBSS (Chernin's balanced salt solution), 500 µl of acetonitrile (suitable for HPLC, Cas No: 75-05-8, Sigma-Aldrich) were added to the hemocyte pellet and sonicated (3 pulses of 10 sec at 20% amplitude). The samples were then stored at -80°C until used. Prevalence and intensity were measured for 45 snails recovered after primary infestation, and secondary challenge to confirm IIM acquisition. Snails were removed from their shells and preserved in Raillet fixative solution before dissection.

Sonicated hemocyte samples (5 replicates of 60 000 hemocytes per kinetic time points) were crushed using glass beads (Dominique Dutscher, 92130 Issy-les-Moulineaux, France) and Precellys Evolution homogenizer (Bertin Instruments) in a mix of 600 µL of lysis buffer containing 80% methanol (Cas. No. 67-56-1, Sigma Aldrich), 20% water and internal standard (IS) 2-morpholinoethanesulfonic acid (10 µM final concentration, Cat. # 341-01622; Dojindo, Tokyo, Japan). Following crushing, the sample was first vortexed vigorously followed by centrifugation at 15 000 x g for 15 min/4°C. The clear upper phase was removed and filtrated through Captiva ND Lipids 96-well plate (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), in order to remove proteins and lipids from the sample. The filtrate was then lyophilized and subsequently dissolved in 50 µL of ultrapure water. Three microliters of prepared sample were injected on UPLC coupled to triple-quadrupole MS (LCMS-8050; Shimadzu, Kyoto, Japan). The chromatographic conditions were as follows: analytical column Discovery HS F5-3 (Cat. # 567503-U; Sigma Aldrich), mobile phase A 0.1% formic acid in water (Wako), mobile phase B 0.1% formic acid in acetonitrile (Wako), flow rate 0.25 mL/min, column oven 40°C. The gradient was: 0 – 2 min 100% A, 5 min 75% A, 11 min 65% A, 15 – 20 min 5% A, 20.1 – 25 min 100% A. MS setting, data acquisition and data analysis were performed according to manufacturer instructions for analyzing Primary Metabolites version 2.0 (Cat. # 225-24865A, Shimadzu).

Following the data acquisition, peak surface area for all identified compounds was calculated and the data were normalized using the internal standard. Missing values for individual metabolites were imputed by assigning the least possible peak area found in the dataset. The imputation was based on the hypothesis that as long as a given metabolite was present in some of the samples, its absence in other samples was due to the limit of detection

of the analysis. The data were then imported in R (4.0.2) (RCoreTeam, 2020). Metabolites with inconsistent values, as estimated by visual inspection of boxplots (large deviations from median value evidenced by upper and lower quantiles), were removed from dataset. Outliers among the samples were identified using the Grubbs's test (R package "outliers") and if applicable were removed from analysis. The data were further analyzed using the MetaboAnalyst (v 5.0, <https://www.metaboanalyst.ca/>) (Chong *et al.*, 2019, Pang *et al.*, 2022). Following the creation of the MetaboAnalyst object, data are scaled by pareto scaling and transformed by generalized logarithm (glog) (Durbin *et al.*, 2002, van den Berg *et al.*, 2006). Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA) is used to determine the variables importance in projection (VIP) of each metabolite for all samples. Metabolites with a P-value < 0.05 (Student's T test) and VIP value > 1 are considered significant between groups.

## **RESULTS**

### ***Total hemocyte count and hemocyte sub-population numeration in IIM***

To avoid snail size effect on hemocyte counting, snails retained for all time points in the analysis were selected for a size of 9 mm. Total hemocyte counts were shown in Figure 2. The total number of hemocytes increase significantly following primary infection and secondary challenge compared to naïve snails (Kruskal-Wallis rank sum test:  $H = 54.024386$ ,  $df = 3$ ,  $P\text{-value} = 1.108703e-11$ ; Dunn post-hoc Benjamini-Hochberg FDR method  $P\text{-value} < 0.05$ ). Only 24 hours after the primary infection (P24h), the number of circulating hemocytes has doubled and tend to increase until the end of the experiment, to reach 3.2 folds comparing naïve to C24h. However, the increase of circulating hemocytes between P24h vs P16d and P16d vs C24h were not significant (Fig. 2A).

Light microscopy approaches allowed us to characterize 4 distinct hemocyte populations called hyalinocytes, semi-granular hyalinocytes, blast-like cells, and granulocytes (Fig. 2B). Hyalinocytes appeared as cells with a large nucleus, with long pseudopodia and high numbers of large cytoplasmic vacuoles without specific staining. Semi-granular hyalinocytes were perfectly similar to the hyalinocytes but with few deep purple granulations in their cytoplasm (neutrophil granules). Blast-like cells are small and non-adherent cells with round shape and a high nucleo/cytoplasmic ratio (often considered as pro-hemocytes). Finally, granulocytes are quite big cells with a spherical shape and producing small filopodia, with always neutrophilic (deep purple) to basophilic (dark blue) granules in their cytoplasm. The



hemocyte populations counts (Figure 2C) did not reveal significant differences comparing the 4 hemocyte populations within the infection kinetic. Thus, the increase of total hemocyte number (Fig. 2A) was not associated with the proliferation of a specific hemocyte subtype but seems to be due to a proportional rise of all the hemocyte populations (Fig. 2).

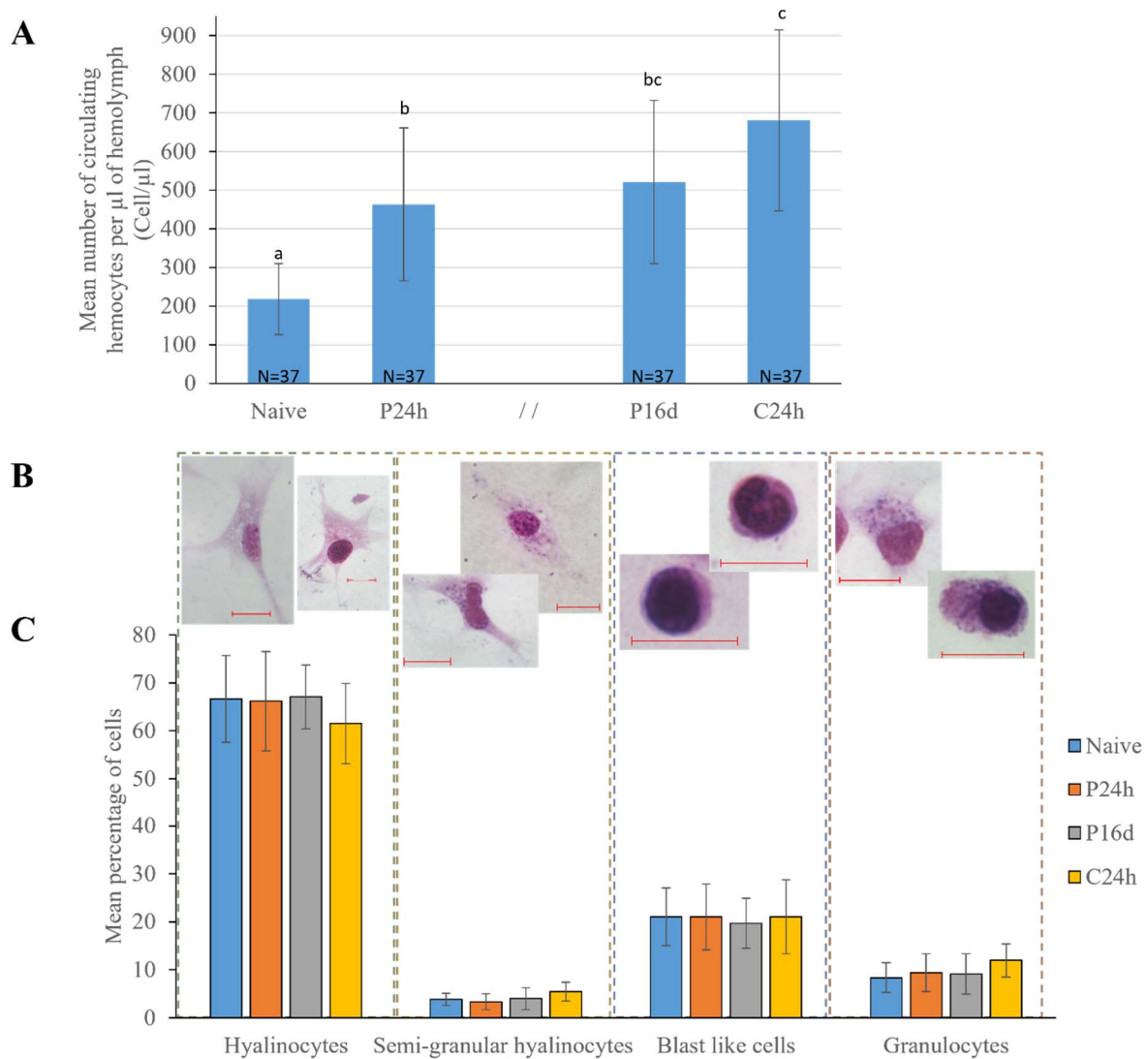


Figure 2: Average percentage of *BgBRE2* total circulating hemocytes and hemocyte populations. A.) Mean number of circulating hemocytes per  $\mu\text{l}$  of hemolymph (Cell/ $\mu\text{l}$ ) in *BgBRE2* snails following primary infection and secondary challenge by *SmbRE* parasites. Error bars correspond to standard deviation. *N*: number of snails used as replicates. Different letters (a, b, c) indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) estimated by Dunn post-hoc test and FDR benjamini-Hochberg correction. B.) Morphological profiles of *B. glabrata* hemocyte populations, red scale bars correspond to  $10 \mu\text{m}$ , MCDh stain. C.) Mean % of each population according to infection kinetic time points.

### ***Global transcriptomic response of hemocytes in IIM***

Comparison of differential gene expression between naïve snails and all the experimental infection samples reveals 3 594 genes as differentially expressed (DE) (Fig. 3). These genes represent 11.3% over the 31°681 genes annotated in *Biomphalaria*'s genome BB02 from vectorbase (<https://www.vectorbase.org/>). The DE genes after the primo infection (P6h to P16d) representing 1309 genes, with very few DE genes from P6h to P96h but P16d appearing strongly regulated with 1019 genes DE (Fig. 3A and B). However, a huge transcriptional response is observed after the challenge (C6h to C24h), representing 95.2 % of all the DE genes of the entire infestation kinetic and among them, 2285 DE genes were specific to the challenge (63.6%) (Fig.3A and B) and correspond to the clusters 4 and 5 in Figure 3B representing DE genes that were exclusively expressed following the secondary challenge.

To go further in the characterization of the transcriptomic challenge response and describing more thoroughly the DE genes of the challenge, we compared all the challenged conditions (C6h, C12h and C24h) not to the naïve sample but to the gene expression of P16d sample. This analysis revealed 1 666 DE genes (Fig. 3E). These genes represent 5.26% of the 31°681 genes present in the *Biomphalaria*'s genome. The majority of DE genes were up-regulated (94.7%), and very few were down-regulated (5.3%) (Fig.3C, D). A huge transcriptional response could be observed at C6h and C12h, with specific gene clusters (clusters 1, 2 and 3 in Fig.3E) that were differentially up regulated and within these clusters 296 and 815 genes were exclusively DE at C6h and C12h respectively. Finally, at C24h, few DE genes could be detected compared to P16d condition (25 genes up-regulated and 1 down-regulated) (Fig.3C, E), this could be linked to the end of the transcriptional post-challenge response that seems to be a very strong but short immune response.

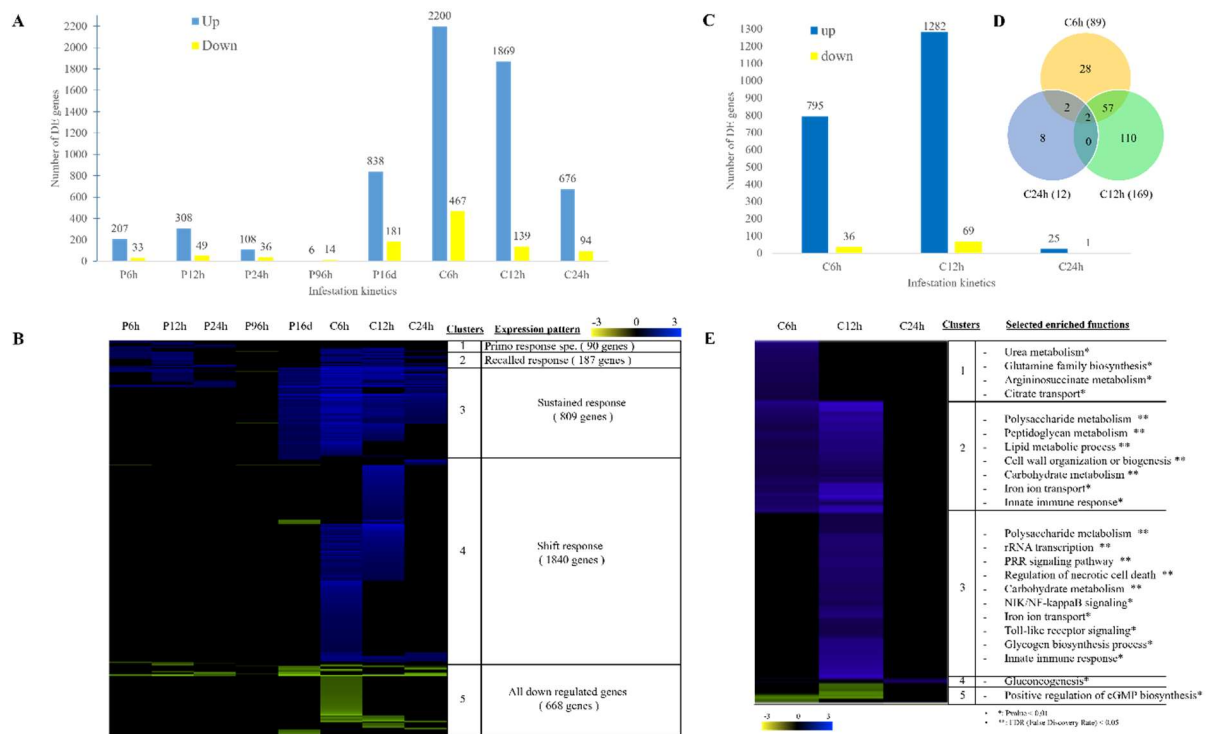


Figure 3: A.) Histogram showing the number of DE genes throughout the infestation kinetics. The numbers displayed on each bar represent the exact number of DE genes per condition when they are up (blue) or down (yellow) regulated. B.) Heatmap showing the DE genes in mollusc hemocytes and compared to the naïve conditions, along the kinetic of infestation by *SmbRE* parasite. DE genes are expressed in LOG2FC and the blue and yellow scale represent up- and down-regulated genes, respectively. C.) Histogram showing the number of DE genes throughout the infestation kinetics after challenge and compared to P16d. The numbers displayed on each bar represent the exact number of DE genes per condition when they are up (blue) or down (yellow) regulated. D.) Venn diagram of enriched functions of up-regulated genes shared by the three conditions. E.) Heatmap showing the DE genes in mollusc hemocytes and compared to the P16d condition, along the kinetic of re-infestation by *SmbRE* parasite. DE genes are expressed in LOG2FC and the blue and yellow scale represent up- and down-regulated genes respectively. These genes are regrouped in 4 clusters of up-regulated genes and 1 cluster of all down-regulated genes.

### GO enrichment analysis of transcriptomic response after primary infection

The activation of the snail immune response towards *S. mansoni* parasite in hemocytes takes place over 4 days (Fig. 3A). Briefly, 207 genes (11.6% of the 1780 DE genes of the primary infection) at P6h, 308 genes (17.3 %) at P12h, 108 genes (6.1%) at P24h and 6 genes (0.4%) at P96h were up regulated; 1.8%, 2.7%, 2%, and 0.8% of DE genes were down regulated for the same kinetic points respectively. This fall in gene expression at P96h is interpreted as a hallmark of the end of the primary immune response against *SmbRE* parasite.

Concerning gene function and gene ontology (GO), most of the up-regulated genes during the first 96h of infection belonged to Pattern Recognition Receptor (PRR; i.e. c-type lectin), tumor necrosis factor (TNF) and antimicrobial proteins families. From P6h, GO

functions are mainly involved in cell movement and in different metabolic pathways, such as the urea cycle, lipid metabolism, carbohydrates metabolism, or to TCA cycle with the enrichment of tricarboxylic acid transporters. These metabolic pathways remain over-represented at P24h with immune related functions. At P12h GO function were related to nF-kappaB signaling and immunity. For down-regulated genes and for P96h time point too few genes were DE and GO enrichment analysis was impossible to perform. However, functions of down regulated genes are involved in hydrolase activity, calcium-ion transport or metalloprotease functions, and interestingly two down-regulated genes (cytochrome b and NADH dehydrogenase) at P12h and P96h are involved in the mitochondrial electron transport chain and cell energy metabolism through the oxidative phosphorylation (OxPhos) pathway. The P16d time point is strongly regulated (Fig. 3A and B). To avoid redundancy the GO enrichment description for this kinetic point is described hereafter joined to the sustained immune response.

### ***GO enrichment analysis of transcriptomic response after secondary challenge***

Based on previous studies conducted on whole snails, we were able to describe 3 main processes of transcript regulation related to IIM : (i) the recalled immune response, (ii) the sustained immune response and (iii) the immune shift (Coustau *et al.*, 2016, Gourbal *et al.*, 2018, Pinaud *et al.*, 2016). In the present study, those immune responses were also observed in hemocytes and correspond to the clusters 2, 3 and 4 shown in Figure 3B. The respective share of each of these immune responses following the secondary challenge is as follows: 6.6% recalled, 28.5% sustained and 64.9% shift.

#### *(i) Gene ontology (GO) enrichment of recalled immune response*

The recalled response (Fig. 3B), correspond to transcripts that were regulated similarly following P6h, P12h, P24h compared to C6h, C12h, C24h with 187 up-regulated genes and 17 down-regulated genes. These genes are mainly involved in lipid metabolism, organic substance catabolism, amino sugar metabolism or TCA cycle for the up-regulated and oxidative phosphorylation (OxPhos) with genes like NADH dehydrogenase subunit and cytochrome b for the down-regulated genes. These genes involved in OxPhos pathway are more strongly down regulated after challenge, for example, “cytochrome b (mitochondrion)” have a Log2FC between -1 and -1.5 following primary infection and a Log2FC between -2.1 and -2.8 following the secondary challenge. This stronger response following the challenge is observed for the majority of DE genes within the recalled pattern for up-regulated or down-regulated genes.

### *(ii) Gene ontology (GO) enrichment of sustained immune response*

The last time point of the primary infection, P16d, is strongly regulated (Fig. 3A and B), 838 genes (47 %) were up-regulated and 180 genes (10.1%) were down-regulated, some of them were exclusively DE at P16d but most of them are maintained at a high level of expression after the challenge (809 up-regulated genes and 81 down-regulated genes) (see cluster 3, Fig. 3B). Those genes expressed after primo infection and then maintained expressed along the infection kinetic are considered as being part of the sustained immune response (Fig. 3B).

GO associated with these genes were related to the following functions: cell and leukocyte differentiation, migration, and proliferation; cell adhesion and communication; interleukin production and response; membrane signaling receptors; cell metabolism (TCA cycle, Pentose Phosphate Pathway (PPP)); production of Reactive Oxygen Species (ROS); and enzymatic/hydrolytic activities. Finally, down-regulated genes are mainly associated with functions belonging to carbohydrate, polysaccharide metabolism and catabolism of cell wall.

### *(iii) Gene ontology (GO) enrichment of immune shift response*

Immune shift (Fig. 3B, C, D and E) represents the main gene expression pattern of the IIM response in hemocytes of *B. glabrata*. In order to analyze more precisely those immune shift genes, that were exclusively DE after the secondary challenge, we performed the GO enrichment analysis for the DE genes after the challenge but using as control the P16d sample. This will permit to avoid analyzing twice the genes of the sustained response (expressed at P16d and also after the challenge) and keep solely DE genes of the challenge C6h, C12h, C24h (Fig. 3C and E). Briefly, we observed that 2233 genes were DE exclusively after the challenge and that these genes were never differentially regulated following the primo infestation. More precisely, 795 genes were up-regulated at C6h and 36 down-regulated. At C12h, 1282 up and 69 down regulated genes were observed. Finally, only 25 genes up-regulated and 1 gene down-regulated were identified at C24h (Fig. 3C).

Venn diagrams were made on the GO terms (of all the three category, biological process, cellular component, and molecular function) of up-regulated genes involved in over-represented functions with a Pvalue < 0.01 (Fig. 3D). Briefly, more GO functions were shared between C6h and C12h, indicating that the challenge response is initiated at C6h and strengthens at C12h even if the genes supporting such GO functions could be different (cluster 1 and 3, Fig. 3E). Then, at C24h the challenge response is over. Concerning the down-regulated

genes, only 11 functions were found; 6 specific to C6h and 5 for C12h, no GO function seems to be shared between these two time points.

The DE gene expressed after the secondary challenge, are involved in immune functions related to tumor necrosis factor (TNF), TEP (Thioester containing-protein (BgTEP2 and BgMCR2).), FREPs (Fibrinogen-related proteins), or biophalysin (beta pore-forming toxin family members (#2: BGLB000033, #13: BGLB000122; #14: BGLB000086; #15: BGLB000076)). At C6h, many enriched functions are involved in regulation of transcription, immune responses, self/non-self-recognition (PRRs expression), cell movement or cytoskeleton remodeling, and numerous functions were related to metabolism like, urea cycle, lipid metabolism and catabolism, TCA cycle and carbohydrate metabolism and glucose metabolism (improvement in glycolysis, in particular due to up-regulation of hexokinase 2). These functions remain partially enriched at C12h, but at this kinetic time point, functions involved in vacuole, lytic vacuole, lytic enzyme, or cytoskeleton remodeling appear more predominant. All the genes differentially regulated at C6h and C12h and the GO functions with which they are associated indicate clearly a deep changing in hemocyte functions that seems to be directed towards humoral response (Fig.4). At C24h, the challenge response seems to be over, only a few functions involved in immunity, cell differentiation and regulation of metabolism of different sugars remain enriched. The down-regulated genes in immune shift, regroup mainly genes involved in the OxPhos pathway in the mitochondria (Fig.4).

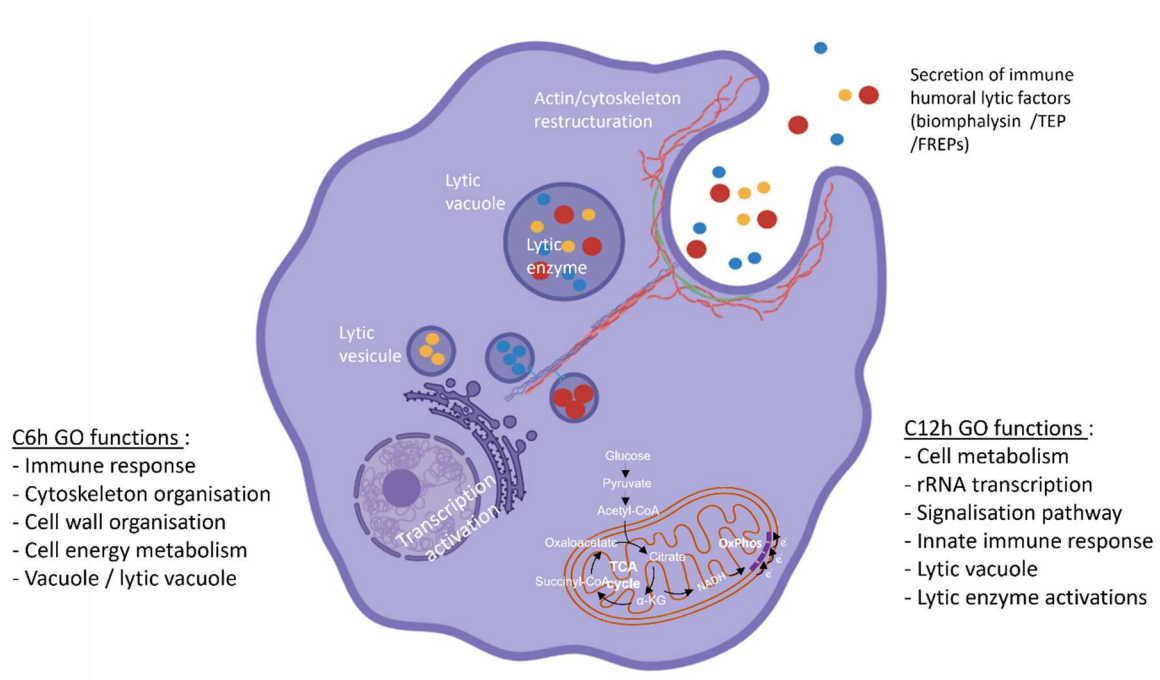


Figure 4: Schematic representation of RNAseq hemocyte activation and response to secondary challenge infection.

## ***Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS): genomic methylation status of hemocytes in IIM***

Due to the high number of snails required for Whole Genome Bisulfite sequencing (WGBS) (Table 1), this analysis was performed exclusively by comparing hemocyte DNA methylation profiles of naive snails to 15 days primary infected snails (P16d). Hemocyte DNA was mainly methylated in a CpG context with a mosaic-type cytosine methylation pattern as previously described for whole snails (Luviano *et al.*, 2021). The global level of hemocyte cytosine methylation was 1.17% and 1.14% (compared to all CpG) in naive and primary infected snails respectively, no significant difference observed between the two conditions showing that the infestation did not impact the level of cytosine methylation at the whole hemocyte genome scale. This suggests that if certain regions of the genome are demethylated then other regions will be methylated in parallel. This leads to a global balance of methylation across the entire hemocyte genome. To gain deeper insights into the impact of the infection by *S. mansoni* on hemocyte methylation patterns, we then used DMR-Seq software (Korthauer *et al.*, 2019) to identify Differentially Methylated Regions (DMRs) of hemocytes between primary infected and naive snails (Fig. 5A). The differential methylation analysis led to the detection of 1009 DMRs, among which 554 and 455 regions were hypo and hypermethylated respectively (Table S5) (Fig. 5B DMR + Venn). This clearly shows that infestation has an impact on the local pattern of cytosine methylation in hemocytes (Fig. 5A, B). Next, we found that 420 DMRs intersected with gene positions, defining these regions as Differentially Methylated Genes (DMGs). Among those 420 DMGs, 179 genes were in hypermethylated regions (HyperMGs), 234 genes were in hypomethylated regions (HypoMGs) and 7 were impacted by both hyper- and hypo-methylations (Fig. 5C).

Table 1. Overview of snails and replicates used for each experimental approach.

Experiment	# Naïve snails (# replicates)	# Primary infected snails (# replicates) # conditions	# secondary challenged snails (# replicates) # conditions
Total hemocyte count	1 (37)	1 (37)*2	1 (37)
Population hemocyte count	1 (10)	1 (10)*2	1 (10)
RNaseq	pool 12 (3)	(pool 12 (2))*4	(pool 12 (2))*3
ATACseq	pool 10 (2)	pool 10 (2)	pool 10 (2)
WGBS	pool 150 (3)	pool 150 (3)	ND
Metabolomic	pool 20 (5)	(pool 20 (5))*4	pool 20 (5)

# : number ; of replicates : correspond to the number of biological replicates done for each experiment ; conditions : correspond to the number of time points analysed in the kinetic of primary infection and secondary challenge.

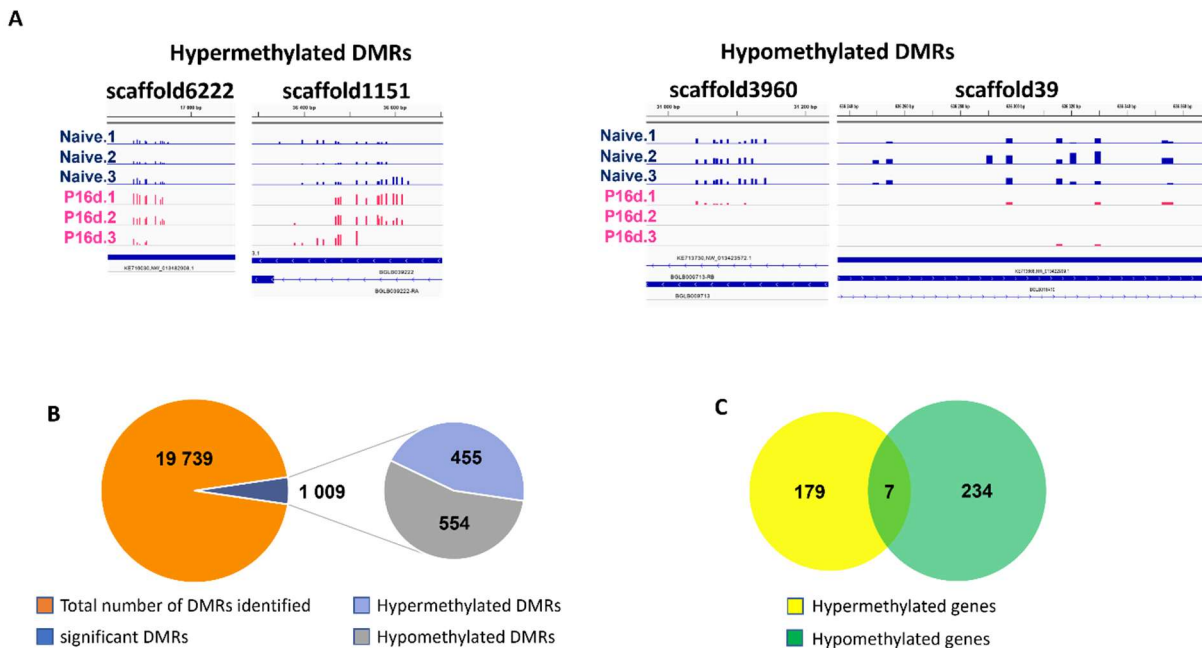


Figure 5 DMRs DMGs : **A**. Snapshot of Integrative Genomics Viewer windows which displays hemocyte differentially methylated regions (DMRs) CpG methylation data for each of the three biological replicates of the naive samples (Naïve 1 to 3, blue color) and the primary infected samples (P16d.1 to 3, pink color). Each bar indicates the level of methylation at a CpG position (x-axis) on a scale from 0 to 100% (y-axis) ; **B**. number of differentially methylated regions (DMRs) in hemocytes, indicating the numbers of hypomethylated DMRs and hypermethylated DMRs ; **C**. Venn diagram showing the numbers of hemocyte differentially methylated genes (DMGs) found as hypomethylated or hypermethylated in DMRs.



To go further, we investigate GO functions which are overrepresented among those HyperMGs and HypoMGs (Figure 6). According to this analysis, the functions mostly impacted by DNA methylation changes were related to Immune cell activation and cell morphogenesis / development, mitochondria regulatory process and epigenetic regulation for hypomethylated genes (Fig. 6A). For hypermethylated genes, enriched GO functions were related to different cellular processes (dedifferentiation, response to chemical, DNA repair, recombination, ribosomal regulatory process), then more global metabolic processes were also identified belonging to interaction with symbiont, regulatory processes of glucose metabolism and regulation of the inflammatory response (Fig. 6B).

There is no clear correlation between differential methylation of genes and their transcription in *Biomphalaria* snails. This has been yet described more generally for invertebrates and the role and function of DNA methylation in such organisms appeared as a complex black box. The detailed molecular mechanism through which DNA methylation signaling contributes to regulate gene expression in invertebrates is yet to be explored. However, undoubtedly hyper or hypo-methylation observed herein were link with key signaling pathways known to positively regulate or promote immune cell activation, arguing for an essential contribution in IIM to prepare snails to answer efficiently to a secondary infection.

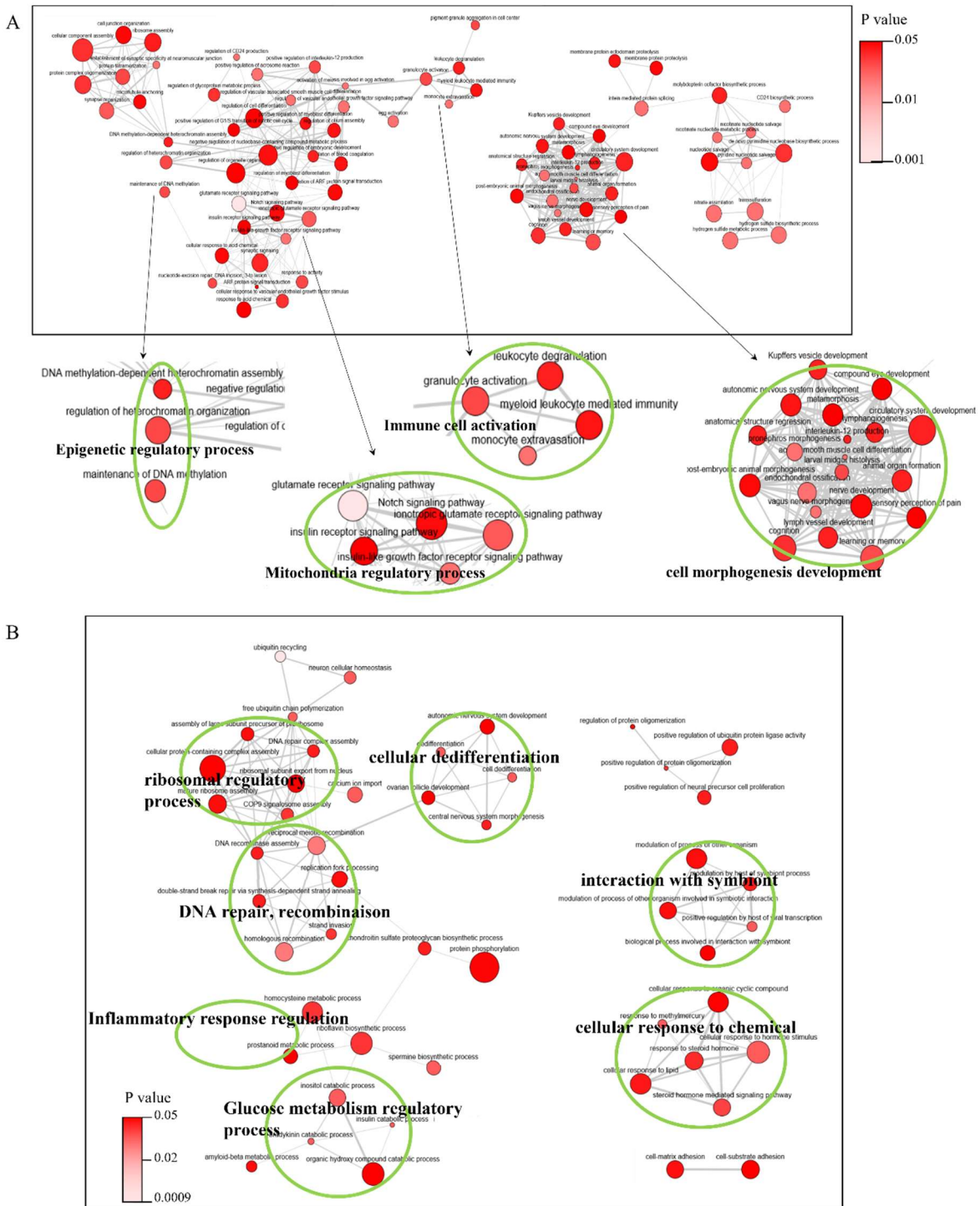
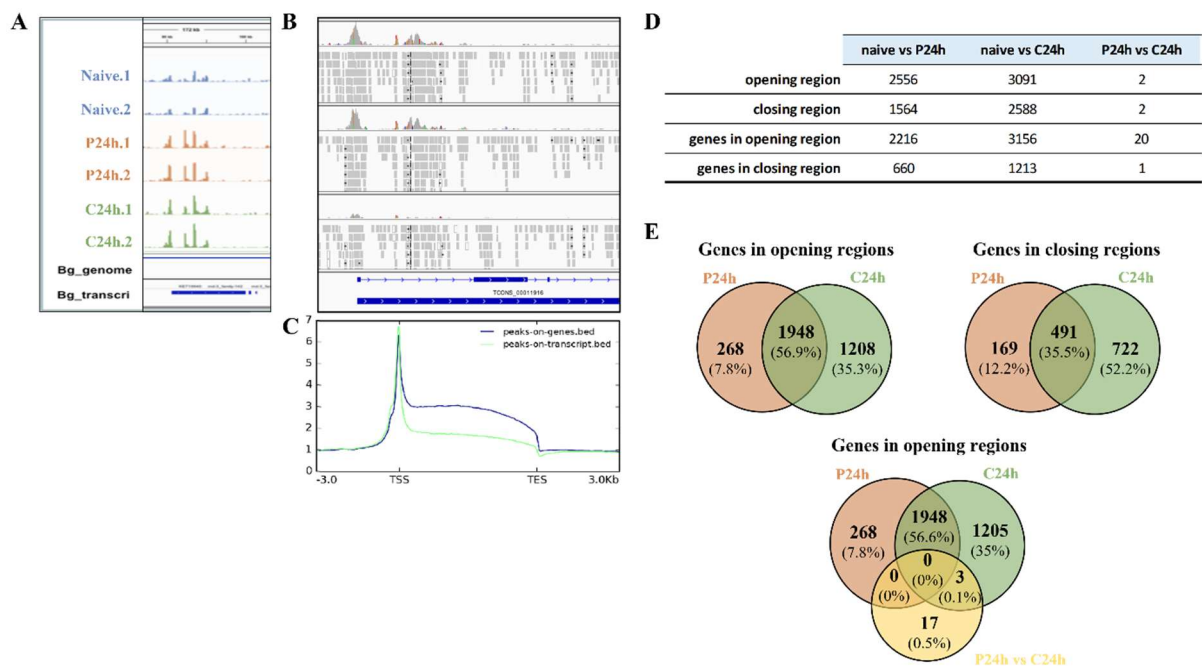


Figure 6. **A.** REVIGO Interactive graph view of hemocyte WGBS hypomethylated genes (BP: Biological Process). **B.** REVIGO Interactive graph view of hemocyte WGBS hypermethylated genes (BP: Biological Process). Bubble color by a gradient of red to pink indicates the p-value according to the legend in upper right-hand corner (scale bar from 0.05 to 0.001); bubble size indicates the frequency of the GO term in the underlying GOA database (bubbles of more general terms are larger). Highly similar GO terms are linked by edges in the graph, where the line width indicates the degree of similarity. The placement of the nodes is determined by a 'force-directed' layout algorithm that aims to keep the more similar nodes closer together.

### ***ATACseq approach for investigate hemocyte chromatin accessibility in IIM***

ATACseq approach permit us to follow changes in chromatin accessibility following primary infection and secondary challenge in hemocytes (Fig. 7, Table S6). Comparing two experimental samples, the chromatin accessibility increases when a higher number of reads mapped to the genome for a specific genomic region (i.e., opening genomic regions). Reciprocally, the chromatin accessibility decreases when the number of mapped reads for a genomic region decrease (i.e., closing chromatin regions) (Fig.7A, B). This increase in mapped reads for a specific genomic region is related to an increase in the proportion of cells in the hemocyte population (cell population frequency) that displayed similar modifications of chromatin accessibility in similar genomic regions.

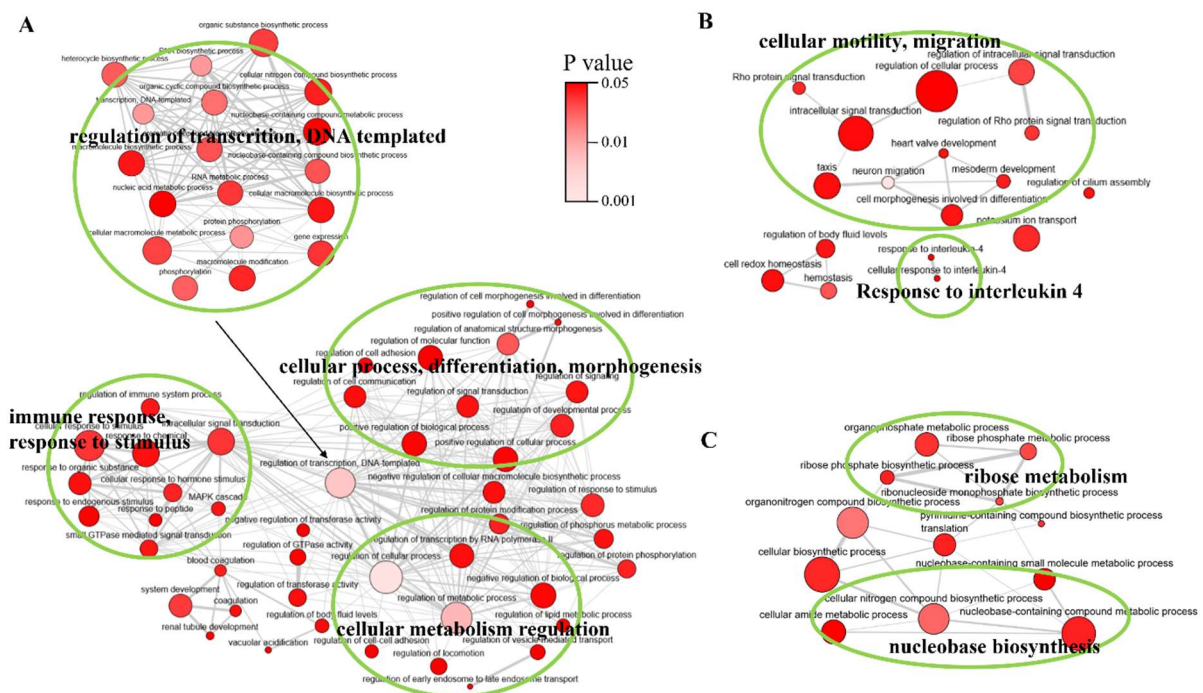
In the present ATACseq data, we have observed that read peaks were transcript specific and were not distributed randomly along the transcript but were mainly located on gene transcription start site (TSS) (Fig. 7B and C). This indicates clearly that the changes in chromatin structure and accessibility in hemocytes following infection were not anarchic but thinly regulated. This observation is strengthened by the fact that 94.3% of the opening genomic regions were associated with a gene in P24h and C24h samples compared to naïve (Fig. 7D). This observation is much less obvious for closing genomic regions, indeed decrease of chromatin accessibility seems more erratic as less than half of the closing regions (44.6%) are associated with a gene (Fig. 7D). We observed 2556 and 3091 opening regions comparing naïve to P24h or C24h and those regions were associated with 2216 and 3156 genes respectively (Fig. 7D). Comparing the same samples, 1564 and 2588 closing regions were identified that are associated with 660 or 1213 genes for P24h and C24h respectively (Fig. 7D). Thus, we can see that most changes in chromatin accessibility occurred as early as 24h after primary infection (P24h). Indeed, chromatin accessibility change drastically at P24h, and few changes were also observed when comparing C24h to naïve samples, but no changes occurred after the secondary challenge, no modification of chromatin accessibility is observed when comparing P24h versus C24h (Fig. 7D). Modifications in chromatin accessibility continue to change after P24h and this explains why it is possible to detect some additional chromatin regions that are opening or closing when comparing C24h to the naïve sample, but these changes are not large enough after the secondary challenge to be significantly detected when comparing C24h to P24h samples. Thus, we can conclude that the changes in chromatin structure are exclusively due to the primary infestation.



**Figure 7.** ATACseq data of hemocyte chromatin accessibility changes in IIM. **A.** Snapshot of Integrative Genomics Viewer windows, which displays hemocyte chromatin accessibility data for each of the two biological replicates of the naive, samples (Naive 1-2, blue color), primary infected samples (P24h.1-2, orange color) and challenged samples (C24h.1-2, green color). Each bar indicates the frequency of reads mapped at a specific genome position (x-axis) on a scale from 0 to 100% (y-axis); **B.** Snapshot of genomic viewer windows comparing pics in samples, increasing pic frequency demonstrate an increase in chromatin accessibility resulting in an opening genomic region, reducing pic frequency demonstrate a reduce chromatin accessibility and thus a closing genomic region; **C.** Line plots showing the average chromatin accessibility levels around the TSS/TES  $\pm$  3 kb region in hemocytes. The blue line and green line indicate gene and transcript data, respectively; **D.** Table summarizing changes in chromatin accessibility comparing Naive, P24h and C24h samples, indicating the total number of opening and closing genomic regions and the number of genes in these genomic regions; **E.** Venn diagram showing the numbers of genes found in opening or closing regions shared between the different samples.

Most of the genes that are associated with opening and closing regions were shared between P24h and C24h when compared to naïve sample (56.9 % and 35.5 % respectively) (Fig. 7E). Only 17 genes (0.5%) were specifically associated with the secondary challenge (Fig. 7E). Moreover, all the genes of P24h and C24h in opening and closing regions fall within the same GO functions and gave similar results following GO enrichment analysis (Fig. 8A, B; Table S8). GO functions overrepresented among genes identified in opening chromatin regions for P24h, C24h (Fig. 8A) were related to immune response / response to stimulus, cellular differentiation and morphogenesis, cellular metabolism regulation and the regulation of transcription. All these enriched functions fit perfectly with the phenotypic changes that were expected to occur in hemocytes following primary infection and IIM acquisition. GO functions overrepresented among genes identified in closing chromatin regions for P24h, C24h (Fig. 8B)

were related to cellular motility and migration and response to interleukin 4. The fact that motility and migration are associated with closing regions is not so surprising if we consider that hemocytes are shifting from a cellular immune response toward a humoral immune response in the acquisition of IIM. Finally, the 20 genes that were associated to opening chromatin regions (Fig. 7D) when comparing C24h to P24h were mainly associated with ribose metabolism and nucleobase synthesis (Fig. 8C). These enriched functions can be related to the huge transcriptional activity observed for hemocytes following the secondary challenge.



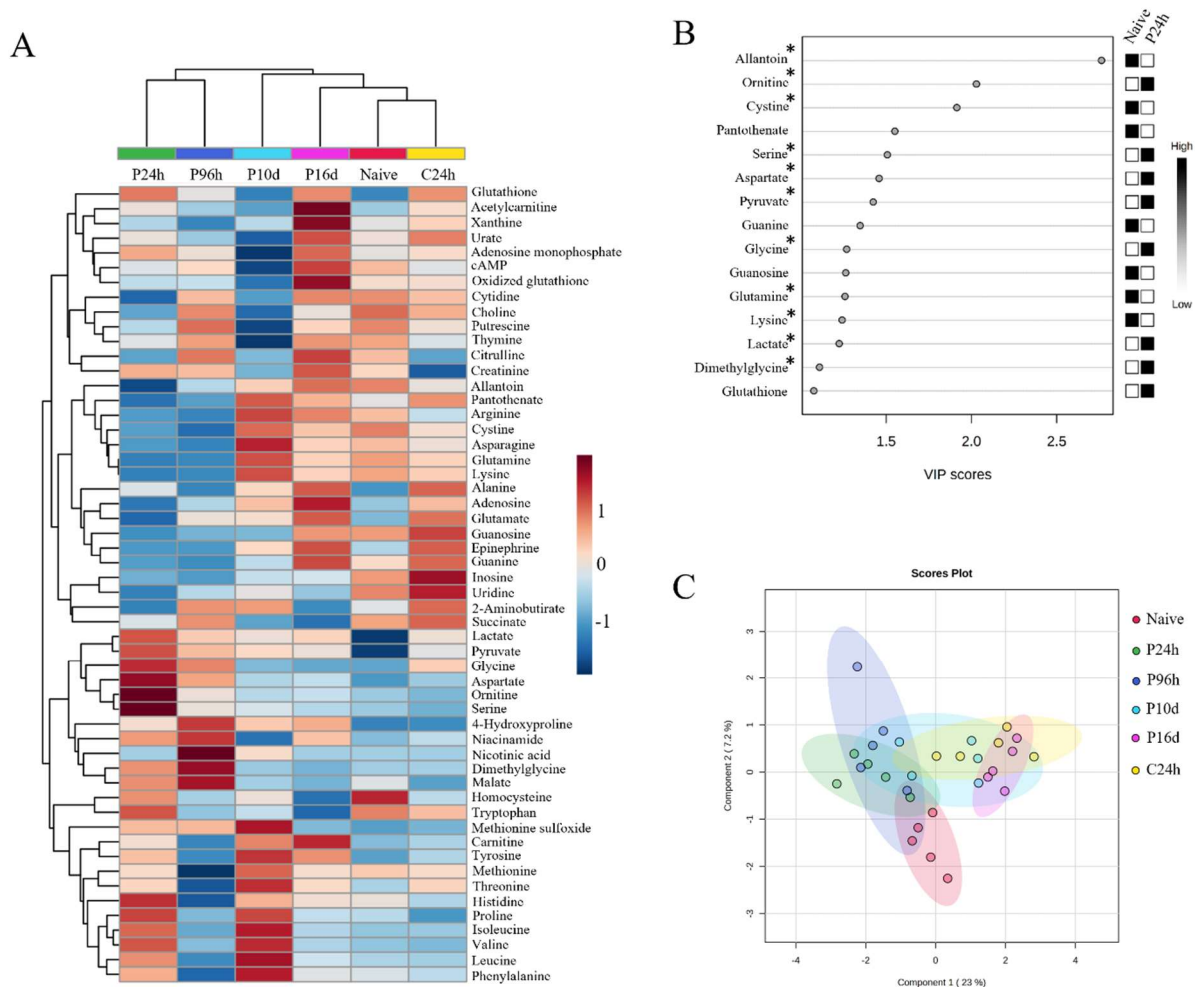
**Figure 8.** REVIGO Interactive graph view of hemocyte ATACseq data (BP: Biological Process GO enrichment). **A.** genes in opening chromatin regions comparing naïve vs P24h/C24h samples, **B.** genes in closing chromatin regions comparing naïve vs P24h/C24h samples, **C.** genes in opening chromatin regions comparing P24h vs C24h samples. Bubble color by a gradient of red to pink indicates the p-value according to the legend in upper right-hand corner (scale bar from 0.05 to 0.001); bubble size indicates the frequency of the GO term in the underlying GOA database (bubbles of more general terms are larger). Highly similar GO terms are linked by edges in the graph, where the line width indicates the degree of similarity. The placement of the nodes is determined by a 'force-directed' layout algorithm that aims to keep the more similar nodes closer together.

Then, we investigate for a correlation between genes that are in opening or closing chromatin regions and their transcription in hemocytes of *Biomphalaria* snails. Interestingly, 35.6% of the genes that follow a sustained pattern of expression and 21.6% of the immune shift genes were associated to ATACseq opening regions. Thus, increasing chromatin accessibility support more, the sustain immune response than the shift immune response in IIM. For decrease of chromatin accessibility, no more than 6% of gene downregulated in RNAseq could be

correlated with ATACseq closing chromatin regions. Closing chromatin regions seem not to be thinly regulated and be only the result of a mechanistic constraint that requires certain chromatin regions to be closed in order to specifically open others.

### ***Targeted metabolomics approach of hemocytes in IIM***

To go further and validate experimentally the results obtained by the transcriptomic and epigenomic approaches we performed a targeted metabolomics analysis comparing hemocyte recovered from naïve, primary infected and secondary challenged snails. First, about the targeted 100 metabolites approach, 54 specific metabolites were detected in *B. glabrata* hemocytes (Fig. 9A). Analysis of these 54 metabolites shows a strong shift in metabolite accumulation in hemocytes very early after the primary infestation. As shown by the heatmap and the dendrogram clustering but also by the PLS-DA analysis (Fig. 9A and C), samples that are the more different from the others are P24h and P96h. Thus, the metabolism of the hemocytes changed drastically during the first 4 days after primary infection and then gradually returned to a pattern close to naïve snail hemocytes (Fig.9A). Interestingly, there is very limited changes in hemocyte metabolism following the secondary challenge. The naïve, P16d and C24h samples are grouped in the same cluster and appeared thus highly similar (Fig. 9A). The primary infestation induces the most significant changes in the metabolome of hemocytes while the secondary infestation did not. Significant changes ( $FDR < 0.05$ ) observed from P24h were related to accumulation of metabolites belonging to amino acids (glycine, dimethylglycine and serine), of the urea pathway such as ornithine, or metabolites involved in the glycolysis pathway and the TCA cycle such as pyruvate, lactate and aspartate (Fig. 9B). At the same time, we find a decrease in allantoin, also involved in the urea pathway, as well as some amino-acids cysteine, lysine and glutamine (Fig. 9B). Concerning the secondary challenge, when comparing C24h to P16d no significant differences could be observed.

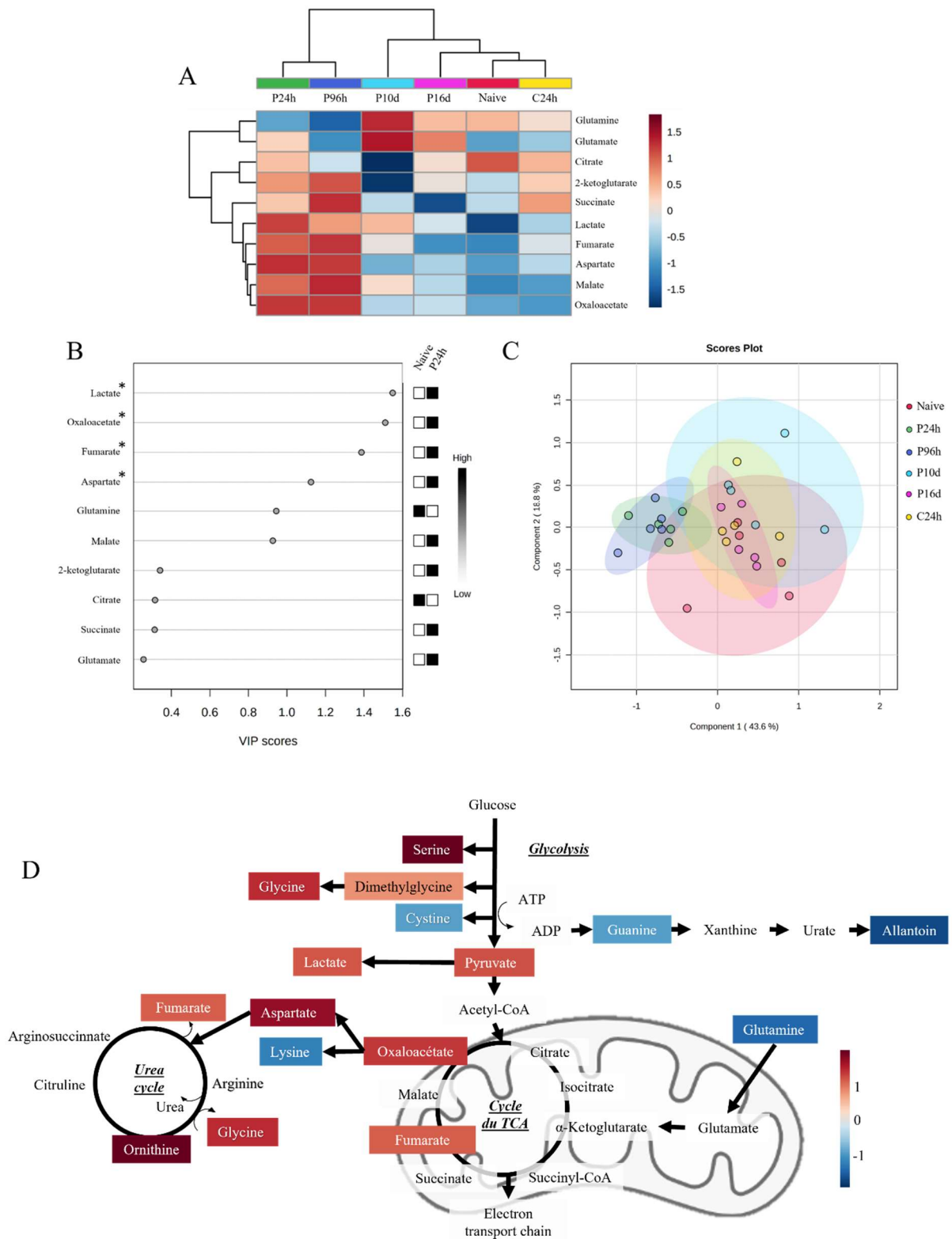


**Figure 9.** Metabolomics analyses targeting 54 hemocyte metabolites. **A.** Heatmap representing in a blue and red gradient, the average quantity of each metabolite for each time points of the infestation kinetic clustered by Euclidean distance. **B.** Comparison of naive vs P24h samples, top 15 metabolites with the best VIP score (>1) (Variable Importance in the Projection) based on the PLS-DA model. Heatmap with white and black boxes represent high and low abundance ratio for the corresponding metabolite in the respective sample. **C.** PLS-DA analysis. PLS-DA score clustering plot for the comparison of the 54 metabolites from the different kinetic times, grouping 5 replicates per condition (colored dots). Colored circles represent 95% confidence intervals. \* Indicate VIP with significant difference (FDR < 0.05) comparing naive to P24h.

Considering that glycolysis and TCA cycle appeared as the metabolites principally accumulating following a primary infestation, we performed targeted metabolomics analyses on 10 specific metabolites of the TCA cycle allowing us to have a more accurate analysis of such pathway (Fig.10). The samples P24h and P96h, clustered together and are the most different compared to the others (Fig.10A and C). The naive and C24h samples are the closest (Fig.10A). This focus on TCA cycle metabolites confirms a metabolic change in hemocytes as early as one-day post primary infestation and the absence of changing following secondary challenge (Fig. 10A). This metabolic shift is moving towards anaerobic glycolysis

(demonstrated by the accumulation of lactate) and an increase activity of the TCA cycle with the accumulation of key metabolites like oxalate, fumarate, aspartate (significant accumulating VIP, FDR < 0.05) (Fig. 10B). This shift in energy production by the hemocytes lasts at least until 4 days post primary infestation and progressively returns to a state similar to naïve hemocytes from day 10 to day 16. The C24h sample clustered with the naive and P16d samples and no significant changes in VIP quantification could be observed. Finally, all the targeted metabolomics data grouped together show a strong activation of glycolysis and TCA cycle but also the urea cycle from the first 24 h after primary infestation (Fig. 10D).





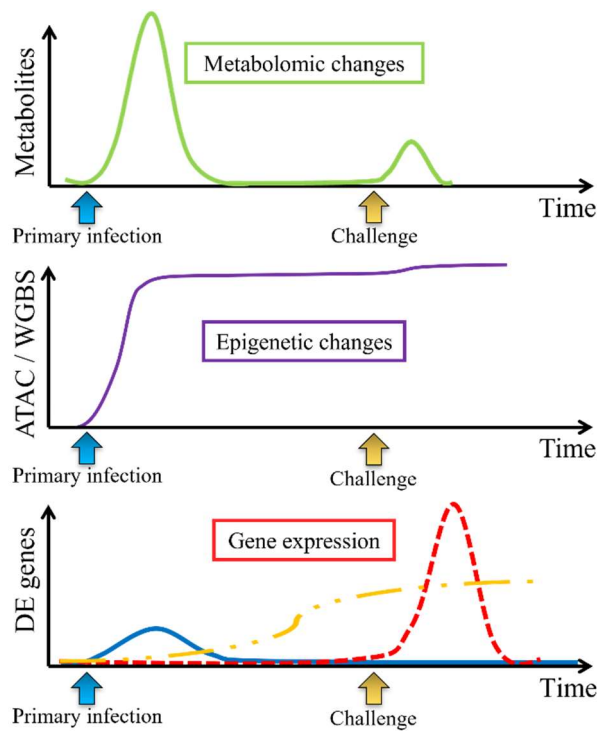
**Figure 10.** Metabolomics analyses targeting 10 specific metabolites from the TCA cycle in hemocytes. **A.** Heatmap representing in a blue and red gradient, the average quantity of each metabolite for each time points of the infestation kinetic clustered by Euclidean distance. **B.** Comparison of naive vs P24h samples, top 10 metabolites with the best VIP score ( $>1$ ) (Variable Importance in the Projection) based on the PLS-DA model. Heatmap with white and black boxes represent high and low abundance ratio for the corresponding metabolite in the respective sample. \* Indicate VIP with significant difference ( $FDR < 0.05$ ) comparing naive to P24h. **C.** PLS-DA analysis. PLS-DA score clustering plot for the comparison of the 10 metabolites

from the different kinetic times, grouping 5 replicates per condition (colored dots). Colored circles represent 95% confidence intervals. **D.** Schematic representation of major metabolites, related to glycolysis, TCA cycle and urea cycle, differentially represented in the P24h condition.

## ***Discussion***

Innate immune memory in non-vertebrates is believed to rely on three main processes: (i) a recalled response, involving the activation and dampening of the immune response following a first encounter and neutralization of a pathogen and the faster and stronger activation of the same immune defense compounds in response to a secondary encounter. (ii) a sustained response, involving the long-lasting up-regulation of the same immune effectors after an initial immune infection. And (iii) an immune shift, involving gene clusters activated following primary infection and different clusters of genes activated after the secondary immune challenge (Coustau *et al.*, 2016, Lafont *et al.*, 2020, Greenwood *et al.*, 2017, Pinaud *et al.*, 2016).

Herein, we paid a particular attention to the hemocyte response of *Biomphalaria* snails submitted to primary infection and secondary challenge by its natural parasite *Schistosoma mansoni*. Based on the transcriptomic results (RNAseq), we demonstrate, as observed previously in whole snails (Pinaud *et al.*, 2016, Portela *et al.*, 2013), that the cellular immune response activated after the primary infection is globally limited to hundreds of DE genes, but thousands of genes were activated following the secondary challenge (Fig. 11). From these DE genes, 6.6% assume a recalled pattern, 28.5% a sustained response and 64.9% were associated specifically to the immune shift. Immune shift is particularly strong in hemocytes, stronger than what was observed in whole snails, demonstrating that hemocytes are certainly the main cells carrying innate immune memory (IIM) in *Biomphalaria glabrata*.



**Figure 11.** Basic models of the molecular support of innate immune memory in hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. In response to a primary infection (blue arrows), metabolism (green line) and epigenetic marks (purple line) changes drastically in hemocytes, rather few changes were observed following secondary challenge (yellow arrows) and differential gene expression remained limited (blue line). However, such metabolic and epigenetic reprogramming activate a humoral immune response that may either be sustained in a long-lasting upregulation of immune effectors (broken orange line); or result in a immune shift of humoral effectors (broken red line).

Based on those results we can conclude that IIM is supported by both, a sustained response and a shift response, but those responses appeared very different in their respective roles in the defence of the organism. Induction of the response as early as P16d with a generalist response, which is activated from the primary infection (sustained), would explain the anticipated response that upgrade the immune capacities of hemocytes but results also in the training of hemocytes and their reprogramming. This training contributes to a more specific response (immune shift) which is activated following the secondary challenge. Using enrichment analysis, we were able to identify specific pathways differentially represented in sustained and shift clusters. The sustained response is associated with functions related to membrane receptors, cell proliferation / migration / differentiation and cell metabolism that could be clearly involved in the hemocyte reprogramming, preparing the cells for new capabilities and functions. The immune shift response is associated with cell metabolism (urea / TCA / glucose / OxPhos), regulation of transcription and self/non-self-recognition (pathogen recognition receptors (PRRs)) that can support the high specificity of this immune response (Pinaud *et al.*, 2019) and the huge transcriptional response associated with it, which certainly

requires a very strong energy production in these cells following the secondary challenge. As previously hypothesized (Pinaud *et al.*, 2016, Pinaud *et al.*, 2019), we confirm in the present study that most of the genes differentially regulated at C6h and C12h and the GO functions with which they are associated are directed towards humoral response (Fig.4). Moreover, the persistence of IIM throughout snail life (Pinaud *et al.*, 2019) despite the rather short lifespan of the hemocyte cells in the hemolymph, suggests that the memory of past infections could reside in the hemocyte precursors, such as hematopoietic stem cells present in the hematopoietic organ. However, identify the specific tissue in which the immune memory is stored and reactivated efficiently when needed will deserved further investigations.

Concerning the epigenetic and metabolomic processes in hemocytes, the main changes were observed following the primary infection and quite no changes were observed following the secondary challenge (Fig. 11). This observation is particularly relevant if we consider that hemocytes must acquire new capacities and that, the acquisition of IIM could be related to these changes in the epigenetic landscape and metabolism of hemocytes. When this metabolic and epigenetic reprogramming is stabilized in the hemocytes and IIM acquired (taking around 10 days, (Sire *et al.*, 1998)) then no new changes occur even after a new encounter with the same pathogen during the secondary challenge (Fig. 11).

While many studies have examined the epigenetic based events that support IIM in the mammalian context, little is known about how these ideas may extend to non-vertebrates. This led us to investigate the impact on epigenetic information through analysis of differentially methylated regions and chromatin accessibility between naïve, primary infected and challenged snails. When we look at the functions of the genes that were associated with epigenetic changes, (i) changes in chromatin accessibility (ATACseq : opening or closing chromatin regions) or (ii) hypo / hypermethylation status (WGBS), intriguingly enriched GO functions were perfectly correlated with the GO functions identified in the RNAseq approach. In opening chromatin region of ATACseq we identify functions related to cell metabolism, immunity, cell differentiation/morphogenesis and regulation of transcription. GO functions associated with WGBS relate to cell morphogenesis / development / activation, inflammatory response, mitochondria regulatory process or epigenetic regulation. Interestingly, ATACseq opening regions shared 35.6% of its genes with the sustained response profile and 21.6% with the immune shift response. Thus, increasing chromatin accessibility support more, the sustain immune response than the shift response in IIM. DNA methylation status remains a black box in non-vertebrate animals (Tweedie *et al.*, 1997). Herein, if we were able to identify key gene

functions associated with hypo or hypermethylated DNA regions, we were unable to correlate any of these genes with whatever transcription profiles of the RNAseq approach. The role of DNA methylation in non-vertebrates is to be found elsewhere. Thus, the epigenetic marks analyzed in the present study were perhaps not the only one that we need to use to decrypt the epigenetic support of IIM in *B. glabrata* snails. For example, miRNA or LncRNA were known to influence greatly the regulation of gene expression (Fok *et al.*, 2018, Ha and Kim, 2014, Prabahar and Natarajan, 2017) and histone marks (acetylation or methylation) were also of central importance in the acquisition of immunological memory (Liotti *et al.*, 2022). Unfortunately, CHIPseq that is the best approach to analyze histone mark modifications is not available for *Biomphalaria*, and they currently remained unsuccessful.

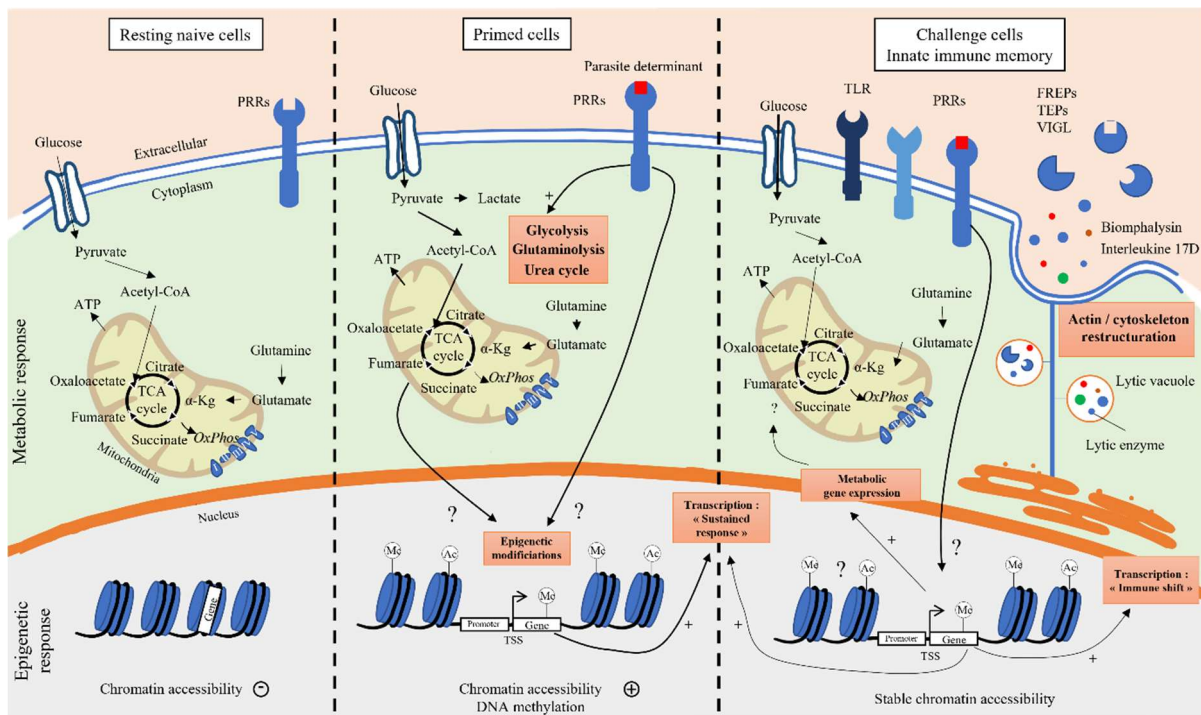
Based on the previous exposed results, cell metabolism appears as a central pillar of IIM acquisition, as metabolic GO functions are always identified in the different omics approaches conducted and more precisely cell metabolism related to tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle, Amino acid synthesis, glycolysis, urea cycle and oxidative phosphorylation (OxPhos) that are particularly recurrent in RNAseq, ATACseq and WGBS. Thus, to validate such metabolic modifications in hemocytes we conduct a targeted metabolomic approach. We were able to describe critical changes in metabolism of hemocytes very early following primary infection with (i) an increase of the glycolysis pathway that is demonstrated by the accumulation of pyruvate and lactate in hemocytes. (ii) Modifications in the urea cycle and urate metabolism with the increase accumulation of ornithine and the decrease of allantoin. (iii) Amino acid synthesis pathway with increase proportion of glycine and serine and decrease of cysteine and lysin. And (iv) truncated TCA cycle due to the glycolysis activation that is demonstrated by the decrease in glutamine (glutaminolysis) and the replenishment of the TCA cycle that results in the accumulation of aspartate, oxalate and fumarate which are parts of TCA cycle metabolites.

The objective of this integrative approach is to join all the results based mainly on similarity between enriched pathway in each specific approach and look at correlation or molecular pathways that were shared between each level of epigenetic, metabolic, and transcriptomic processes investigated. Thus, we believe that following infection by a pathogen, a competent subpopulation of hemocytes could be activated through multistep events of differentiation and reprogramming, involving metabolic, epigenetic, and transcriptomic regulatory processes to enhance hemocyte responses. In response to a primary infection, hemocyte metabolism and epigenetic marks changed drastically, whereas few changes were observed following secondary challenge (Figs. 11 and 12). Such reprogramming activates IIM

in hemocytes and prepare them to achieve the huge transcriptional response towards pathogens that may either be sustained in a long-lasting upregulation of immune effectors or result in the immune shift of more specific humoral effectors (Fig. 11 and 12).

It is important to note that, many genes differentially regulated, or associated with epigenetic changes and metabolites differentially represented in hemocytes during the process of IIM acquisition are mainly involved in multiple interesting pathways and functions already describe in vertebrate trained immunity like glycolysis, pentose phosphate, TCA cycle pathway, urea pathway, lipid metabolism or mitochondrial OxPhos (Netea *et al.*, 2016, Netea *et al.*, 2011, Riksen and Netea, 2021, van der Heijden *et al.*, 2018). Indeed, innate immune cells of vertebrates can adopt long-term inflammatory phenotypes following encounters with a pathogen, this phenomenon is called trained immunity and can improve host defense against (recurrent) infections. The mechanisms supporting trained immunity in vertebrates include principally profound changes in intracellular metabolism, which are closely associated with epigenetic reprogramming. Moreover, glycolysis, glutamine replenishment of the tricarboxylic acid cycle (TCA) with accumulation of fumarate, and the mevalonate pathway have all been identified as critical pathways for trained immunity (Riksen and Netea, 2021). Briefly, trained immunity activation is mediated by changes in cell metabolic pathways that result in epigenetic rewiring of cellular functional programs. Glycolysis and glutaminolysis pathway are indispensable for the induction of trained immunity. Fumarate accumulation, due to glutamine replenishment of the TCA cycle, induce monocyte epigenetic reprogramming by inhibiting KDM5 histone demethylases and fumarate itself can induced epigenetic changes in immune cells (Arts *et al.*, 2016a, Arts *et al.*, 2016b). Intermediates from glucose catabolism during glycolysis can branch out through the serine one-carbon metabolism to generate amino acids of serine and glycine fueling into the folate and methionine cycle to generate S-adenosyl-methionine (SAM) (Lio and Huang, 2020). SAM might drive metabolic and epigenetic reprogramming by histone and DNA methylation which plays a central role in chromatin dynamics and gene expression patterns (Ferreira *et al.*, 2022). Shift in energy production in innate immune cells is known as Warburg effect which is one such signature of how glycolysis influences metabolic shift during trained immunity. In cells, Warburg effect results in the repression of energy production through TCA cycle and OxPhos and enhance the inducible process of “aerobic glycolysis” consisting of high level of glucose uptake and glycolysis followed by lactate fermentation taking place in the cytosol (Riksen and Netea, 2021).

During IIM acquisition, following primary infection and secondary challenge, very similar molecular processes were observed in *B. glabrata* (Fig.11). On the one hand, to give to the cells enough energy to allow the activation of transcription, differentiation, proliferation and development, hemocytes need to activate different metabolic pathways (Fanucchi *et al.*, 2021, Ferreira *et al.*, 2022). First, we observed a reversal of ATP production through specific pathways such as aerobic glycolysis, glutaminolysis, and shut down of OxPhos mitochondrial respiratory chain (Warburg effect) (Fig.12). The activation of these new metabolic pathways results in the accumulation of metabolites that play a very important role in the regulation of various epigenetic enzymes by acting as a cofactor (Fanucchi *et al.*, 2021). As early as P24h, a shift in the metabolism of amino acids is observed and increasing evidence support that cellular amino acid metabolism shapes the fate of immune cells (Wang *et al.*, 2021) (Fig. 12). Focus on TCA cycle analyses highlights the breakdown of TCA cycle with accumulation of metabolites such as fumarate, aspartate, oxalate found more strongly expressed at P24h and P96h that have a proven role in the acquisition of trained immunity in vertebrates by promoting or prevent demethylation (Arts *et al.*, 2016b). We observed also modifications in the urea cycle, and it has been demonstrated that urates alter the epigenetic landscape in selected human monocytes (Badii *et al.*, 2021), and urate metabolites can induce innate immune memory (Cabau *et al.*, 2020). Finally, insulin signaling pathway was also modified in hemocytes, and insulin signaling, and resistance has been shown to promote training of immune cells (Ieronymaki *et al.*, 2019). To conclude, trained hemocytes had altered metabolic, epigenetic landscapes, transcriptional profiles and provided greater protection against *S. mansoni* infection.



**Figure 12.** Schematic representation of the general mechanisms described in *B. glabrata* hemocytes during innate immune memory acquisition kinetics in response to *S. mansoni* infections. VIGL: Variable immunoglobulin and lectin domain. TLR: Toll like receptor. TEP: thioester-containing protein. FREP: Fibrinogen-related proteins

Through network-level integration of transcriptomics, epigenetics and metabolomics data, we identify central molecular pathways as indispensable for the induction of trained immunity in *Biomphalaria* snail hemocytes but same exist similarly in vertebrate innate immune cells. Based on those conserved mechanisms, we can consider that “trained immunity” occurs in the snail *Biomphalaria glabrata* (Gourbal *et al.*, 2018). The presence of trained immunity characteristics of innate host defence in different animal lineages suggests that trained immunity should be an ancient trait that appeared early in evolution. This ancestral origin of trained immunity was hypothesized in previous opinion papers (Penkov *et al.*, 2019, Gourbal *et al.*, 2018), but our findings demonstrate for the first time that the molecular pathways involved in the memory acquisition of innate immune cells are highly conserved among vertebrates and non-vertebrate phyla. It is thus likely to suggest that memory characteristics of innate host defence in vertebrates would potentially find its origin from non-vertebrate animals. It is therefore reasonable to believe that trained immunity is a general characteristic of the entire living kingdom (Conrath *et al.*, 2015, Milutinovic and Kurtz, 2016, Netea *et al.*, 2011) but this will remain to be demonstrated. More work is now needed to get a comprehensive view of this new concept and requires understanding the nature and origin of these conserved innovations by analyzing its molecular bases across phyla in the animal kingdom in regard of the diversity of interactions studied.



## ***Acknowledgments:***

Thanks to Anaïs Portet and Anne Rognon for their help in sampling the biological material, and experimental infections. BG was supported by ANR JCJC INVIMORY (number ANR 13-JSV7-0009) from the French National Research Agency (ANR). This study is set within the framework of the “Laboratoire d’Excellence (LabEx)” TULIP (ANR-10-LABX-41). We thank the Bio-Environment platform (University of Perpignan *Via Domitia*) for support in library preparation and sequencing.

## ***Author Contributions***

RP, SP, DD, CC, MF, BG conceived and design experiments. SP, JFA perform experiments for ATACseq and RNAseq. CCh analyzed ATACseq data. CCh, RP and SP analyzed RNAseq experiment. MF, SP, CCo, RG, BG recovered hemolymph for bisulfite experiment. RL, MF, CCo, CCh, and CG analyzed bisulfite sequencing data. RP, RG, DD and BG recovered biological material for metabolomics, ET, AT and RP analyzed metabolomics sequencing data. RP, RG and BG performed and analyzed GO enrichments for all the experimental approaches. All authors drafted the manuscript and participated in the writing and reviewing of the manuscript. All authors read and approve the final version of the manuscript.

## ***References***

- Basic Local Alignment Search Tool [Online]. Available: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [Accessed].
- ADEMA, C. M., HILLIER, L. W., JONES, C. S., LOKER, E. S., KNIGHT, M., MINX, P., OLIVEIRA, G., RAGHAVAN, N., SHEDLOCK, A., DO AMARAL, L. R., ARICAN-GOKTAS, H. D., ASSIS, J. G., BABA, E. H., BARON, O. L., BAYNE, C. J., BICKHAM-WRIGHT, U., BIGGAR, K. K., BLOUIN, M., BONNING, B. C., BOTKA, C., BRIDGER, J. M., BUCKLEY, K. M., BUDDENBORG, S. K., LIMA CALDEIRA, R., CARLETON, J., CARVALHO, O. S., CASTILLO, M. G., CHALMERS, I. W., CHRISTENSENS, M., CLIFTON, S., COSSEAU, C., COUSTAU, C., CRIPPS, R. M., CUESTA-ASTROZ, Y., CUMMINS, S. F., DI STEPHANO, L., DINGUIRARD, N., DUVAL, D., EMRICH, S., FESCHOTTE, C., FEYEREISEN, R., FITZGERALD, P., FRONICK, C., FULTON, L., GALINIER, R., GAVA, S. G., GEUSZ, M., GEYER, K. K., GIRALDO-CALDERON, G. I., DE SOUZA GOMES, M., GORDY, M. A., GOURBAL, B., GRUNAU, C., HANINGTON, P. C., HOFFMANN, K. F., HUGHES, D., HUMPHRIES, J., JACKSON, D. J., JANNOTTI-PASSOS, L. K., DE JESUS JEREMIAS, W., JOBLING, S., KAMEL, B., KAPUSTA, A., KAUR, S., KOENE, J. M., KOHN, A. B., LAWSON, D., LAWTON, S. P., LIANG, D., LIMPANONT, Y., LIU, S., LOCKYER, A. E., LOVATO, T. L., LUDOLF, F., MAGRINI, V., MCMANUS, D. P., MEDINA, M., MISRA, M., MITTA, G., MKOJI, G. M., MONTAGUE, M. J., MONTELONGO, C., MOROZ, L. L., MUNOZ-TORRES, M. C., NIAZI, U., NOBLE, L. R., OLIVEIRA, F. S., PAIS, F. S., PAPPENFUSS, A. T., PEACE, R., PENA, J. J., PILA, E. A., QUELAIS, T., RANEY, B. J., RAST, J. P., ROLLINSON, D., ROSSE, I. C., ROTGANS, B., ROUTLEDGE, E. J., RYAN, K. M., *et al.* 2017. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nat Commun*, 8, 15451.

- AKALIN, A., KORMAKSSON, M., LI, S., GARRETT-BAKELMAN, F. E., FIGUEROA, M. E., MELNICK, A. & MASON, C. E. 2012. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol*, 13, R87.
- ALLIENNE, J. F., THERON, A. & GOUBAL, B. 2011. Recovery of primary sporocysts in vivo in the *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata* model using a simple fixation method suitable for extraction of genomic DNA and RNA. *Exp Parasitol*, 129, 11-6.
- ANDERS, S., PYL, P. T. & HUBER, W. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 166-9.
- ARTS, R. J., JOOSTEN, L. A. & NETEA, M. G. 2016a. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin Immunol*, 28, 425-430.
- ARTS, R. J., NOVAKOVIC, B., TER HORST, R., CARVALHO, A., BEKKERING, S., LACHMANDAS, E., RODRIGUES, F., SILVESTRE, R., CHENG, S. C., WANG, S. Y., HABIBI, E., GONCALVES, L. G., MESQUITA, I., CUNHA, C., VAN LAARHOVEN, A., VAN DE VEERDONK, F. L., WILLIAMS, D. L., VAN DER MEER, J. W., LOGIE, C., O'NEILL, L. A., DINARELLO, C. A., RIKSEN, N. P., VAN CREVEL, R., CLISH, C., NOTEBAART, R. A., JOOSTEN, L. A., STUNNENBERG, H. G., XAVIER, R. J. & NETEA, M. G. 2016b. Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab*, 24, 807-819.
- BADII, M., GAAL, O. I., CLEOPHAS, M. C., KLUCK, V., DAVAR, R., HABIBI, E., KEATING, S. T., NOVAKOVIC, B., HELSEN, M. M., DALBETH, N., STAMP, L. K., MACARTNEY-COXSON, D., PHIPPS-GREEN, A. J., STUNNENBERG, H. G., DINARELLO, C. A., MERRIMAN, T. R., NETEA, M. G., CRISAN, T. O. & JOOSTEN, L. A. B. 2021. Urate-induced epigenetic modifications in myeloid cells. *Arthritis Res Ther*, 23, 202.
- BARTUREN, G., RUEDA, A., OLIVER, J. L. & HACKENBERG, M. 2013. MethylExtract: High-Quality methylation maps and SNV calling from whole genome bisulfite sequencing data. *F1000Res*, 2, 217.
- BONFIM, T., MARTINS, F. G., TUNHOLI-ALVES, V. M., LIMA, M. G., MOTA, E. M., MALDONADO, A., JR., PINHEIRO, J. & GARCIA, J. 2020. Evaluation of changes in the carbohydrate metabolism of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 exposed to experimental coinfection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda) and *Echinostoma paraensei* (Trematoda). *J Invertebr Pathol*, 170, 107314.
- BUENROSTRO, J. D., GIRESI, P. G., ZABA, L. C., CHANG, H. Y. & GREENLEAF, W. J. 2013. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*, 10, 1213-8.
- CABAU, G., CRISAN, T. O., KLUCK, V., POPP, R. A. & JOOSTEN, L. A. B. 2020. Urate-induced immune programming: Consequences for gouty arthritis and hyperuricemia. *Immunol Rev*, 294, 92-105.
- CHONG, J., WISHART, D. S. & XIA, J. 2019. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*, 68, e86.
- CONESA, A., GOTZ, S., GARCIA-GOMEZ, J. M., TEROL, J., TALON, M. & ROBLES, M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 3674-6.
- CONRATH, U., BECKERS, G. J., LANGENBACH, C. J. & JASKIEWICZ, M. R. 2015. Priming for enhanced defense. *Annu Rev Phytopathol*, 53, 97-119.
- COOPER, D. & ELEFThERIANOS, I. 2017. Memory and Specificity in the Insect Immune System: Current Perspectives and Future Challenges. *Front Immunol*, 8, 539.
- COUSTAU, C., KURTZ, J. & MORET, Y. 2016. A Novel Mechanism of Immune Memory Unveiled at the Invertebrate-Parasite Interface. *Trends Parasitol*, 32, 353-5.
- DE SENA BRANDINE, G. & SMITH, A. D. 2019. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Res*, 8, 1874.
- DOBIN, A., DAVIS, C. A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, C., JHA, S., BATUT, P., CHAISSON, M. & GINGERAS, T. R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15-21.
- DURBIN, B. P., HARDIN, J. S., HAWKINS, D. M. & ROCKE, D. M. 2002. A variance-stabilizing transformation for gene-expression microarray data. *Bioinformatics*, 18 Suppl 1, S105-10.

- FANUCCHI, S., DOMINGUEZ-ANDRES, J., JOOSTEN, L. A. B., NETEA, M. G. & MHLANGA, M. M. 2021. The Intersection of Epigenetics and Metabolism in Trained Immunity. *Immunity*, 54, 32-43.
- FERREIRA, A. V., DOMIGUEZ-ANDRES, J. & NETEA, M. G. 2022. The Role of Cell Metabolism in Innate Immune Memory. *J Innate Immun*, 14, 42-50.
- FNEICH, S., DHEILLY, N., ADEMA, C., ROGNON, A., REICHEL, M., BULLA, J., GRUNAU, C. & COSSEAU, C. 2013. 5-methyl-cytosine and 5-hydroxy-methyl-cytosine in the genome of *Biomphalaria glabrata*, a snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors*, 6, 167.
- FOK, E. T., DAVIGNON, L., FANUCCHI, S. & MHLANGA, M. M. 2018. The lncRNA Connection Between Cellular Metabolism and Epigenetics in Trained Immunity. *Front Immunol*, 9, 3184.
- GARDINER, C. M. & MILLS, K. H. 2016. The cells that mediate innate immune memory and their functional significance in inflammatory and infectious diseases. *Semin Immunol*, 28, 343-50.
- GIARDINE, B., RIEMER, C., HARDISON, R. C., BURHANS, R., ELNITSKI, L., SHAH, P., ZHANG, Y., BLANKENBERG, D., ALBERT, I., TAYLOR, J., MILLER, W., KENT, W. J. & NEKRUTENKO, A. 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res*, 15, 1451-5.
- GIRALDO-CALDERON, G. I., EMRICH, S. J., MACCALLUM, R. M., MASLEN, G., DIALYNAS, E., TOPALIS, P., HO, N., GESING, S., VECTORBASE, C., MADEY, G., COLLINS, F. H. & LAWSON, D. 2015. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Res*, 43, D707-13.
- GOURBAL, B., PINAUD, S., BECKERS, G. J. M., VAN DER MEER, J. W. M., CONRATH, U. & NETEA, M. G. 2018. Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunol Rev*, 283, 21-40.
- GREENWOOD, J. M., MILUTINOVIC, B., PEUSS, R., BEHRENS, S., ESSER, D., ROSENSTIEL, P., SCHULENBURG, H. & KURTZ, J. 2017. Oral immune priming with *Bacillus thuringiensis* induces a shift in the gene expression of *Tribolium castaneum* larvae. *BMC Genomics*, 18, 329.
- GUILLOU, F., ROGER, E., MONE, Y., ROGNON, A., GRUNAU, C., THERON, A., MITTA, G., COUSTAU, C. & GOURBAL, B. E. 2007. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol Biochem Parasitol*, 155, 45-56.
- HA, M. & KIM, V. N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 509-24.
- HAUTON, C. & SMITH, V. J. 2007. Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. *Bioessays*, 29, 1138-46.
- IERONYMAKI, E., DASKALAKI, M. G., LYRONI, K. & TSATSANIS, C. 2019. Insulin Signaling and Insulin Resistance Facilitate Trained Immunity in Macrophages Through Metabolic and Epigenetic Changes. *Front Immunol*, 10, 1330.
- JENKINS, A. M. & MUSKAVITCH, M. A. 2015. Evolution of an epigenetic gene ensemble within the genus *Anopheles*. *Genome Biol Evol*, 7, 901-15.
- KEIL, C., LEACH, R., BEZAWADA, S., PARSONS, L. & BARSHNIKOVA, A. 2016. Treeview 3.0 (beta 1) - Visualization and analysis of large data matrices. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1303402>. [Online]. [Accessed].
- KORTHAUER, K., CHAKRABORTY, S., BENJAMINI, Y. & IRIZARRY, R. A. 2019. Detection and accurate false discovery rate control of differentially methylated regions from whole genome bisulfite sequencing. *Biostatistics*, 20, 367-383.
- KRUEGER, F. 2015. Trim Galore!: a wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files. In., [http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/), 0.4.5 edn: Bioconda. [Online]. [Accessed].
- KRUEGER, F. & ANDREWS, S. R. 2011. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 27, 1571-2.
- KURTZ, J. 2004. Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes Infect*, 6, 1410-7.
- LAFONT, M., VERGNES, A., VIDAL-DUPIOL, J., DE LORGERIL, J., GUEGUEN, Y., HAFFNER, P., PETTON, B., CHAPARRO, C., BARRACHINA, C., DESTOUMIEUX-GARZON, D., MITTA, G., GOURBAL, B. & MONTAGNANI, C. 2020. A Sustained Immune Response Supports Long-Term Antiviral Immune Priming in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *mBio*, 11.

- LANZ-MENDOZA, H. & CONTRERAS-GARDUNO, J. 2022. Innate immune memory in invertebrates: Concept and potential mechanisms. *Dev Comp Immunol*, 127, 104285.
- LIMA, M. G., TUNHOLI-ALVES, V. M., GAUDENCIO, F. N., MARTINS, F. G., CASTRO, R. N., THIENGO, S. C., GARCIA, J. S., MALDONADO, A., JR. & PINHEIRO, J. 2016. The influence of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) infection on the aerobic metabolism of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Gastropoda). *Exp Parasitol*, 171, 1-9.
- LIO, C. J. & HUANG, S. C. 2020. Circles of Life: linking metabolic and epigenetic cycles to immunity. *Immunology*, 161, 165-174.
- LIOTTI, A., FERRARA, A. L., LOFFREDO, S., GALDIERO, M. R., VARRICCHI, G., DI RELLA, F., MANISCALCO, G. T., BELARDO, M., VASTANO, R., PRENCIPE, R., PIGNATA, L., ROMANO, R., SPADARO, G., DE CANDIA, P., PEZONE, A. & DE ROSA, V. 2022. Epigenetics: An opportunity to shape innate and adaptive immune responses. *Immunology*, 167, 451-470.
- LITTLE, T. J., COLEGRAVE, N., SADD, B. M. & SCHMID-HEMPEL, P. 2008. Studying immunity at the whole organism level. *Bioessays*, 30, 404-5; author reply 406.
- LIU, Q. X., SU, Z. P., LIU, H. H., LU, S. P., ZHAO, Y., MA, B., HOU, Y. M. & SHI, Z. H. 2022. Current understanding and perspectives on the potential mechanisms of immune priming in beetles. *Dev Comp Immunol*, 127, 104305.
- LOVE, M. I., HUBER, W. & ANDERS, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15, 550.
- LUVIANO, N., LOPEZ, M., GAWEHNS, F., CHAPARRO, C., ARIMONDO, P. B., IVANOVIC, S., DAVID, P., VERHOEVEN, K., COSSEAU, C. & GRUNAU, C. 2021. The methylome of *Biomphalaria glabrata* and other mollusks: enduring modification of epigenetic landscape and phenotypic traits by a new DNA methylation inhibitor. *Epigenetics Chromatin*, 14, 48.
- MENDES, T. M. F., CARRILHO, E., AFONSO, A., GALINARO, C. A., CABRAL, F. J. & ALLEGRETTI, S. M. 2019. Proteomic, metabolic and immunological changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*, 49, 1049-1060.
- MILUTINOVIC, B. & KURTZ, J. 2016. Immune memory in invertebrates. *Semin Immunol*, 28, 328-42.
- MILUTINOVIC, B., PEUSS, R., FERRO, K. & KURTZ, J. 2016. Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *Zoology (Jena)*, 119, 254-61.
- MITTA, G., GALINIER, R., TISSEYRE, P., ALLIENNE, J. F., GIRERD-CHAMBAZ, Y., GUILLOU, F., BOUCHUT, A. & COUSTAU, C. 2005. Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Dev Comp Immunol*, 29, 393-407.
- MONE, Y., GOURBAL, B., DUVAL, D., DU PASQUIER, L., KIEFFER-JAQUINOD, S. & MITTA, G. 2010. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. *PLoS Negl Trop Dis*, 4.
- NETEA, M. G., JOOSTEN, L. A., LATZ, E., MILLS, K. H., NATOLI, G., STUNNENBERG, H. G., O'NEILL, L. A. & XAVIER, R. J. 2016. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352, aaf1098.
- NETEA, M. G., QUINTIN, J. & VAN DER MEER, J. W. 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*, 9, 355-61.
- OLIVEROS, J. C. & 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> [Online]. [Accessed].
- PANG, Z., ZHOU, G., EWALD, J., CHANG, L., HACARIZ, O., BASU, N. & XIA, J. 2022. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nat Protoc*, 17, 1735-1761.
- PENKOV, S., MITROULIS, I., HAJISHENGALLIS, G. & CHAVAKIS, T. 2019. Immunometabolic Crosstalk: An Ancestral Principle of Trained Immunity? *Trends Immunol*, 40, 1-11.
- PINAUD, S., PORTELA, J., DUVAL, D., NOWACKI, F. C., OLIVE, M. A., ALLIENNE, J. F., GALINIER, R., DHEILLY, N. M., KIEFFER-JAQUINOD, S., MITTA, G., THERON, A. & GOURBAL, B. 2016. A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathogens*, 12, e1005361.

- PINAUD, S., PORTET, A., ALLIENNE, J. F., BELMUDES, L., SAINT-BEAT, C., ARANCIBIA, N., GALINIER, R., DU PASQUIER, L., DUVAL, D. & GOURBAL, B. 2019. Molecular characterisation of immunological memory following homologous or heterologous challenges in the schistosomiasis vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol*, 92, 238-252.
- PORTELA, J., DUVAL, D., ROGNON, A., GALINIER, R., BOISSIER, J., COUSTAU, C., MITTA, G., THERON, A. & GOURBAL, B. 2013. Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. *J Innate Immun*, 5, 261-76.
- PRABAHAR, A. & NATARAJAN, J. 2017. Prediction of microRNAs involved in immune system diseases through network based features. *J Biomed Inform*, 65, 34-45.
- RCORETEAM. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. [Online]. [Accessed].
- RIKSEN, N. P. & NETEA, M. G. 2021. Immunometabolic control of trained immunity. *Mol Aspects Med*, 77, 100897.
- SIRE, C., ROGNON, A. & THERON, A. 1998. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology*, 117 ( Pt 2), 117-22.
- SULEK, M., KORDACZUK, J. & WOJDA, I. 2021. Current understanding of immune priming phenomena in insects. *J Invertebr Pathol*, 185, 107656.
- SUPEK, F., BOSNJAK, M., SKUNCA, N. & SMUC, T. 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, 6, e21800.
- THERON, A., PAGES, J. R. & ROGNON, A. 1997. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Experimental Parasitology*, 85, 1-9.
- THORVALDSDOTTIR, H., ROBINSON, J. T. & MESIROV, J. P. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, 14, 178-92.
- TUNHOLI-ALVES, V. M., TUNHOLI, V. M., AMARAL, L. S., DA SILVA GARCIA, J., LIMA, M. G., DAMATTA, R. A. & PINHEIRO, J. 2019. Alterations in the Mitochondrial Physiology of *Biomphalaria glabrata* (*Mollusca: Gastropoda*) After Experimental Infection by *Angiostrongylus cantonensis* (*Nematoda: Metastrongylidae*). *Acta Parasitol*, 64, 693-699.
- TWEEDIE, S., CHARLTON, J., CLARK, V. & BIRD, A. (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Molecular and cellular biology*, 17, 1469–1475. *Am Soc Microbiol*.
- VAN DEN BERG, R. A., HOEFSLOOT, H. C., WESTERHUIS, J. A., SMILDE, A. K. & VAN DER WERF, M. J. 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7, 142.
- VAN DER HEIJDEN, C., NOZ, M. P., JOOSTEN, L. A. B., NETEA, M. G., RIKSEN, N. P. & KEATING, S. T. 2018. Epigenetics and Trained Immunity. *Antioxid Redox Signal*, 29, 1023-1040.
- WANG, H., ZHENG, X., LIU, B., XIA, Y., XIN, Z., DENG, B., HE, L., DENG, J. & REN, W. 2021. Aspartate Metabolism Facilitates IL-1beta Production in Inflammatory Macrophages. *Front Immunol*, 12, 753092.

## **C. Caractériser la réponse métabolique des hémocytes, un défi avant tout technique**

### **1. Exploration du métabolisme de *B. glabrata***

Dans cette partie, j'ai souhaité aborder, sous la forme de résultat/discussion, les recherches menées sur le métabolisme des hémocytes de *Biomphalaria* en réponse à des infestations et réinfestations par *S. mansoni*. Certes, ces études ne peuvent faire l'objet de publications scientifiques du fait du manque de résultats significatifs. Cependant, ces analyses nous ont permis d'avancer un peu plus dans la compréhension des changements métaboliques des hémocytes. Mais surtout, certaines des techniques utilisées se sont révélées particulièrement efficaces et indispensables à la poursuite de ces recherches sur la manipulation de ce métabolisme hémocytaire et de son lien avec la mémoire immunitaire innée du mollusque.

Les similarités de mécanisme d'acquisition de la mémoire immunitaire chez *Biomphalaria* comparée aux vertébrés, principalement dans les domaines des changements épigénétiques, ont dirigé notre recherche vers d'autres mécanismes cellulaires, comme les changements métaboliques des hémocytes. En effet, comme nous l'avons vu en introduction de ce premier chapitre, la deuxième marque d'une cellule entraînée chez les vertébrés repose sur de profonds changements métaboliques cellulaires. Ainsi, nous avons souhaité déterminer si les hémocytes de *Biomphalaria* avaient besoin de modifier leur métabolisme pour accumuler les métabolites spécifiques nécessaires aux diverses modifications épigénétiques que nous observions aussi dans les hémocytes. Les premières approches de caractérisation du métabolisme des hémocytes avaient pour but de développer des techniques relativement simples d'utilisation, nécessitant peu de matériel (nombre de cellules et d'animaux utilisés) et peu coûteuses, afin de nous permettre de suivre ces cellules au cours d'une cinétique longue d'acquisition de la MII contre *S. mansoni*. L'un des mécanismes métaboliques que nous pensions le plus simple à observer, était le revirement de la production d'énergie de la voie de l'OxPhos vers la voie de la glycolyse anaérobie. Pour rappel, ce mécanisme, que l'on nomme « Warburg effect », est décrit, entre autres, dans les monocytes de vertébrés, permettant leur différenciation en macrophages dits « entraînés » (Cheng *et al.*, 2014; Bekkering *et al.*, 2016). Mais c'est aussi une marque de cellules cancéreuses et est décrit pour la première fois dans ces cellules (Warburg *et al.*, 1927). Pour *Biomphalaria*, la recherche de ces changements métaboliques dans les hémocytes s'est révélée complexe à observer. Nous avons dû passer par l'utilisation de plusieurs techniques, avant d'utiliser celles présentées dans le premier article de ce premier chapitre de thèse (Pichon *et al.*, 2023).

Ainsi, pour démontrer la présence d'un « effet Warburg » dans les hémocytes, nous devions être capables de cibler certains métabolites spécifiques de la voie de la glycolyse et/ou de la voie de l'OxPhos. Cet « effet Warburg » se caractérise principalement par une plus grande utilisation de glucose, étant donné la suractivation de la voie de la glycolyse ; mais, en conséquence de celle-ci, les cellules vont augmenter leur production de lactate. C'est donc sur ces deux métabolites particuliers que dans un premier temps, nous avons consacré nos efforts.

## ***2. Des approches directes et indirectes de la mesure des métabolites dans les cellules***

L'utilisation de kits de dosage (MAK065-1KT) ciblant des métabolites spécifiques tels que le glucose et le lactate, semblaient être la solution la plus simple ; ces techniques sont faciles à utiliser et peu coûteuses. Cependant, du fait de l'impossibilité de récolter un nombre suffisant d'hémocytes, ces analyses se sont avérées être peu précises et surtout trop peu résolutes, empêchant une quelconque exploitation des résultats obtenus. En parallèle de ces expériences, nous avons choisi de tester à nouveau l'induction de la glycolyse par l'intermédiaire de la production d'acide lactique ou lactate. Le but étant de confirmer ce possible shift métabolique, du moins au niveau de l'organisme entier, autrement dit en testant directement l'hémolymphe de l'animal, et de déterminer la capacité de mesure de ce type de métabolites dans le modèle *Biomphalaria* par les kits commerciaux. Nous savions déjà, grâce aux analyses de protéomique menées sur les hémocytes (Figure 9), qu'un changement métabolique pouvait s'opérer dans ces cellules (Mendes *et al.*, 2019). Ainsi, dans le but de confirmer ces changements métaboliques à la suite de la primo infestation, mais aussi après le challenge, des échantillons de plasma ont été récupérés. Des pools de 15 mollusques (BgBRE), provenant de plusieurs points de cinétiques d'infestation (24h post primo infestation (P24h), 96h post primo infestation (P96d), 10 jours post primo infestation (P10j) et 16 jours post primo infestation (P16j) et de réinfestation (24h post challenge (C24h)) par SmBRE, ont été réalisés en triplicat et le lactate, présent dans ces échantillons, mesuré à l'aide d'un kit commercial (MAK065-1KT).

Les concentrations de lactate dans le plasma des mollusques sont très faibles (Figure 10), restent constantes pendant au moins les 4 premiers jours après la primo infestation (P24h et P96h) et ont tendance à diminuer dès le 10<sup>e</sup> jour post primo infestation. En comparant le 16<sup>e</sup> jour post primo infestation et le 1<sup>er</sup> jour post challenge (P16d et C24h), nous constatons que la concentration plasmatique en lactate est significativement augmentée en réponse à la seconde infestation (Figure 10). Ces résultats nous permettent de démontrer une activation de la

glycolyse à la suite du challenge, comme nous le soupçonnions à partir de l'analyse RNA seq sur hémocytes. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas de montrer une induction de cette voie métabolique à la suite de la première infestation, comme nous le supposions et comme cela a été décrit dans les travaux de Mendes *et al.* 2019. Or, ces analyses sont réalisées sur le plasma du mollusque, ce qui ne permet pas d'interpréter les résultats au niveau hémocytaire mais au niveau de l'organisme entier. Et donc, peut-être que d'autres organes jouent un rôle important dans la production de lactate, rôle peut-être plus important que le seul compartiment hémocytaire. Il reste donc toujours à définir si dans les hémocytes, nous pouvons déceler de tels changements métaboliques.

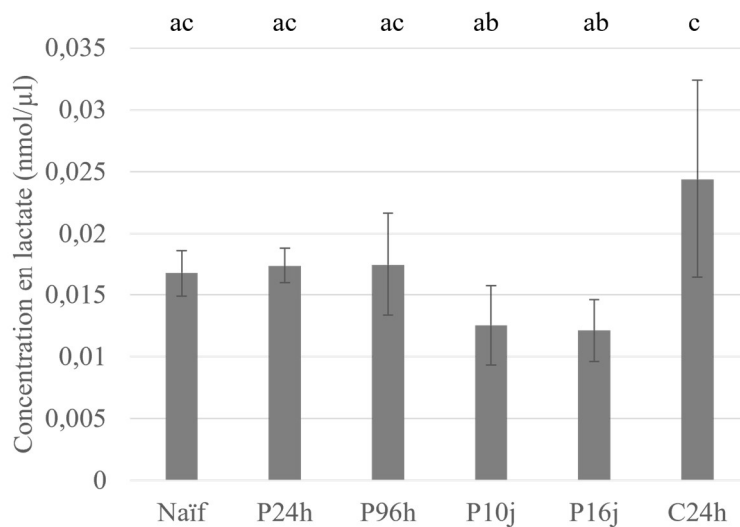


Figure 10: Diagramme en barre représentant la concentration en lactate (nmol/μl) du plasma de BgBRE au cours d'une cinétique d'infestation et de réinfestation par *S. mansoni*. Les moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes (Test de rang Kruskal-Wallis et post-hoc Dunn test ajustés par la méthode FDR de Benjamini-Hochberg ( $P$ -value < 0.05)).

Étant incapables de détecter avec fiabilité ces métaboliques directement dans les hémocytes, nous avons été contraints de mesurer les métabolites de façon indirecte dans le milieu de maintenance des hémocytes *in vitro*. L'hypothèse est alors que, d'une part, si un shift métabolique de type « effet Warburg » se produit dans les hémocytes à la suite d'une première et/ou d'une seconde rencontre avec le parasite, alors les hémocytes que nous pourrions récupérer de ces individus auraient une capacité plus importante à récupérer le glucose de leur milieu. D'autre part, ils seraient capables de produire une plus grande quantité de lactate qui, considéré comme un déchet par les cellules, serait libéré et viendrait enrichir le milieu de culture avec ce métabolite spécifique, comme nous avons pu le mesurer lors des expériences précédentes (Figure 10). C'est dans cette optique précise que nous avons fait le choix de tester différentes techniques reposant principalement sur le maintien *in vitro* d'hémocytes dans des milieux de culture contrôlés.



### 3. Utilisation de kits de dosage et de la technique Ysi

Les hémocytes d'un pool de 30 mollusques BgBRE (soit environ 200 000 cellules) ont été récupérés 16 jours (P16j) après la primo infestation par *S. mansoni*, ainsi qu'un jour après le challenge (C24h) et un pool de mollusques naïfs n'ayant pas subi d'infestation par le parasite, comme contrôle pour les expériences. Les hémocytes récupérés (environ 200 cellules/ $\mu$ l) ont été déposés dans une plaque 12 puits en triplicat, et laissés adhérer naturellement pendant 1h en présence d'un cocktail d'antibiotiques (Sigma A5955, [5x]). Le plasma est ensuite retiré et remplacé par du milieu Bge (Hansen, 1976), complété avec du glucose et des antibiotiques [1x], et les cellules laissées en chambre de culture à 27°C. Cette expérience a été réalisée deux fois en parallèle pour, d'un côté, tester la déplétion du glucose et l'augmentation du lactate dans le milieu de culture par des approches utilisant des kits de dosages commerciaux, et d'un autre côté, réaliser les mêmes tests grâce à la technique Ysi (voir description ci-dessous). Une fraction du surnageant de chaque puits (300 $\mu$ l) est alors prélevée en triplicat à 5, 10 et 24h suivant le changement de milieu de maintien des hémocytes. Une partie des échantillons est alors stockée à -20°C pour l'analyse Ysi, et l'autre partie des échantillons est immédiatement mesurée grâce aux kits de dosage. Les hémocytes sont maintenus dans un volume conséquent de milieu Bge (0.65 ml) afin de ne pas induire de biais causés par les prélèvements successifs de 300 $\mu$ l de milieu pour les 3 temps nécessaires aux analyses.

Concernant les mesures de glucose et de lactate par l'utilisation de kits de dosage commerciaux, les résultats n'ont pas du tout été concluants. Les changements de concentration de ces métabolites dans les puits contenant les hémocytes étant très faibles, ces kits se retrouvent incapables de mesurer correctement, par manque de sensibilité. Le seul moyen de corriger ce type de problème serait d'augmenter significativement le nombre d'hémocytes à tester, et donc le nombre de mollusques par condition. Mais le nombre de mollusques nécessaires pour cela est complexe à obtenir, d'autant plus lorsqu'il existe d'autres techniques capables de mesurer plus précisément ces métabolites. Il a donc été décidé d'effectuer d'autres analyses plus sensibles en utilisant des outils technologiques plus puissants, tels que les équipements YSI. Cette technique utilise une technologie basée sur des réactions enzymatiques dirigées contre le glucose ou le lactate, couplée à une mesure précise de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par des électrodes en platine capables d'oxyder ce composé et de produire des électrons, dont la présence est proportionnelle à la quantité de métabolite présent dans la solution de départ. Malheureusement, les résultats obtenus pour le glucose (Figure 11) et le lactate (Figure 12) ne sont pas concluants. Nous observons une tendance à la diminution de la quantité de glucose dans le milieu pour les

échantillons naïfs, mais aucun changement et voire une tendance à l'augmentation de la quantité de glucose pour les échantillons provenant de cellules primo infestées ou challengées.

Concernant la mesure du lactate, aucun changement significatif n'est observé, du fait très probable de la très faible quantité de ce métabolite détecté dans le milieu de culture des hémocytes. Mais les problèmes de ces expériences, qui nous empêchent d'avoir des résultats exploitables, viennent probablement des hémocytes et de notre capacité à les maintenir en culture sans qu'ils ne s'agrègent ou meurent. Car nous aurions tout de même dû observer, au cours du temps, une déplétion du glucose et une augmentation du lactate, même minime. En effet, nous utilisons des primo-cultures d'hémocytes, et nous sommes actuellement incapables de les garder en culture, viables et fonctionnels plus de 24-48h. De plus, les temps choisis pour ces expériences ne nous permettent peut-être pas d'observer les changements métaboliques de ces hémocytes. D'après les analyses de métabolomique ciblée (Cf. Chapitre IB), le shift métabolique vers la voie de la glycolyse n'est visible que 96h suivant la primo infestation, ensuite, le métabolisme revient à un état basal, naïf. Donc, à 16 jours suivant la primo infestation, le métabolisme des cellules est revenu à un état naïf comme pour le temps C24h.

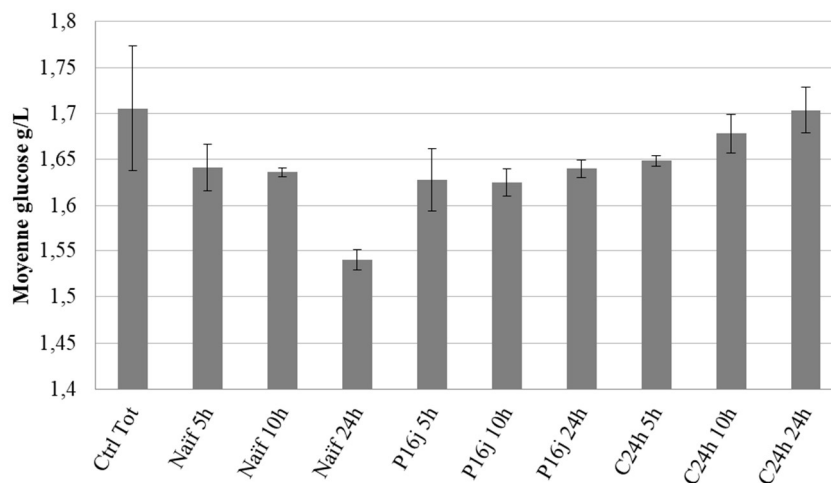


Figure 11: Diagramme en barre représentant la quantité de glucose en g/L mesurée dans le surnageant d'hémocytes maintenu en culture en fonction des différentes conditions et temps de cinétique d'infestation et de réinfestation des mollusques. La condition « Ctrl » correspond au milieu de culture initial sans hémocytes

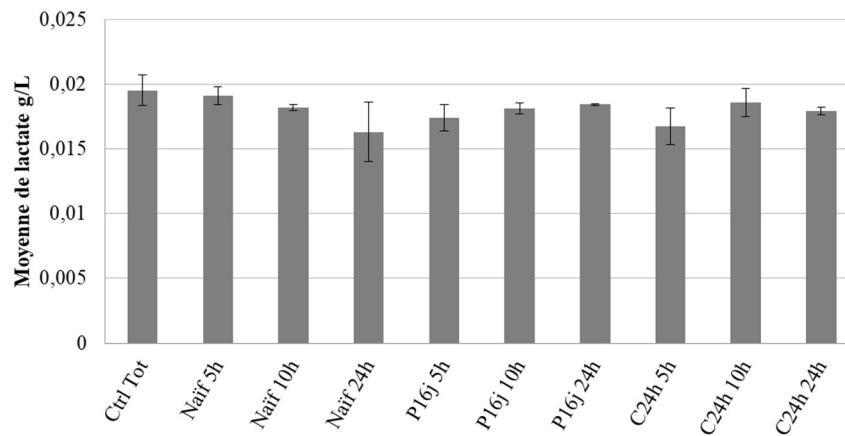


Figure 12: Diagramme en barre représentant la quantité de lactate en g/L mesurée dans le surnageant d'hémocytes maintenu en culture en fonction des différentes conditions et temps de cinétique d'infestation et de réinfestation des mollusques. Chacun des points de cinétique et de contrôle correspond aux points utilisés pour mesurer le glucose dans la figure précédente.

#### 4. La technologie Seahorse

Les différentes méthodes de maintien des hémocytes et de mesure indirecte des métabolites sont complexes à réaliser, empêchant une mesure précise des voies métaboliques d'intérêt lorsque nous décidons d'utiliser des kits de dosage ou la méthode YSI. Le temps que les hémocytes passent en culture est probablement le facteur déterminant, car au-delà de 24 heures, le maintien de ces cellules en « survie » *in vitro* est très incertain voire impossible en l'état actuel de nos connaissances. Il est donc nécessaire de passer à une mesure directe de ces voies métaboliques. Nous avons fait le choix de nous tourner vers la technologie SeaHorse (Pike Winer & Wu, 2014) qui nécessite une nouvelle fois de maintenir les hémocytes *in vitro* mais cette fois-ci durant un laps de temps bien plus court que pour les analyses précédentes.

Cette technique utilise des drogues qui ciblent les différentes enzymes spécifiques du métabolisme dans le but de perturber les voies de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative, et de quantifier, à l'aide d'une sonde, deux paramètres physico-chimiques résultant de l'activité de ces deux voies, en réponse aux différentes drogues. D'un côté, une mesure de l'ECAR (« ExtraCellular Acidification Rate ») sera réalisée, qui correspond à la mesure du taux d'acidification extra cellulaire. Cette acidification du milieu est induite par une augmentation de la concentration en lactate, considéré comme un déchet par les cellules et donc libéré dans le milieu extracellulaire. D'un autre côté, une mesure de l'OCR (« Oxygene Consumption Rate ») est faite sur les cellules donnant une indication sur la consommation d'oxygène par les cellules, et par conséquent l'activité de respiration mitochondriale de ces dernières.

La mesure de l'acidification du milieu (ECAR) est basée sur l'utilisation de différentes drogues et métabolites pour faire réagir les cellules en culture (Figure 13A). L'ajout de glucose, permettant l'activation préférentielle de la glycolyse, induit l'acidification du milieu par la libération de lactate par les cellules. Ensuite, l'ajout de différentes drogues, capables de bloquer ou d'activer la voie de la glycolyse va permettre de moduler cette acidification (Figure 13B). L'oligomycine permet l'inhibition de l'ATP synthase au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (chaîne de transport des électrons), et par conséquent permet l'inhibition de la production d'ATP et force le métabolisme à se rediriger vers la voie de la glycolyse pour la production de son énergie (Marsin *et al.*, 2002). Nous obtenons alors la mesure de la capacité totale de la glycolyse. L'oxamate est un inhibiteur de la lactate déshydrogénase, responsable de la transformation du pyruvate en lactate et inversement (Wilkinson & Walter, 1972). Le 2-DG ou 2 deoxy-glucose est un analogue du glucose qui entre en compétition avec le glucose et bloque la voie de la glycolyse au niveau de la première étape utilisant l'hexokinase. Ces deux dernières drogues permettent de confirmer que l'acidification du milieu provient bien de l'activation de la glycolyse, et donc de la production de lactate.

La mesure de la respiration mitochondriale (OCR) (Figure 13A et C) est, quant à elle, basée sur l'utilisation, dans un premier temps, de l'oligomycine permettant de mettre en évidence la capacité de production d'ATP par les cellules, en mesurant la différence entre la respiration basale des cellules et la respiration perturbée par la drogue. Le FCCP (Carbonyl cyanide-4 (trifluorométhoxy) phénylhydrazone) permet, quant à lui, de perturber le potentiel membranaire de la chaîne de transport des électrons (Brennan *et al.*, 2006), ce qui amène à la désinhibition de cette voie du métabolisme, entraînant une consommation maximale d'oxygène par la chaîne de transport des électrons. Etomoxir, un inhibiteur de la carnitine palmitoyl transférase I, peut être utilisé pour déterminer la part des acides gras dans la production d'énergie des cellules (Ferrick *et al.*, 2008), mais aurait aussi la faculté d'inhiber le complexe I de la chaîne de transport des électrons (Yao *et al.*, 2018). La roténone, également un inhibiteur du complexe I de la chaîne de transport des électrons et l'antimycine A, un inhibiteur du complexe III (Rieske *et al.*, 1967), permettent de couper complètement la respiration mitochondriale, et donc de mesurer le niveau basal de respiration des cellules induit par d'autres facteurs.

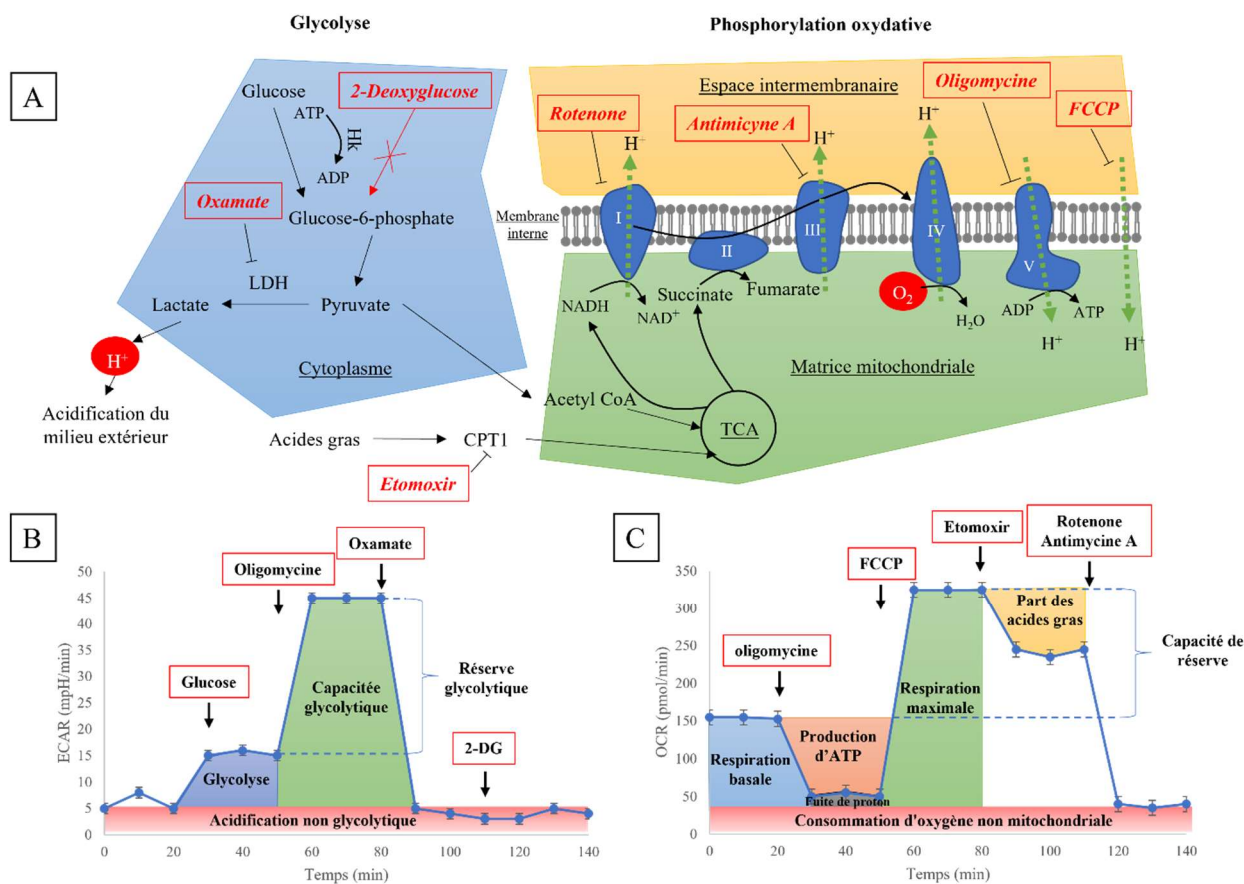


Figure 13: (A) Représentation schématique des voies ciblées par les différentes drogues utilisées pour la technologie Seahorse. Diagrammes schématiques de la mesure de l'ECAR (B) et de l'OCR (C), de l'action des différentes drogues sur le métabolisme cellulaire et des interprétations possibles résultant de l'action des différentes drogues sur les voies métaboliques ciblées. Chaque point de la courbe représente des points de mesure de la machine Seahorse. Hk : Hexokinase ; CPT1 : Carnitine palmitoyltransférase 1 ; LDH : Lactate déshydrogénase.

Une cinétique inverse d'infestation et de réinfestation a été réalisée. Pour cela, 300 BgBRE (11-13mm) ont été infestés, de telle sorte que nous puissions récolter l'hémolymphe de chaque temps de la cinétique de tous les mollusques, le même jour (Figure 14) : Primo infesté 1 jour (P24h), Primo infesté 16 jours (P16j), Challenge 1 jour (C24h), et le contrôle naïf (Figure 14). L'hémolymphe collectée est mise directement dans les puits de la plaque Seahorse afin d'éviter toute perte de cellules. Le volume d'hémolymphe par puits et par condition est défini par un nombre estimé de cellules par microlitre d'hémolymphe (environ 200 cellules/ $\mu$ l), afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules par puits soit 100 000 hémocytes, et environ 30 mollusques ont été nécessaires pour fournir ces cellules. Cinq répliques ont été effectuées pour chacune des mesures ECAR et OCR analysées en parallèle sur la même plaque. Les cellules ont été placées pendant 1 heure dans du CBSS + une solution antibiotique 1X pour éliminer les éventuelles bactéries et levures présentes dans l'hémolymphe, et éviter tout biais de mesure. L'expérience Seahorse est réalisée à 27°C pour respecter au mieux la température « naturelle » des mollusques.

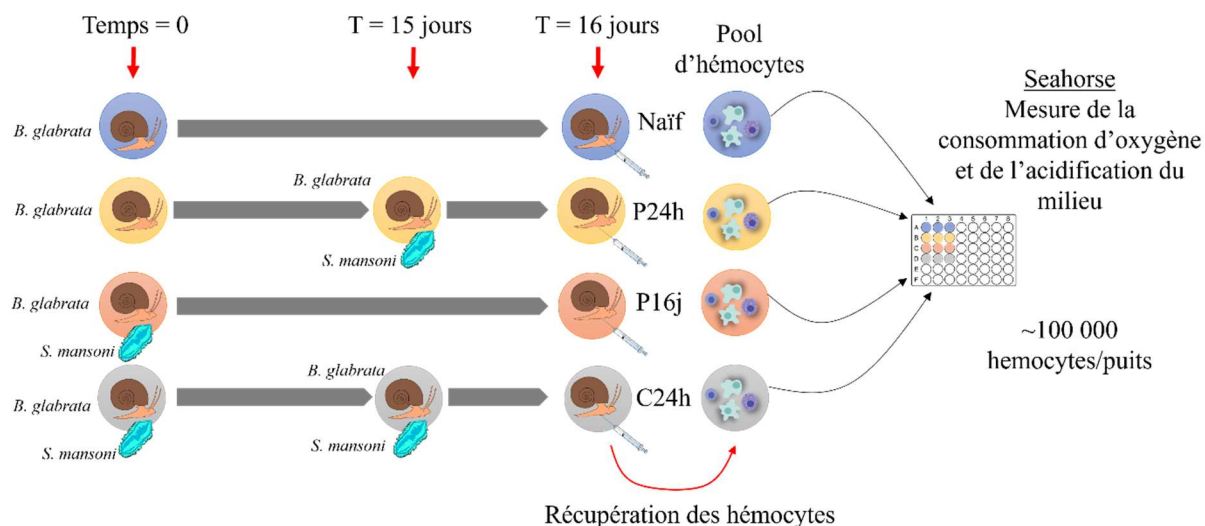


Figure 14: Cinétique inverse d'infestation et de réinfestation par *S. mansoni* (*SmBRE*) de mollusques *B. glabrata* (*BgBRE*) réalisée pour l'expérience Seahorse.

En ce qui concerne les essais ECAR, en premier lieu (Figure 15A et B). Lorsqu'on ajoute du glucose, on observe une augmentation de l'acidification du milieu. On peut en conclure que du lactate est rejeté dans le milieu, et que les hémocytes sont capables d'utiliser le glucose par la voie de la glycolyse, dont le lactate est le principal déchet. L'oligomycine, en revanche, ne semble avoir aucun effet, sur tout le temps de la cinétique, sur la consommation de glucose et l'augmentation de l'acidification du milieu par le blocage de la voie de l'OxPhos.

Les hémocytes répondent aussi particulièrement bien à l'utilisation des deux drogues (Oxamate et 2-DG). L'oxamate, comme prévu, bloque l'acidification du milieu, et potentiellement la production de lactate. Nous constatons également que la compétition du 2-DG avec le glucose continue de bloquer la voie complète de la glycolyse, et par conséquent la production de lactate, étant donné que nous ne voyons pas une nouvelle augmentation de l'acidité du milieu. Ces premiers résultats sont très encourageants pour l'utilisation de ce type de drogue et une validation fonctionnelle sur le mollusque entier (Cf. chapitre III). Cependant, cette expérience soulève deux problèmes majeurs. Le premier est que ces essais montrent une différence dans le niveau de glycolyse basal des hémocytes qui proviennent de temps de cinétiques différents (Figure 15A et B). Les hémocytes d'individus naïfs ont un niveau de glycolyse basal plus élevé que tous les autres temps de la cinétique, ce qui est contraire à notre hypothèse de travail selon laquelle les organismes subissant une infestation primaire ou un challenge, produisent des cellules ayant un besoin énergétique plus élevé, et donc un état glycolytique plus fort que les cellules d'organismes naïfs. Ainsi, selon ces résultats, les hémocytes ne favoriseraient pas la glycolyse pour la production d'énergie après une infestation primaire ou un challenge. Concernant les analyses d'OCR (Figure 16A et B), les résultats sont

à prendre avec précaution car la majorité des temps de capture du taux d'oxygène du milieu se trouvent en dessous des seuils de détection (d'erreur) de la machine (<13pmol) (Figure 16A et B). Seule l'utilisation de l'oligomycine semble avoir eu un effet mesurable, mais totalement contraire à ce que nous attendions. L'utilisation de certaines drogues comme l'oligomycine, capable de cibler l'ATP synthase (complexe V) de la chaîne de transport des électrons, est censée réduire la production d'oxygène par la voie de la phosphorylation oxydative (OxPhos). En bloquant la production d'énergie au niveau de l'OxPhos, cette drogue devrait induire un phénomène de compensation vers une autre voie pour produire de l'énergie. Nous imaginions que la voie choisie serait la glycolyse, comme observé pour les modèles cellulaires de vertébrés (Cheng *et al.*, 2014), mais les résultats des analyses montrent que les cellules ne répondent pas du tout comme attendu. Il semblerait même que les cellules ne réagissent pas, tout simplement, à cette drogue, car nous n'observons aucune diminution de l'OCR, voire une augmentation. L'hypothèse serait alors que cette molécule n'est pas capable de rentrer dans les hémocytes de *Biomphalaria* et la mitochondrie pour agir sur le complexe V de la chaîne de transport des électrons.

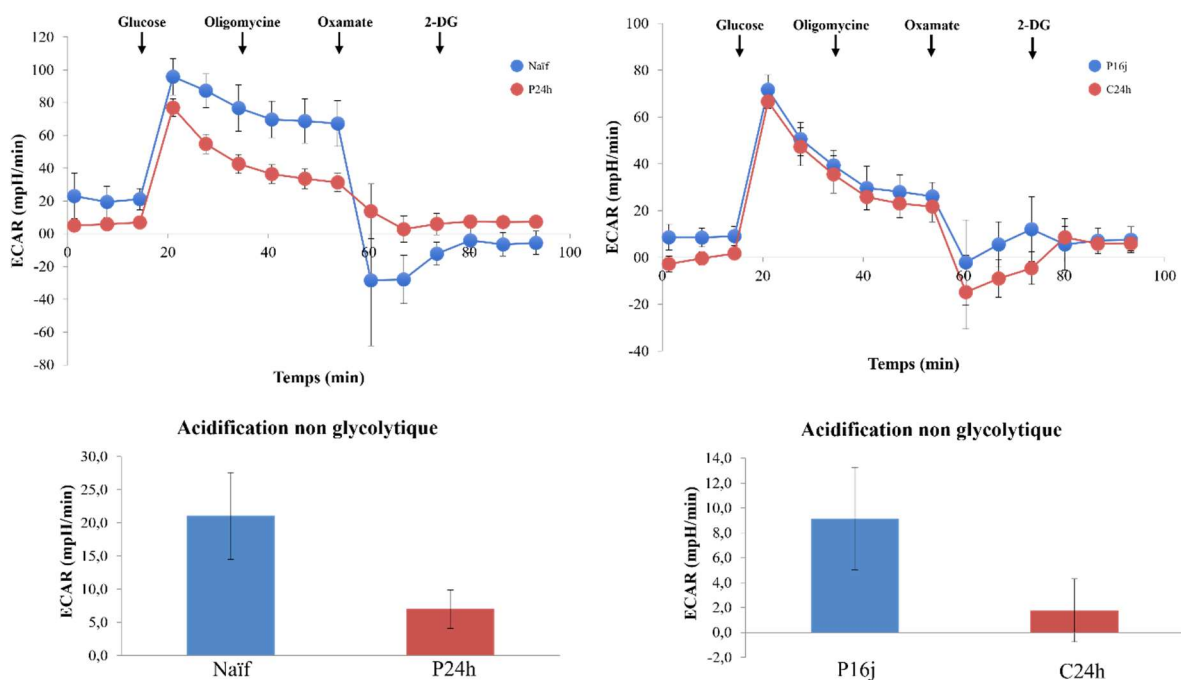


Figure 15: Analyses Seahorse de l'acidification du milieu (ECAR) d'hémocytes provenant de mollusques primo infestés d'un jour et seize jours (P1d et P16d), challenge d'un jour (C1d) et de mollusques naïfs non infestés par *S. mansoni*. Les flèches noires correspondent aux différentes injections de drogues. Les deux diagrammes en barre représentent la dernière mesure avant l'ajout de glucose et montrent le niveau glycolytique basal des hémocytes. 2-DG : 2-deoxyglucose.

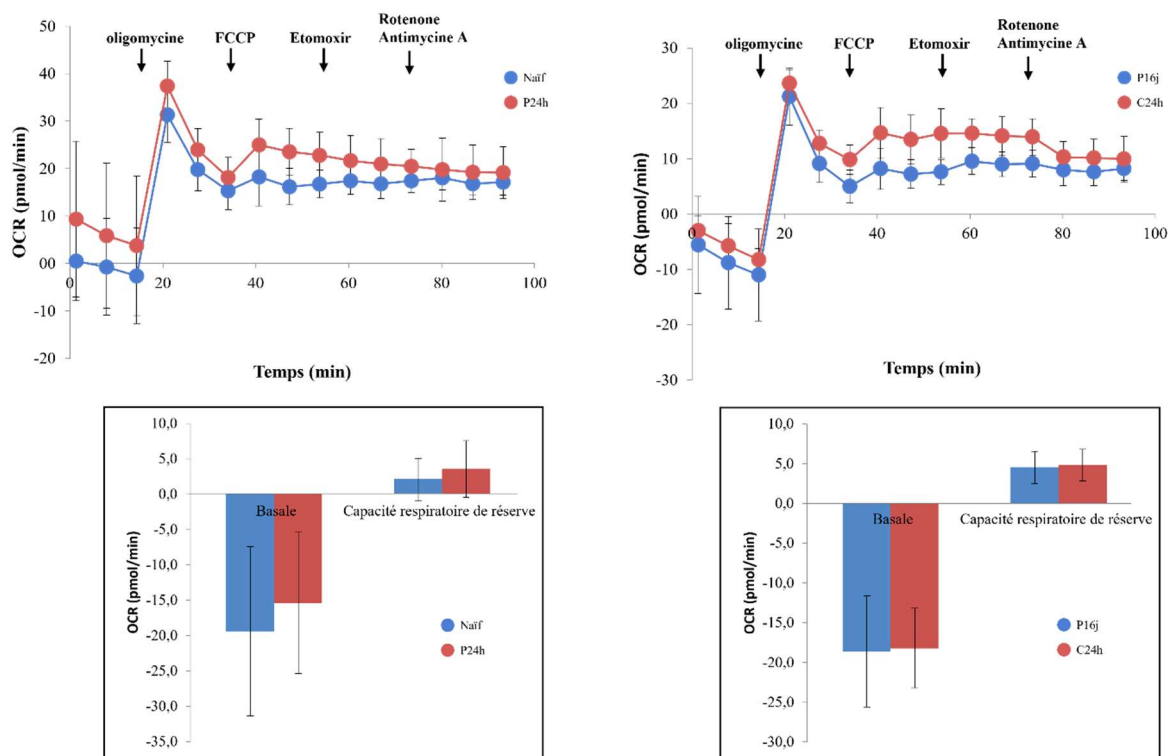


Figure 16: Analyse Seahorse de la consommation d'oxygène (OCR) d'hémocytes provenant de mollusques primo infestés d'un jour et seize jours (P1d et P16d), challenge d'un jour (C1d) et de mollusques naïfs non infestés par *S. mansoni*. Les flèches noires correspondent aux différentes injections de drogues. Les deux diagrammes en barre représentent la capacité basale de respiration des hémocytes. La capacité respiratoire disponible = respiration maximale - respiration basale. FCCP : Trifluorométhoxy carbonylcyanide phenylhydrazone, Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phenylhydrazone

Finalement, toutes ces tentatives afin de mesurer un effet Warburg dans les hémocytes n'ont pas donné de résultats réellement concluants. Les approches utilisant les kits de dosage nous ont cependant permis de confirmer un possible revirement de la production d'énergie vers la voie de la glycolyse anaérobie, mais seulement dans le mollusque entier. Les expériences de Seahorse nous montrent que les hémocytes peuvent utiliser le glucose comme source d'énergie. Mais là encore, les résultats ne vont pas dans le sens d'un effet Warburg dans des hémocytes provenant de mollusques infestés. Soit les hémocytes ne subissent aucun changement métabolique (ou des changements métaboliques non reliés à un « effet Warburg »), soit nous nous confrontons encore aux problèmes de maintien des hémocytes *in vitro*. Ce dernier point nous empêche de garder un nombre suffisant de cellules, placées dans les puits de la plaque Seahorse et qui, après chaque manipulation, se retrouvent endommagées ou en suspension, empêchant la machine d'acquérir des données fiables. Cette hypothèse est privilégiée, car après utilisation du Seahorse, nous étions incapables de réaliser des comptages cellulaires car les cellules étaient endommagées ou décrochées. Nous avons donc changé radicalement de techniques afin d'atteindre ce métabolisme hémocytaire, et nous sommes revenus à des approches « omiques » ciblées dans le premier article de ce chapitre, afin de voir quelles voies se retrouvent modulées au cours d'une cinétique d'acquisition de la MII.





## **D. Discussion**

Nous savons que le mollusque est capable de se défendre grâce à son système immunitaire, exclusivement inné, contre une primo infestation par le parasite *S. mansoni* en développant principalement une réponse de type cellulaire (Pinaud *et al.*, 2016). Les hémocytes, les cellules immunitaires de *B. glabrata*, sont les principaux acteurs de cette réponse cellulaire de primo infestation, et permettent la destruction du pathogène par la formation d'une capsule autour du parasite détecté, et la libération de facteurs humoraux au sein de cette capsule (Bayne *et al.*, 2001; Pinaud *et al.*, 2016; Dinguirard *et al.*, 2018). Cependant, cette réponse immunitaire n'est pas infaillible, et certains parasites sont aussi capables, lors de la même infestation, de déjouer les défenses de l'hôte et de se développer dans les tissus du mollusque, ce que l'on appelle le phénotype de compatibilité (Mitta *et al.*, 2012). La mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata*, aussi appelée « priming immunitaire » a été, dans un premier temps, bien caractérisée phénotypiquement lors d'une seconde rencontre du mollusque avec son parasite naturel *S. mansoni*. Cette protection, acquise suite à une première rencontre avec le parasite, est spécifique (Portela *et al.*, 2013). Les premières études sur ce phénomène ont montré que cette protection mettait entre 7 et 14 jours pour se mettre en place, et se maintient tout au long de la vie de l'animal (Sire *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent donc la nécessité, pour l'organisme, de déclencher des mécanismes particuliers lui permettant une acquisition progressive, dans le temps, d'une mémoire spécifique complète du système immunitaire. Cette mémoire se caractérise aussi par un « shift » de la réponse immunitaire, passant d'une réponse majoritairement cellulaire, et portée par les hémocytes suite à la primo infestation, à une réponse exclusivement humorale immédiate, suite à la réinfestation (Pinaud *et al.*, 2016). Un des mécanismes expliquant ce shift phénotypique est révélé par les premières approches transcriptomiques sur le mollusque entier (Pinaud *et al.*, 2016). Cependant, la surexpression de gènes, exclusivement impliqués dans la réponse immunitaire après challenge (réponse mémoire), n'est que la finalité des mécanismes permettant ce shift et cette réponse humorale décrite phénotypiquement. Mais alors, quels sont ces mécanismes moléculaires capables de faire « apprendre » au système immunitaire, et qui lui donnent tous les outils afin de mieux répondre à une nouvelle rencontre avec le pathogène ? Et surtout, quelles sont les cellules capables de porter cette mémoire ?

Grâce aux études menées sur les organismes vertébrés et la « trained immunity » (Domínguez-Andrés *et al.*, 2022), nous avons été à même de guider notre recherche, sur un mécanisme similaire, chez *B. glabrata*. Cette mémoire entraînée des vertébrés est, depuis une

dizaine d'année, étudiée très attentivement, et est décrite comme une réponse améliorée, non spécifique, des cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules NK, etc.) à la suite d'un premier stimulus par un pathogène. Les mécanismes qui définissent cette réponse améliorée impliquent des changements épigénétiques profonds, induits et maintenus en partie par des changements métaboliques spécifiques, permettant *in fine* une réponse transcriptomique améliorée (Domínguez-Andrés *et al.*, 2022).

Au regard de ces résultats sur les vertébrés, nous avons fait le choix de diriger nos recherches sur la caractérisation de mécanismes similaires dans les cellules de l'immunité innée du mollusque, les hémocytes. Un séquençage du transcriptome de ces cellules a été réalisé lors d'une cinétique d'infestation et de réinfestation afin, dans un premier temps, de caractériser la régulation des gènes hémocytaires à la suite de ces différentes infestations et dans un deuxième temps, de définir les gènes importants permettant cette réponse spécifique d'après challenge. Le résultat majeur de ces expériences est la caractérisation, pour la première fois dans des hémocytes de *B. glabrata*, de l'expression d'un shift transcriptomique similaire à celui observé dans l'organisme entier, mais beaucoup plus important en terme de nombre de transcrits différentiellement régulés (Coustau *et al.*, 2016; Pinaud *et al.*, 2016). Ce shift transcriptomique n'est, de plus, pas induit artificiellement par la présence ou la prolifération excessive d'une ou plusieurs des populations hémocytaires connues. En effet, seule une augmentation du nombre d'hémocytes totaux est observée à chaque étape de la cinétique d'infestation et de réinfestation, mais aucune des trois populations d'hémocytes décrites à ce jour ne semble réagir, par la prolifération par exemple, à ces différentes infestations. Ainsi, ce que nous observons en transcriptomique est bien le résultat d'une augmentation de l'expression de gènes particuliers en réponse au parasite, et non une augmentation artificielle de l'expression de ces gènes à la suite d'un déséquilibre dans les proportions de chaque population entre les différentes infestations. Les hémocytes sont capables d'exprimer une réponse de type mémoire immunologique en réponse au parasite *S. mansoni* de souche brésilienne.

### ***1. La mémoire immunitaire innée portée par les hémocytes***

Ce shift transcriptomique est supporté par une réelle activation transcriptionnelle entre le nombre de gènes différentiellement exprimé (DE) à la suite du challenge, comparé aux gènes DE à la suite de la primo infestation. Ce sont des milliers de gènes qui se retrouvent spécifiquement modulés dès 6h post challenge. C'est à 12h post challenge que la réponse transcriptomique est la plus forte et revient à un état basal au bout de 24h. Ainsi, nous pouvons

imaginer qu'après quelques heures, les ARNs sont traduits, et tous les facteurs humoraux qui pourraient être produits à la suite de cette réponse transcriptomique, se retrouvent dans l'hémolymphe du mollusque, prêts à éliminer le parasite, ce qui est d'ailleurs observé en cytologie moins de 24h suivant le challenge (Pinaud *et al.*, 2016). Les expériences de transfert de plasma de mollusques infestés depuis 1 jour à des mollusques naïfs confirment cela et montrent que ce plasma protège mieux contre des infestations (Pinaud *et al.*, 2016).

Comme pour la réponse globale de l'organisme (Pinaud *et al.*, 2016), nous retrouvons après le challenge, dans les hémocytes, l'expression de milliers de gènes impliqués dans la réponse immunitaire du mollusque. Nous retrouvons le shift transcriptionnel (immune shift) de manière encore plus marquée dans les hémocytes par rapport à ce qui avait pu être observé pour le mollusque entier ; ceci démontrant peut-être encore un peu plus le rôle primordial joué par les hémocytes dans cette réponse de mémoire immunitaire innée. Parmi les gènes différentiellement régulés à la suite du challenge, nous retrouvons, entre autres, un grand répertoire de différentes lectines (FREPs, CREPs, etc.) montrant la capacité de ces cellules à exprimer les gènes impliqués dans la reconnaissance spécifique aux pathogènes. Nous pouvons aussi retrouver plusieurs biomphalysines (2, 13, 14 et 15), qui sont des effecteurs puissants de la réponse anti-*Schistosoma* (Galinier *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2021), spécifiquement sur-régulées suite au challenge, ce qui peut être un autre signe de l'importance des hémocytes dans la réponse mémoire du système immunitaire inné de *B. glabrata*. Cette Biomphalysine est une toxine retrouvée fréquemment, en réponse à diverses infestations et ré-infestations avec *S. mansoni* (Galinier *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020), et est récemment montrée comme étant exprimée par certaines sous-populations hémocytaires comme les hyalinocytes ou certaines blast-like cells (Li *et al.*, 2021). C'est aussi pour l'instant le meilleur candidat pouvant expliquer le caractère humoral de la réponse mémoire spécifique de *B. glabrata*, du fait de sa capacité à se lier à la surface du parasite *in vitro*, à éliminer ce dernier par cytolyse, mais aussi parce qu'elle est présente en majorité dans le plasma après challenge (Galinier *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2019). Cette toxine a aussi été retrouvée associée à d'autres molécules importantes pour la réponse immunitaire. Tout d'abord, avec certaines FREPs, que nous retrouvons aussi dans nos analyses, mais aussi avec la BgTEP 1 (Thioester containing protein), molécule capable de se lier à différents pathogènes (famille du système du complément). Cette dernière est démontrée comme un élément clé (potentielle opsonine) de la réponse au parasite, par son implication dans des complexes immuns associant certaines FREPs (BgFREPs) chez le mollusque et les SmPoMuc du parasite (Moné, Gourbal, *et al.*, 2010; Portet *et al.*, 2018; Duval

*et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Dans nos données transcriptomiques, nous retrouvons aussi plusieurs membres de la famille des TEP qui sont sur-exprimés, en réponse au challenge, comme BgTEP 2, BgC3-1 et BgA2M (Duval *et al.*, 2020), mais nous ne retrouvons pas la BgTEP 1 comme étant différentiellement régulée au cours de la réponse de MII, alors qu'elle a pourtant été montrée comme induite suite à une infestation par *S. mansoni* (Portet *et al.*, 2018). BgC3-1, pour sa part, semble constitutivement plus exprimée chez des mollusques dits résistants à *S. mansoni*, suggérant un rôle sentinelle contre le parasite, et permettant probablement une meilleure réponse à l'infestation par *S. mansoni* (Marquez *et al.*, 2022). Finalement, la diversité des TEP suggérerait un rôle particulier pour chacun des membres de cette famille multigénique, en fonction des pathogènes rencontrés (Marquez *et al.*, 2022) et il est probable que les trois TEP que nous retrouvons sur-exprimés suite au challenge, dans nos expériences, sont spécifiques de la réponse à *S. mansoni*, mais cela nécessitera de plus amples recherches afin d'être confirmé.

Si l'on s'intéresse maintenant à la réponse transcriptomique des hémocytes à la suite de la primo infestation, seulement quelques centaines de gènes se retrouvent différentiellement régulés, et peu de gènes semblent impliqués dans des voies immunitaires. Ce type de résultat va, là aussi, dans le sens des expériences menées sur le mollusque entier, et d'une possible immunosuppression causée par le parasite lors de la primo-infection (Pinaud *et al.*, 2016). Cependant, il existe tout de même une réponse des hémocytes, et nous retrouvons certains gènes codants pour des « heat shock proteins » ou encore pour la superoxyde dismutase, connue dans la voie des espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species : ROS), jouant un rôle probable dans la réponse et l'élimination du parasite (Hahn *et al.*, 2001a; Goodall *et al.*, 2004). Ces gènes sont, de plus, DE tout au long de la cinétique d'infestation et de réinfestation et, en conséquence, nous ne retrouvons que peu de gènes spécifiques de la primo infestation.

## **2. Des mécanismes communs avec la « trained immunity »**

Ce qui est le plus surprenant dans ce jeu de données, c'est d'une part, la présence d'une forte surexpression ( $\text{Log}_2\text{FC} > 6$ ) de gènes codants pour des cytokines (comme l'interleukin 17D par exemple). La surexpression de ces cytokines pro-inflammatoires a été démontrée chez les vertébrés comme étant un marqueur de cellules immunitaires activées et donc entraînées (Yu & Gaffen, 2008; Gourbal *et al.*, 2018; Hole *et al.*, 2019; Netea *et al.*, 2020). D'autre part, plusieurs voies métaboliques (glycolyse, cycle de l'acide Tricarboxylique (TCA), etc.) sont activées suite au challenge, tout comme plusieurs gènes codants pour des enzymes de régulation

des changements épigénétiques (methyltransferase, acetyltransferases, etc.) et là encore, nous pouvons tisser un lien fort avec la « trained immunity » décrite chez les vertébrés (Riksen & Netea, 2020). Et c'est ce qui a d'ailleurs dirigé les approches expérimentales qui ont été développées, afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata* ; principalement par l'étude du métabolisme et des changements épigénétiques chez les hémocytes.

Le choix a été de diriger les études sur les changements épigénétiques par deux approches distinctes. La première approche utilise la technologie ATACseq (« Assay for Transposase-Accessible Chromatin using Sequencing »), et permet, à l'aide d'une transposase (Tn5) dépendante de l'état chromatinien de l'ADN pour son activité, d'isoler et séquencer les zones génomiques accessibles, autrement dit les portions du génome dans des zones où la chromatine est décondensée (euchromatine). La deuxième approche utilise, quant à elle, le traitement de l'ADN au bisulfite (WGBSeq : Whole Genome Bisulfite Sequencing) qui permet de modifier certaines bases non méthylées (cytosine en uracile) et de ne pas modifier les bases méthylées qui seront ensuite révélées par séquençage. Ce type de modification épigénétique a été fortement étudié chez les deutérostomes, donc les vertébrés, et certains invertébrés comme les arthropodes et les nématodes (Feng *et al.*, 2010; Gatzmann & Lyko, 2019; Atighi *et al.*, 2020). En ce qui concerne les Lophotrochozoaires, dont font partie les mollusques, peu d'études à ce jour portent sur la caractérisation des mécanismes épigénétiques. Les deux espèces d'invertébrés, chez qui le plus d'avancées ont été réalisées, sont l'huître *Crassostrea gigas* (Song *et al.*, 2017) et l'escargot *B. glabrata*, où le méthylome global de l'animal a été caractérisé (Geyer *et al.*, 2017; Fallet *et al.*, 2020). Cependant, les études menées dans cette première partie de thèse sont les premières à s'intéresser à ces deux marques épigénétiques (condensation de l'ADN et méthylation de l'ADN) dans un tissu particulier constitué par les hémocytes, dans un contexte d'acquisition de la mémoire immunitaire innée. D'un point de vue général, ces deux techniques montrent indéniablement que la primo-infestation a un impact sur le paysage épigénétique de ces cellules immunitaires. Les analyses d'ATAC seq, donc de modification de la structure chromatinienne, révèlent une ouverture de la chromatine préférentiellement dans des régions comportant des gènes. De plus, cette ouverture se fait quasi exclusivement suite à la primo infestation, et pas après le challenge, et un quart environ des gènes retrouvés en ATAC seq sont présents dans des zones où la chromatine est décondensée, à la suite de la primo infestation, et sont quasiment tous surexprimés en RNA seq, mais cette fois-ci après challenge. Mais surtout, ces gènes touchent des fonctions particulièrement

intéressantes dans le lien qui, petit à petit, se dessine entre les mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez les vertébrés et chez les invertébrés et plus précisément chez *B. glabrata*. Nous retrouvons, dans ces zones, une cytokine pro-inflammatoire (interleukine 17D) dont nous avons déjà parlé plus haut, qui est fortement surexprimée à la suite du challenge, différents facteurs de transcription, des récepteurs (récepteurs Toll par exemple), des protéines heat shock 70 ou encore des méthyltransférases. Autrement dit, nous retrouvons là toute la machinerie de détection, de maintien des changements épigénétiques et de réponse au pathogène, à l'exception de certaines molécules clés comme les Biomphalysines ou les TEP. D'autres mécanismes sont alors à l'œuvre, afin de permettre le contrôle de l'expression de ces gènes, car ces deux molécules ne se retrouvent dans aucune des analyses épigénomiques. Parmi les gènes présents dans ces zones ouvertes de la chromatine, et sur-exprimées au challenge, nous retrouvons des gènes clés dans différentes voies métaboliques d'intérêt, comme la voie de la glycolyse ou encore du glutamate (hexokinase 2, glutamate mitochondrial, etc.). Certaines voies métaboliques semblent aussi préférentiellement touchées par les modifications de la méthylation de l'ADN (analyses WGBseq) comme la voie de l'OxPhos ou encore la voie du glutamate. Cependant, pour ce genre d'analyse, l'interprétation est plus complexe du fait, d'une part, du manque d'échantillons après challenge et, d'autre part, du manque de connaissances, encore à ce jour, du rôle joué par la méthylation de l'ADN dans la modulation de l'expression des gènes chez *B. glabrata* et même des invertébrés en général (Tweedie *et al.*, 1997). Une chose est sûre, ces différents gènes subissent des modifications épigénétiques, et nous en retrouvons certains différenciellement régulés après challenge. Nous pouvons donc présumer que ces changements épigénétiques induits par la primo infestation sont les mécanismes que nous recherchons, capables de conférer une mémoire au système immunitaire inné de *B. glabrata*. La primo infestation déclenche une cascade de réactions aboutissant à ces changements épigénétiques. Les gènes clés des voies métaboliques et immunitaires sont donc accessibles à la suite de la primo infestation, et les hémocytes se retrouvent donc prêts à répondre à une seconde infestation, par une réponse exacerbée et spécifique immédiatement après challenge.

Ces changements métaboliques des cellules après challenge mais aussi, dans une moindre mesure, après la primo infestation (détectés pour l'instant seulement par transcriptomique), sont aussi très intrigants car, là encore, il nous est possible de rapprocher ces changements avec les mécanismes de la « trained immunity » des vertébrés (Riksen & Netea, 2020). Comme montré en introduction de cette partie de thèse, l'immunité entraînée des

vertébrés passe aussi par de profonds changements métaboliques, afin de permettre à la cellule d'avoir l'énergie nécessaire à la réponse inflammatoire, certes, mais aussi pour faciliter certaines modifications épigénétiques. Donc ces changements métaboliques font partie des mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez les vertébrés et pourraient donc l'être aussi pour les invertébrés. Un faisceau de preuves va en ce sens chez *B. glabrata*. En transcriptomique, nous avons caractérisé une suractivation de certains gènes clés de voies métaboliques en réponse à la primo infestation mais aussi en réponse au challenge. Grâce à l'épigénomique, nous avons montré que des changements épigénétiques semblent ciblés en partie sur des gènes du métabolisme. Et, finalement, grâce aux études portant sur le mollusque entier, nous savons que certaines modifications métaboliques, en réponse à une primo infestation, ont lieu dans l'escargot (Mendes *et al.*, 2019).

Ainsi, pour approfondir les mécanismes d'acquisition de la MII chez *B. glabrata*, et comprendre un peu mieux comment ces changements épigénétiques peuvent se mettre en place et se maintenir, nous avons cherché à caractériser ce métabolisme cellulaire chez les hémocytes. Les analyses métabolomiques sur les hémocytes nous ont ainsi permis de confirmer l'induction de voies métaboliques spécifiques telle que la voie de la glycolyse, ou encore de démontrer l'accumulation de certains métabolites que nous savons être aussi accumulés dans les macrophages entraînés des vertébrés dans le cas de la trained immunity (Arts, Carvalho, *et al.*, 2016; Arts, Novakovic, *et al.*, 2016; Riksen & Netea, 2020). Parmi toutes les approches tentées pour permettre de définir l'état métabolique des hémocytes, seules les analyses de métabolomique ciblée se sont révélées concluantes et exploitables. Les autres techniques, comme les kits de dosage, n'ont malheureusement pas été concluantes et n'ont simplement permis de confirmer une suractivation de la glycolyse à la suite du challenge chez l'organisme entier, alors que les approches de métabolomiques ciblées ont permis de révéler des changements très spécifiques dans les hémocytes, à la suite de la primo infestation. En particulier, le basculement de la production d'énergie vers la voie de la glycolyse, ou encore de la voie de la glutamine, mais aussi l'accumulation de métabolites du TCA (tricarboxylic acid cycle) ou cycle de Krebs (i.e., fumarate, alpha-ketoglutarate, etc.) permet une nouvelle fois un lien direct avec les mécanismes connus d'acquisition de la « trained immunity ».

Ainsi pour conclure, nous avons pu démontrer au niveau hémocytaire :

(i) Des changements métaboliques dans la production d'énergie depuis la voie de l'OxPhos vers la voie de la glycolyse notamment, permettant l'accumulation de métabolites



particuliers, dès la primo infestation, connus comme pouvant jouer le rôle de cofacteurs d'enzymes impliqués dans les modifications épigénétiques.

(ii) L'ouverture de la chromatine à la suite de la primo infestation rendant accessible à la transcription des zones que l'on retrouve particulièrement induites à la suite du challenge.

(iii) Une réponse transcriptomique exacerbée à la suite du challenge induisant l'expression de gènes immunitaires, humoraux et pro-inflammatoires permettant une réponse contre *S. mansoni* extrêmement rapide et spécifique.

Tous ces mécanismes, ainsi que leurs mises en place successives à la suite de la primo-infestation, semblent être très similaires à ceux observés dans les modèles vertébrés, et lors de la mise en place de la « trained immunity ». Toutes ces analyses permettent de confirmer un mécanisme de mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata*, avec les hémocytes comme l'un des principaux acteurs de cette réponse. Cependant, ces travaux ne sont que les premiers pas vers une description plus complète des mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata*. Nous ne connaissons pas encore assez bien les premières étapes de l'activation de cette MII, qui démarre par la reconnaissance des pathogènes par différents PRRs (FREPs, TLRs, TEPs, etc.) mais dont on ne connaît pas les voies et cascades de signalisations qui mènent aux changements métaboliques et épigénétiques que nous avons détectés en réponse à la primo infestation. De plus, le rôle du métabolisme dans l'acquisition de la MII n'est pas démontré, et nécessite donc une validation fonctionnelle dont je souhaite poser les bases dans la partie 3 de cette thèse. Les marques épigénétiques exactes qui sont activées durant la MII ne sont pas non plus connues. Dans ce domaine, les études sur les organismes vertébrés peuvent donner encore des pistes de recherche. Cette problématique est plus large, et nécessitera de répondre à la question de l'impact de certaines modifications épigénétiques (méthylation, modification de marques d'histones, etc.) sur l'activation ou la répression de l'expression des gènes qui, pour l'instant, nous est inconnue dans ce modèle de mollusque. Cette question répondue, il sera alors possible de trouver des réponses quant à l'impact exact de certaines modifications épigénétiques dans l'acquisition de la MII, et la réponse transcriptomique après le challenge. Le rôle de certains long ARN non codants (lncRNA) devra aussi faire l'objet d'une attention particulière. Certains de ces lncRNA se trouvent être régulés au cours du priming immunitaire chez *Tribolium castaneum* (Ali & Abd El Halim, 2020), mais ces molécules ont aussi été montrées comme importantes dans le lien qui peut exister entre les changements métaboliques et épigénétiques de cellules entraînées chez les vertébrés (Fanucchi & Mhlanga, 2019; Fok *et al.*, 2019).

En conclusion, les hémocytes réagissent à la fois transcriptionnellement, épigénétiquement, métaboliquement, mais aussi en termes de prolifération cellulaire, à une primo infestation et à un challenge par *S. mansoni*. Donc, ces hémocytes semblent bien participer, du moins en partie, au support de la mémoire immunitaire innée chez *Biomphalaria*. Cependant, nous ne connaissons encore que peu de choses sur ces hémocytes, et le chapitre II de cette thèse tentera de répondre à quelques-unes de ces questions, mais aussi décrira plus précisément la réponse de ces cellules et de chacune des sous-populations hémocytaires au cours d'une cinétique d'infestation et de réinfestation de *B. glabrata* par *S. mansoni*.



**Chapitre II :**  
**La caractérisation du compartiment cellulaire support de la**  
**réponse mémoire immunitaire innée**

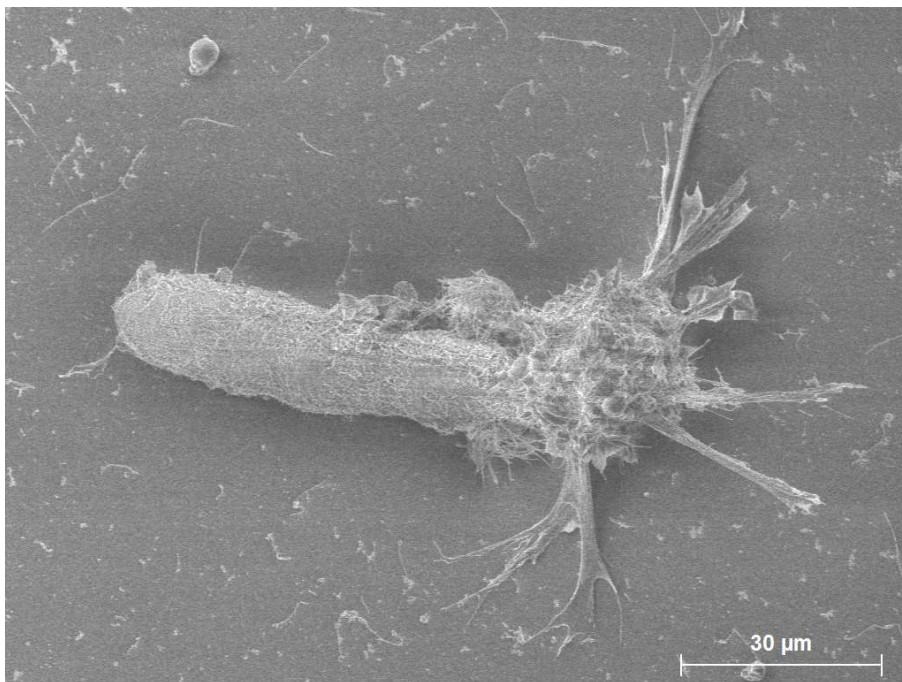


Photo précédente : Image de microscopie électronique à balayage d'une hémocyte de *B. glabrata* adhérent à un SPI de *S. mansoni*. Crédit photo : Pierre Poteaux

## ***A. Introduction sur les hémocytes de B. glabrata***

L'ensemble des études menées sur l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni*, montrent que les hémocytes, les cellules de l'immunité innée chez le mollusque, jouent un rôle primordial dans la défense de l'escargot face à ces pathogènes (Negrão-Corrêa *et al.*, 2012; Fried, 2016). Ces cellules circulantes dans l'hémolymphe constituent la composante cellulaire innée du mollusque *Biomphalaria*. Les hémocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire cellulaire et humorale de l'organisme, et la reconnaissance du non soi (Zelck & Becker, 1992). Ils possèdent des capacités de phagocytose (Hanington, Forys, *et al.*, 2010) et d'encapsulation, et peuvent également produire des molécules cytotoxiques et cytolytiques participant à la réponse humorale de l'immunité (Bayne *et al.*, 1980a, 1980b; Loker *et al.*, 1982; Iwanaga & Lee, 2005; Coustau *et al.*, 2015; Pinaud *et al.*, 2016; Tetreau *et al.*, 2017). Comme nous avons pu le voir en introduction, les cellules immunitaires innées sont capables de reconnaître les parasites lors d'une primo infestation, de les encapsuler et de les éliminer en quelques heures dans les meilleurs cas en moins de 24h (Pinaud *et al.*, 2016). Nous constatons aussi une prolifération de ces cellules à la suite d'une primo infestation, mais également suite à un challenge immunitaire lors de rencontres successives avec un même pathogène (cf. Chapitre I, (Portet *et al.*, 2019; De Melo *et al.*, 2020; Pichon *et al.*, 2023)). Dans ce dernier cas, les parasites sont tués et dégénèrent dans les tissus de l'hôte, sans contact direct observé entre les hémocytes et les parasites (Pinaud *et al.*, 2016). Comme nous l'avons démontré dans la première partie de cette thèse, les hémocytes ont une réponse très spécifique suite au challenge et portent la marque de la mémoire immunitaire innée chez *Biomphalaria*, démontré par l'expression du shift transcriptomique par les hémocytes, comme cela avait été décrit précédemment au niveau de l'animal entier (Pinaud *et al.*, 2016). Mais finalement, toutes ces études ont décrit la réponse des hémocytes de façon globale, et même si nous avons été capables de décrire très finement les réponses de ces hémocytes, tant au niveau transcriptomique, épigénétique, protéique que métabolique, ces descriptions se sont faites seulement sur des pools d'hémocytes totaux. Nous n'avons aucune connaissance sur la réponse ou l'implication des infra-populations hémocytaires dans la mémoire immunitaire innée.

Mais avant de pouvoir analyser finement la réponse de ces populations hémocytaires au cours de la réponse de mémoire immunitaire, il est essentiel de comprendre ou de caractériser ce que sont exactement ces populations cellulaires chez *Biomphalaria glabrata* ? Une question en apparence simple, mais qui se heurte pourtant à de nombreux écueils.

## ***1. Localisation de l'organe hématopoïétique***

Le premier de ces écueils vient du fait que l'on ne connaît pas vraiment l'organe capable de produire les hémocytes. Chez les mollusques, le processus de production de ces hémocytes se nomme l'hématopoïèse, et a lieu normalement au niveau de l'organe hématopoïétique. Chez *Biomphalaria*, cet organe se trouve dans la paroi tissulaire séparant la cavité péricardique de la cavité de la fausse branchie (Lie *et al.*, 1975; E. A. Pila *et al.*, 2016). Cet organe a été défini, en premier lieu, grâce à des études montrant une hyperplasie cellulaire, et l'observation de cellules en cours de mitose suggérant une prolifération cellulaire de cet organe, en réponse à une infestation par *S. mansoni* (Lie *et al.*, 1975; Lie & Heyneman, 1975). Cependant, ce constat ne fait pas consensus, et certaines études remettent en cause cette probable provenance des hémocytes en proposant une origine multicentrique de ces cellules (les hémocytes peuvent être créés dans plusieurs organes) (Souza & Andrade, 2012). Ainsi, faute de pouvoir remonter vers un organe progéniteur, la caractérisation des hémocytes s'est concentrée sur les hémocytes matures, et plus particulièrement sur les hémocytes circulants chez *Biomphalaria*.

## ***2. La microscopie pour caractériser les hémocytes circulants***

Le second écueil auquel nous sommes confrontés dans la caractérisation des hémocytes chez *Biomphalaria*, repose sur le fait qu'il est, à ce jour, difficile, voire impossible, de trouver un véritable consensus au sein de la communauté scientifique sur le nombre et la description morphologique exacte de toutes ces populations hémocytaires. Chaque étude portant sur le sujet propose une approche différente de la caractérisation de ces cellules et surtout, chaque étude utilise une technique particulière afin de visualiser les différentes populations hémocytaires. Certains vont se focaliser sur des aspects moléculaires, comme les déterminants membranaires (Yoshino *et al.*, 2013), quand d'autres vont caractériser des différences de comportement (capacité de phagocytose par exemple), principalement dans l'interaction avec le parasite (LoVerde *et al.*, 1982; Bezerra *et al.*, 1997). Cependant, ces approches ne permettent pas de décrire avec précision les populations hémocytaires. Par exemple, les protéines membranaires ne représentent qu'une infime partie du protéome de ces cellules, et les différences fonctionnelles ne se trouvent pas forcément et seulement associées aux surfaces membranaires. D'autres études vont alors utiliser des techniques considérées comme plus « traditionnelles », comme la microscopie photonique sur cellules colorées pour tenter de décrire la morphologie de ces cellules (Matricon-Gondran & Letocart, 1999; Cavalcanti *et al.*, 2012; Prokhorova *et al.*, 2018). Ces approches étant plus simples à réaliser et pouvant donner rapidement un aperçu de

la diversité des populations hématocytaires circulantes. Cependant, elles sont malheureusement très dépendantes de certains facteurs, que ce soit dans la manipulation des cellules, qui peut entraîner des biais de représentativité des différentes populations hématocytaires, ou dans le choix des produits chimiques utilisés pour éviter l'agrégation des cellules, ainsi que dans la coloration utilisée. Mais surtout, les résultats peuvent être influencés fortement par la capacité d'adhérence des cellules à un support donné. Certaines cellules vont mieux adhérer sur un support plastique alors qu'elles seront incapables d'adhérer sur un support en verre, ce qui changera forcément la morphologie des cellules et donc l'interprétation que l'on peut en faire (Cavalcanti *et al.*, 2012).

C'est en cela que l'on peut noter la limite de ces techniques de caractérisation des cellules, car ces descriptions ne sont pas du tout en accord avec les observations menées durant cette thèse (Figure 17). Elles montrent que sur un support plastique, les hyalinocytes (cellules agranulaires) sont capables de former de longs pseudopodes, et donc d'adhérer fortement au substrat, à l'inverse des granulocytes qui adhèrent moins bien au substrat (Pichon *et al.*, 2022), comme nous pouvons le voir sur la Figure 17. Sur cette même figure, nous pouvons comparer la morphologie des différentes populations hématocytaires définies dans plusieurs articles (Figure 17A-I) avec ce que nous avons observé durant nos propres expériences sur *B. glabrata* (Figure 17J-M). Le premier article de Prokhorova et collaborateurs ((Prokhorova *et al.*, 2018), Figure 17A-C) a utilisé la cytométrie en flux, afin de confirmer la présence des deux populations hématocytaires de *B. glabrata*, qu'ils ont décrites ensuite par microscopie à contraste de phase. Nous pouvons voir clairement que les hématocytes classés comme appartenant à la population granulocyte (Figure 17A) sont définis par les auteurs, comme étant des cellules très adhérentes au substrat (lame de verre avec revêtement en Téflon). A l'inverse des hyalinocytes (Figure 17C), décrits comme petits, ronds et peu adhérents. Nous retrouvons ce même type de description chez d'autres auteurs ((Baeza Garcia *et al.*, 2010), Figure 17D), où les granulocytes possèdent un réseau d'actine plus important que les hyalinocytes et de ce fait, une capacité plus importante à adhérer au substrat (lame de verre). Ces résultats ne corrélaient pas totalement avec le dernier article (Cavalcanti *et al.*, 2012) qui semble montrer des hyalinocytes (Figure 17G-I) capables de former des filopodes et pseudopodes, et donc de s'étaler plus facilement sur la lame de verre. Les granulocytes (Figure 17F) sont, quant à eux, définis par une forme plutôt circulaire à fusiforme, présentant moins d'extension cytoplasmiques que les hyalinocytes. Ces auteurs sont aussi aptes à définir d'autres types cellulaires comme les blast-like cells (Figure 17G), qui se caractérisent par un rapport nucléocytoplasmique élevé, et qui pourraient même ressembler aux cellules de type hyalinocytes montrées sur les figures des deux articles précédents.



Enfin, ce manque d'accord et d'harmonisation entre les auteurs dans la caractérisation et la description morphologique ou moléculaire des hémocytes, entretient une incertitude quant au nombre de population possiblement observée ou décrite chez *B. glabrata*.

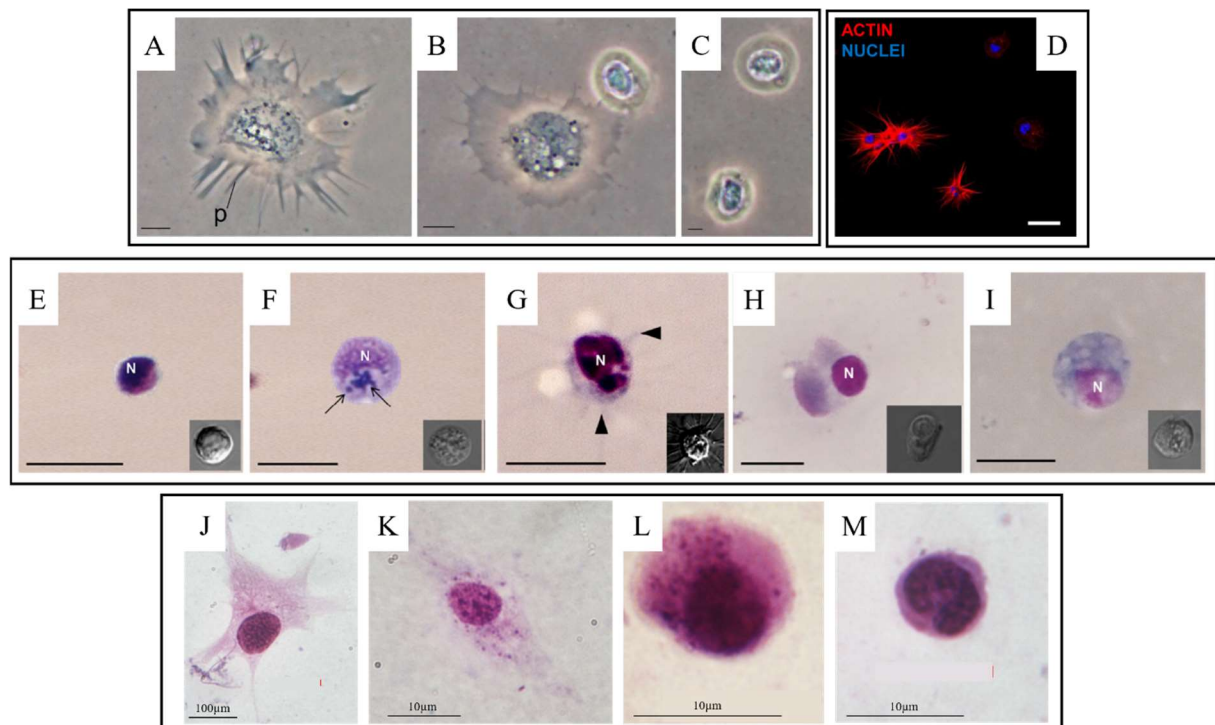


Figure 17: Images représentant des hémocytes de *Biomphalaria glabrata* issues de trois publications scientifiques différentes, comparées aux observations faites au cours de la thèse. A-C : Images de microscopie à contraste de phase (Prokhorova et al., 2018). A : granulocyte, B : granulocyte à gauche et hyalinocyte à droite, C : hyalinocytes. Barre d'échelle représente 2 $\mu$ m ; D : Hémocytes marqués avec de la phalloïdine (actine) et du colorant Hoechst (DNA) (Baeza Garcia et al., 2010). Barre d'échelle représente 12 $\mu$ m ; E-I : Images de microscopie optique et par contraste interférentiel différentiel (Cavalcanti et al., 2012). E : blast-like cell ; F : granulocytes ; G : hyalinocyte de type I ; H : hyalinocyte de type II ; I : hyalinocyte de type III, Barre d'échelle représente 10 $\mu$ m. K-N : Populations hémocytaires colorées au MCDh et observées par microscopie de la souche de *Biomphalaria glabrata* originaire du Brésil et maintenue au laboratoire IHPE. J : hyalinocyte; K : hyalinocyte semi-granuleux; L : granulocyte; M : blast-like cell.

### 3. De nouvelles approches de caractérisation des populations hémocytaires

Il est donc nécessaire de s'affranchir de tous ces biais afin de proposer une caractérisation des hémocytes universellement acceptée. C'est pourquoi des études ont tenté de décrire les hémocytes en utilisant d'autres types d'approches ou des combinaisons d'approches, comme la cytométrie en flux couplée à une observation microscopique (Prokhorova *et al.*, 2018) ou seulement par des approches de cytométrie en flux (Martins-Souza *et al.*, 2009). L'intérêt d'une telle technique est de tenter de garder les cellules en suspension afin de ne pas changer leur morphologie, en les forçant à adhérer à un support. Cette technique a permis de définir là encore, jusqu'à trois populations hémocytaires de petite, moyenne et grande taille sans être réellement capables de relier ces différentes populations à une population morphologique spécifique.

Enfin, Cavalcanti et collaborateurs (Cavalcanti *et al.*, 2012), ont développé une approche de microscopie électronique à transmission, qui a pour avantage de ne pas laisser adhérer les cellules et de donner une image précise de tous les organites et structures intracellulaires. Grâce à cette technique, ils ont défini 5 populations hémocytaires : les granulocytes, les hyalinocytes (regroupant 3 sous populations distinctes) et les blast-like cells, de petites cellules sans granules considérées comme des hémocytes immatures. Ce sont aujourd'hui les descriptions morphologiques et structurales les plus précises que nous ayons des hémocytes de *Biomphalaria*. Mais, bien qu'elles nous aident à identifier un plus grand nombre de type cellulaire, elles ne nous permettent toujours pas de définir l'entière hétérogénéité des populations hémocytaires. Comme exemple de cette impossibilité, nous pourrions revenir sur une molécule, la BgTEP1, présentée en introduction de cette thèse (Portet *et al.*, 2018). Les premières études sur cette molécule ont montré qu'elle était exprimée par les hémocytes, et plus particulièrement, par une sous population de blast-like cells (Portet *et al.*, 2018). Cela remet donc en question le caractère immature de ces cellules qui peuvent en fait produire des molécules immunitaires, et donc constituent clairement une population différenciée au sein des Blast-like cells, population considérée dans la littérature comme des cellules souches, généralement pro-hémocytaires généralement. Ainsi, nous pouvons identifier 5 types de populations hémocytaires, en utilisant des technologies contraignantes comme la microscopie électronique à transmission, mais ces populations hémocytaires se révèlent fonctionnellement plus complexes que décrit jusqu'à présent.

Nous avons décidé, tout d'abord, de trouver des techniques de séparation des cellules moins contraignantes. Pour cela, nous avons réalisé nos propres expériences de cytométrie en flux, mais cette fois-ci pour récupérer les populations triées afin d'être utilisées, à la fois en microscopie et en protéomique label-free, pour tenter de déterminer des protéines spécifiques de ces populations hémocytaires. Le problème de ce type d'approches de cytométrie est que dans le modèle *B. glabrata*, nous observons un continuum de taille et de granulométrie des hémocytes qui rend extrêmement complexe la séparation de chacune de ces populations (Pichon *et al.*, 2022). Jusqu'à présent, par cette technique de cytométrie en flux, nous n'obtenons que des fractions d'hémocytes simplement enrichis en certaines populations hémocytaires (hyalinocytes, granulocytes et blast-like cell), ce qui brouille encore une fois le signal pour une identification claire des différentes populations. Nous devons trouver de nouvelles approches à la fois de tri cellulaire mais aussi d'analyse des fonctions de chaque population hémocytaires, si nous voulons réussir à caractériser ces hémocytes.

## ***B. Des nouvelles technologies de séquençage pour caractériser les populations hémocytaires de *Biomphalaria* : l'apport du « single cell RNA sequencing »***

Comme nous avons pu le voir jusqu'à présent, la description des hémocytes ne s'est faite que d'un point de vue morphologique, avec tous les biais que les différentes techniques peuvent apporter et finalement, l'incertitude qui perdure concernant leur caractérisation. Si, afin de décrire la réponse des hémocytes aux différentes infestations et à la réponse mémoire, nous nous arrêtons aux observations et à la caractérisation des 4 populations hémocytaires que nous avons définies au cours de cette thèse (hyalinocytes, hyalinocytes semi granuleux, granulocytes et blast like cells) (Pichon *et al.*, 2023), alors aucune de ces populations hémocytaires ne semble répondre aux différentes infestations. Mais là encore, nous nous appuyons sur une caractérisation morphologique de nos cellules dans une cinétique d'infestation et de réinfestation. Alors que d'un point de vue transcriptomique, au cours d'une même cinétique, les premières analyses de « RNA sequencing » montrent une très forte activité transcriptionnelle des hémocytes, notamment à la suite du challenge. Il existe possiblement des infra-populations hémocytaires exprimant des fonctions spécifiques, qu'il nous est impossible d'appréhender par la seule caractérisation morphologique de ces cellules. Si nous voulons aller plus loin dans la compréhension du rôle des hémocytes dans la réponse au parasite *S. mansoni* et en tant que support potentiel de la réponse immunitaire innée mémoire chez *B. glabrata*, nous devons trouver de nouvelles techniques précises, reproductibles, capables de décrire ces hémocytes, sans *a priori*. C'est pourquoi, nous avons fait le choix de mener une approche de séquençage transcriptomique sur cellule unique ou « Single cell RNA sequencing »

### ***1. Pourquoi utiliser la technologie de « single cell RNA sequencing »***

Depuis 2009 et la publication des premières recherches de single cell RNA sequencing utilisant des approches de séquençage massif (Tang *et al.*, 2009), cette technique n'a cessé de se développer et de susciter l'intérêt des chercheurs (Svensson *et al.*, 2018). Ainsi, des centaines d'atlas cellulaires voient le jour, principalement sur les modèles humains, comme avec le développement du « human cell atlas » (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2017) ou chez la souris (Han *et al.*, 2018; Fei *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). Mais cette technologie a rapidement été appliquée à d'autres organismes invertébrés comme la drosophile (Li *et al.*, 2022), chez laquelle un atlas complet des cellules d'individus adultes a pu être réalisé. Chez le moustique, l'anophèle, des analyses ont été effectuées sur les hémocytes, en réponse notamment à des

infections par plasmodium, et ont révélé un nouveau type d'hémocytes (megacyte) (Raddi *et al.*, 2020). Mais, plus proche du modèle d'étude de cette thèse, c'est le premier atlas cellulaire d'un stade de développement parasitaire, dans le vertébré (schistosomule), de *S. mansoni* qui a été rendu possible grâce à la technologie de « single cell RNA sequencing » (Diaz Soria *et al.*, 2020). Dans tous ces modèles, nous pouvons, par ces techniques, définir l'entière hétérogénéité des cellules qui composent un tissu particulier, déterminer comment chacune des cellules interagit avec ses voisines, suivre leur développement ou encore déterminer les fonctions précises de chacune d'elles au sein d'un organe, d'un tissu ou même en réponse à certains pathogènes. Une telle technique devrait donc permettre de résoudre les problèmes exposés dans l'introduction de ce chapitre, à savoir tout d'abord, de pouvoir isoler et classer, par une méthode non biaisée, les différentes populations hémocytaires présentes chez *B. glabrata*. L'identification de nouveaux marqueurs spécifiques de chacune de ces populations, nous permettra ainsi d'associer les populations morphologiques, observées en microscopie, avec les populations transcriptomiques, définies par les approches de scRNA seq, et de caractériser, au cours d'une cinétique d'acquisition de la MII, le rôle et la réponse de chacune des populations définies par ces approches. Pour arriver à cela, plusieurs choix de techniques d'isolement des cellules et d'analyse de scRNA seq existent (Hwang *et al.*, 2018; Svensson *et al.*, 2018).

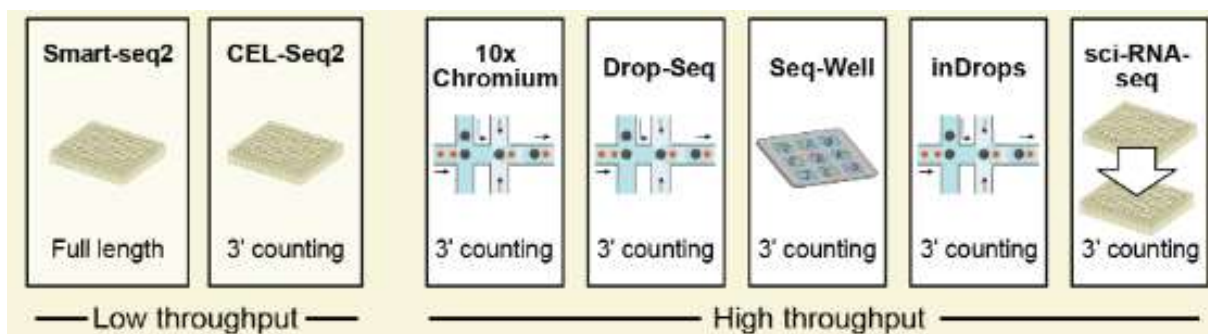


Figure 18: Présentation des différentes méthodes couramment utilisées de bas (gauche) et haut (droite) débit de « single cell RNA sequencing ». Schéma modifié de (Ding *et al.*, 2020)

## 2. La méthode choisie pour les hémocytes de *B. glabrata*

Ne possédant aucun marqueur membranaire pour toutes nos populations morphologiques, et ayant des difficultés à différencier les hémocytes par microscopie, nous nous sommes tournés vers le protocole proposé par 10x genomics (10x Chromium Single Cell 3' Reagents kits). Il se décompose en deux étapes. La première permet, par l'utilisation de techniques de séparation de cellules par microfluidique chromium (Hwang *et al.*, 2018), l'étude

de milliers de cellules, directement sans avoir besoin de les isoler expérimentalement, et ne nécessite aucun développement de marqueur spécifique de chacune des populations cellulaires étudiées (Figure 19). Cette méthode permet surtout de travailler avec des cellules en suspension (préalablement dissociées si elles proviennent d'un tissu) et nécessite peu de manipulation, ce qui est un avantage pour nos hémocytes. Afin d'avoir un nombre d'hémocytes suffisant pour cette expérience, nous avons dû regrouper l'hémolymphe de 50 mollusques par condition pour atteindre les 1000 cellules/ $\mu$ l requis. Il faut prendre en compte que ce genre de technologie n'est pas parfait, et que la moyenne de capture des cellules se trouve autour de 60% (Yamawaki *et al.*, 2021), avec la probabilité de former des multipléts dans une gouttelette (plus d'une cellule capturée par gouttelette et donc par GEM (Gel bead in Emulsion)) entre 1.6% et 2.4% pour environ 3000 cellules triées. Concernant les multipléts de cellules, ces probabilités sont prises en compte lors de l'analyse bioinformatique et donc retirées de l'analyse.

Pour finir, chaque cellule est alors isolée dans une microgouttelette, formée par émulsion, contenant tous les réactifs nécessaires à la lyse de la cellule et la retro-transcription en ADNc des brins d'ARNm, ainsi qu'une bille GEM (Gel bead in Emulsion) (Figure 19A). Cette dernière est recouverte de séquences nucléotidiques uniques comportant plusieurs domaines spécifiques : une séquence permettant l'amplification par PCR; un barcode spécifique de 10x de 16 nucléotides permettant d'identifier spécifiquement la bille et donc la cellule; une séquence UMI (« Unique Molecular Identifiers ») de 12 nucléotides permettant l'identification de chaque transcrite détecté; et enfin une séquence polyT permettant la capture des ARNm par leur queue polyA (Figure 19A). Il est cependant possible de ne capturer que 30 à 32% des transcrits dans la microgouttelette, avec la chimie utilisée pour cette expérience. La technologie 10x reste, malgré tout, plus performante, comparé aux autres techniques de microfluidique existantes (Zhang *et al.*, 2019), bien que ce type de technologie, du fait d'un pourcentage assez bas de capture d'ARNm, ne permet pas une excellente précision pour la détection de transcrits peu abondants. Ces technologies étant en constante évolution, ces biais expérimentaux pourraient être corrigés par d'autres approches comme le smart-seq2 (Wang *et al.*, 2021). Les ADNc sont ensuite récupérés lors de la deuxième étape (Figure 19B), afin de créer la librairie nécessaire au séquençage massif par la technique SBS (Sequence By Synthesis). Après séquençage, les fragments sont alignés avec le génome de *B. glabrata* (disponible sur le site internet Vector Base : [https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/TMPTX\\_bglBB02](https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/TMPTX_bglBB02), 15/10/2021) (Giraldo-Calderón *et al.*, 2015) afin de créer les matrices d'expression par cellules que nous utilisons ensuite pour les analyses bio-informatiques (Figure 19C).

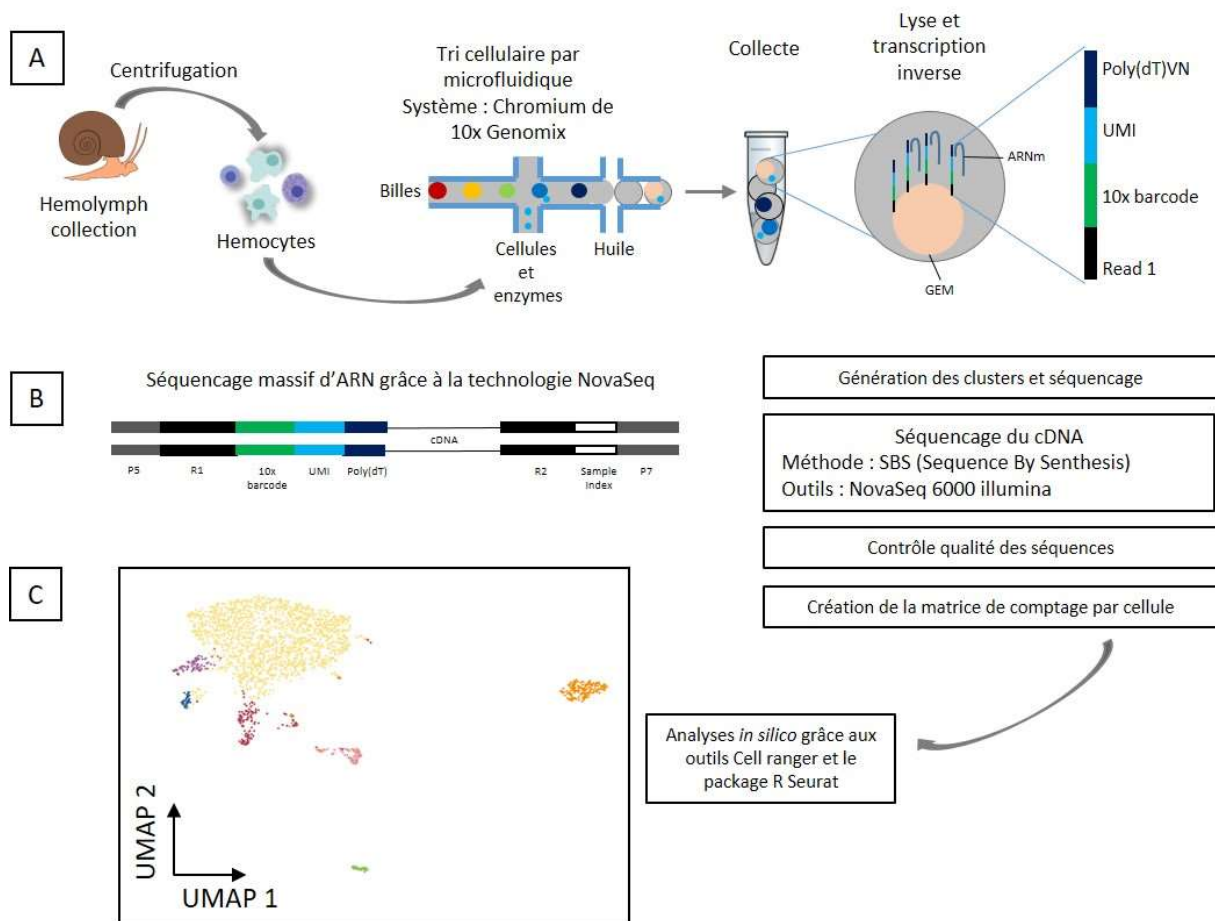


Figure 19: Schéma expliquant l'ensemble des étapes de réalisation et d'analyse du protocole de scRNA seq de 10x genomics. A : Isolation des hémocytes de *Biomphalaria* et synthèse des ADNc. B : Séquençage massif et pipeline d'analyse. C : Représentation UMAP possible des résultats de single cell RNA sequencing par l'utilisation du package R Seurat. P5 et P7 : séquence ADN dénaturée. UMI : Unique Molecular Identifier. R1 et R2 : Read 1 et 2.

### 3. Les objectifs de caractérisation des hémocytes de *B. glabrata* et leur rôle dans la mémoire immunitaire en réponse à *S. mansoni*

Par l'utilisation de ces nouvelles techniques de séparation cellulaire couplée à du séquençage massif des ARN, nous souhaitons pouvoir apporter à l'étude des hémocytes de *B. glabrata*, un outil fiable capable de nous donner un aperçu, sans *a priori*, de l'ensemble des populations transcriptionnelles d'hémocytes présentes chez *B. glabrata*. Le premier article de ce chapitre (cf. Chapitre II.C.) explore cette diversité de population hémocytaire. Il tente de rapprocher les différents « clusters » transcriptomiques (groupe de cellules ayant le même patron d'expression) aux trois populations morphologiques d'hémocytes connues dans la littérature (cf. Chapitre II.A.2.), par l'utilisation d'approches de microscopie et de cytométrie en flux couplée à du séquençage protéomique « Label-free ». Enfin, le deuxième article en préparation (cf. Chapitre II.D.), est basé, pour la première fois, sur l'analyse *in silico* de

l'expression des populations d'hémocytes de *B. glabrata* au cours d'une cinétique d'infestation et de réinfestation à *S. mansoni*, donc d'acquisition de la mémoire immunitaire innée contre ce parasite. L'utilisation de cette nouvelle technologie doit permettre l'identification et la caractérisation des populations transcriptomiques d'hémocytes capables de répondre spécifiquement à l'infestation par *S. mansoni*, mais aussi doit permettre de définir quelles sont les populations capables de porter la MII chez *B. glabrata*.

***C. Single cell RNA sequencing reveals hemocyte heterogeneity in *Biomphalaria glabrata*: Plasticity over diversity.***

Rémi Pichon,<sup>1</sup>, † Silvain Pinaud,<sup>2</sup>, † Emmanuel Vignal,<sup>3</sup> Cristian Chaparro,<sup>1</sup> Marine Pratlong,<sup>4</sup> Anaïs Portet,<sup>5</sup> David Duval,<sup>1</sup> Richard Galinier,<sup>1</sup> and Benjamin Gourbal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IHPE, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, Univ Perpignan Via Domitia, Perpignan, France

<sup>2</sup> Cambridge Institute, Li Ka Shing Center, Cancer Research UK, Cambridge, United Kingdom

<sup>3</sup> IHPE, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, Univ Perpignan Via Domitia, Montpellier, France

<sup>4</sup> Plateforme MGX - Montpellier GenomiX, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France

<sup>5</sup> Molecular Immunity Unit, Department of Medicine, Medical Research Council (MRC) Laboratory of Molecular Biology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

Edited by: Thiago Almeida Pereira, Stanford University, United States

Reviewed by: Jacob A Tennesen, Harvard University, United States; Amina Ibrahim, Theodor Bilharz Research Institute, Egypt

\*Correspondence: Benjamin Gourbal, Benjamin.gourbal@univ-perp.fr

†These authors have contributed equally to this work and share first authorship

This article was submitted to Parasite Immunology, a section of the journal *Frontiers in Immunology*

Received 2022 May 30; Accepted 2022 Aug 8.







## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Thiago Almeida Pereira,  
Stanford University, United States

## REVIEWED BY

Jacob A Tennesen,  
Harvard University, United States  
Amina Ibrahim,  
Theodor Bilharz Research Institute,  
Egypt

## \*CORRESPONDENCE

Benjamin Gourbal  
benjamin.gourbal@univ-perp.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share  
first authorship

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Parasite Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 30 May 2022

ACCEPTED 08 August 2022

PUBLISHED 05 September 2022

## CITATION

Pichon R, Pinaud S, Vignal E,  
Chaparro C, Pratlong M, Portet A,  
Duval D, Galinier R and Gourbal B  
(2022) Single cell RNA sequencing  
reveals hemocyte heterogeneity in  
*Biomphalaria glabrata*: Plasticity  
over diversity.  
*Front. Immunol.* 13:956871.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.956871

## COPYRIGHT

© 2022 Pichon, Pinaud, Vignal,  
Chaparro, Pratlong, Portet, Duval,  
Galinier and Gourbal. This is an open-  
access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use,  
distribution or reproduction is  
permitted which does not comply with  
these terms.

# Single cell RNA sequencing reveals hemocyte heterogeneity in *Biomphalaria glabrata*: Plasticity over diversity

Rémi Pichon<sup>1†</sup>, Silvain Pinaud<sup>2†</sup>, Emmanuel Vignal<sup>3</sup>,  
Cristian Chaparro<sup>1</sup>, Marine Pratlong<sup>4</sup>, Anaïs Portet<sup>5</sup>,  
David Duval<sup>1</sup>, Richard Galinier<sup>1</sup> and Benjamin Gourbal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>IHPE, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, Univ Perpignan Via Domitia, Perpignan, France,

<sup>2</sup>Cambridge Institute, Li Ka Shing Center, Cancer Research UK, Cambridge, United Kingdom, <sup>3</sup>IHPE, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, Univ Perpignan Via Domitia, Montpellier, France, <sup>4</sup>Plateforme MGX - Montpellier GenomiX, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France, <sup>5</sup>Molecular Immunity Unit, Department of Medicine, Medical Research Council (MRC) Laboratory of Molecular Biology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

The freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an intermediate host of *Schistosoma mansoni*, the agent of human intestinal schistosomiasis. However, much is to be discovered about its innate immune system that appears as a complex black box, in which the immune cells (called hemocytes) play a major role in both cellular and humoral response towards pathogens. Until now, hemocyte classification has been based exclusively on cell morphology and ultrastructural description and depending on the authors considered from 2 to 5 hemocyte populations have been described. In this study, we proposed to evaluate the hemocyte heterogeneity at the transcriptomic level. To accomplish this objective, we used single cell RNA sequencing (scRNAseq) technology coupled to a droplet-based system to separate hemocytes and analyze their transcriptome at a unique cell level in naive *Biomphalaria glabrata* snails. We were able to demonstrate the presence of 7 hemocyte transcriptomic populations defined by the expression of specific marker genes. As a result, scRNAseq approach showed a high heterogeneity within hemocytes, but provides a detailed description of the different hemocyte transcriptomic populations in *B. glabrata* supported by distinct cellular functions and lineage trajectory. As a main result, scRNAseq revealed the 3 main population as a super-group of hemocyte diversity but, on the contrary, a great hemocytes plasticity with a probable capacity of hemocytes to engage to different activation pathways. This work opens a new field of research to understand the role of hemocytes particularly in response to pathogens, and towards *S. mansoni* parasites.

## KEYWORDS

single cell RNA seq, *B. glabrata*, hemocytes, innate immune system, *S. mansoni*

## Introduction

In invertebrates, innate immune response is mainly carried out by the hemocytes, appearing as a complex family of cells specialized in immunity (1). These cells carry both the so-called cellular response of the innate immune system, through encapsulation and phagocytosis of pathogens. But also, part of the humoral response by secreting in the hemolymph many cytolytic/cytotoxic compounds like antimicrobial factors, oxygen/nitrogen reactive species (ROS/NOS), proteases or toxins (2–4).

Despite the important role played by hemocytes in the invertebrates' immune response, these cells are still very poorly characterized. Different types of invertebrate hemocytes have been described in the literature (5), mainly according to their differential abilities to respond to pathogens, from phagocytosis, cell to cell adhesion or degranulation of humoral factors (1), but also based on their morphological features (shape, size, intracytoplasmic granules, vacuoles). However, hemocyte morphology studied alone is not sufficient to define a clear functional classification of hemocytes. Indeed, a direct relationship between hemocyte morphology and their specific immunological functions against pathogens is quite impossible to establish. However, the development of new technology of sequencing at the single cell level [single cell transcriptomics (scRNAseq) (6)] is now available to access the invertebrate hemocyte functional diversity.

Single-cell transcriptomics approaches have been firstly, and successfully developed in vertebrate models to describe the high specialization of innate immune cells and study their heterogeneities (7–9). Then, this technology was successfully transferred to various other non-vertebrate models, especially for infectious diseases such as *Plasmodium* sp., the agent responsible for malaria disease. Thousands of cells across the different parasite differentiation stages were sequenced to produce the very first parasite developmental cell atlas (10, 11). Such a tool allows the definition of new-targeted therapeutic strategies and the understanding of the mechanisms of transmission to its hosts. The study of metazoan parasite species, such as *Schistosoma mansoni*, the agent responsible for human intestinal Schistosomiasis has also benefits from this technology. The scRNA seq approaches on stem cell populations from juvenile *Schistosoma* allowed to precisely define 9 transcriptomic populations of somatic cells, and the characterization of conserved gene sets involved in the regulation of germline cells (12). This technology has proven to be a major asset also in the description of hemocyte populations in invertebrate hosts, improving the definition of the heterogeneity of immune cell populations in insects such as *Drosophila*, mosquitoes and silkworm (13, 14) or crustacean shrimp (15–19). scRNA seq has allowed redefining, for the silkworms, the complexity of hemocyte populations in this model and the impact of a baculovirus infection (*Bombyx mori*

*nucleopolyhedrovirus*) on some hemocyte populations (20). In addition, for mosquitoes, hemocyte complexity following infection by *Plasmodium* has been characterized, with the definition of 6 transcriptomic clusters in comparison to the 3 populations historically described based on morphological traits (21). These scRNAseq approaches have been shown to be very efficient in all these invertebrate host/parasite models and demonstrate the feasibility of this technique to decipher the complexity of hemocyte cell populations as well as to understand the immunological mechanisms activated in hemocytes in response to pathogens.

In the present study we paid a particular attention to a schistosomiasis vector snail, the gastropod *Biomphalaria glabrata*. Schistosomiasis remains today the second human parasitic disease after Malaria, in terms of morbidity and mortality in endemic areas (22), mainly South-America and sub-Saharan Africa. Schistosomiasis disease is caused by a flatworm of the genus *Schistosoma* which uses the gastropod *Biomphalaria* as an obligatory intermediate host to complete its life cycle. Thus, the comprehension of the immunological interactions between *B. glabrata* and *S. mansoni* would help in developing new strategies to fight or control this disease. Many studies to date have focused on these molecular interactions (23), and research has rapidly identified the key role played by hemocytes in recognition and/or killing of the parasite (3). However, despite their potential importance, knowledge on *Biomphalaria* hemocytes remains very sparse and a clear description of morphological populations or subpopulations, their proportion, and their functions are still a matter of debate (24).

Among those studies on the description of hemocyte populations in *Biomphalaria*, the morphological description of the cells by optical microscopy coupled with lectin surface labeling highlighted at least four hemocyte populations (25). Currently, some works describe two populations, hyalinocytes and granulocytes (26, 27) using a combination of light and electron transmission microscopy as well as flow cytometry approaches. Other results using optical and electron microscopy (24), describe five morphologically distinct populations of hemocytes: hyalinocytes (that can be split into three subpopulations of hyalinocytes I, II and III), granulocytes and blast-like cells. However, despite these morphological characteristics, it is still complex to define their specific biological functions. It has been demonstrated that some morphologically similar cells display different biological functions or that distinct hemocyte populations display similar functions. For example, *Biomphalaria glabrata* hyalinocytes and granulocytes are known to be involved directly in the cellular response through non-self-recognition, phagocytosis and encapsulation (25). In this context, a recent study (28) has attempted to describe the function of specific hemocyte populations using a serial dilution method to isolate granulocytes and hyalinocytes and described more accurately

the specific functions associated with these cells using a massive transcriptomic sequencing approach. Finally, it has been demonstrated for blast-like cells, often considered as prohemocytes (undifferentiated cells) (24), that differential gene expression patterns could be observed, indeed some subpopulations of blast-like cells produce for example a complement like factor, named BgTEP1 (29, 30), acting as an opsonin molecule involved in the immune response against *S. mansoni* parasite, demonstrating an unexpected level of cellular complexity yet indistinguishable morphologically.

This is why, herein we used a droplet-based system of single cell RNA sequencing (31) to describe without *a priori* and for the first time, the level of heterogeneity and diversity of hemocyte populations in the freshwater snail *B. glabrata*. We discovered a slight diversity of transcriptomic populations defined by sets of marker genes specific to each of the populations combined with cell lineage relationship between different hemocyte subpopulations. These transcriptomic populations are still rather complex to correlate with the published morphological populations from microscopy, flow cytometry and label-free proteomic analyses, mostly because of the shallowness of the *Biomphalaria glabrata* genome/transcriptome/proteome annotation. In addition to bringing new clues of rather hemocyte plasticity than diversity in *Biomphalaria glabrata*, we proposed and discussed herein that complementary approaches must be used to eventually define hemocyte populations and start to face hemocyte biology where it matters most.

## Materials and methods

### Biological sample experiments

We used a *Biomphalaria glabrata* strain originated from Recife locality in Brazil (BgBRE2), recovered in 1975 and maintained since then under constant laboratory conditions. Snails were maintained at 26°C in glass aquaria and fed with green leaf lettuce *ad libitum*.

### Hemocytes preparation for morphological characterization

10 snails (size: 8-10 mm) were retained to collect hemocytes by puncturing the hemolymph (30µL per snail) according to a widely used protocol previously established using the defence reflex of hemolymph released from the cephalo-pedal sinus when the snail shrinks in its shell (32). Hemolymph was transferred on a polystyrene slide (Caplugs evergreen) and stood in a humid chamber for 30 min for hemocytes to adhere to the slide. Then, hemocytes were stained with a panoptic May-Grünwald Giemsa (MGG) type staining method by MCDh (RAL

Diagnostics) following the manufacturer recommendations. Briefly, hemocyte slides were sunk during 6 min in MCDh1 solution, 1min in a first bath of MCDh2, 2 min in a second bath of MCDh2, 1min in MCDh3, then 10 seconds in MCDh4. Slides were dried and mounted with Dako<sup>®</sup> fluorescent mounting medium (Agilent, S3023) and finally the hemocyte populations and their proportions were counted under light microscopy using a 100X objective (Supplementary Table 1).

### Hemocytes preparation for droplet scRNA sequencing

Pooled hemolymph (500µl) from 50 snails was recovered into 2ml tubes and mixed with 1.5ml of modified anticoagulant solution (98mM NaOH, 186mM NaCl, 1.7mM EDTA, 1.7mM citric acid) (13). Sample was passed through a 30µm pre-preparation filter (Miltenyi Biotec) to eliminate cell aggregates and obtain a suspension of unique cells. Then hemocytes were counted using a Malassez chamber and cell viability was measured with trypan blue exclusion technique. Samples were then spin-down (2700g, 5min, 4°C) to pellet the hemocytes and re-suspended in 50µl of anticoagulant solution [30% of BGE medium (33)] and 70% anticoagulant modified solution). To obtain a concentration of 1000 cells per microliter. Samples were then processed by MGX platform (IGH Montpellier, France) for scRNA droplet isolation (Chromium, 10X genomics) and RNA sequencing.

### Single-cell RNA sequencing and data processing

Single cell processing procedure is defined by the MGX platform (Montpellier GenomiX). Single cell suspension was obtained by a Chromium Single-Cell Controller (10X Genomics). Library preparation was performed with Single Cell 3' Reagent kits V3.1 (10X Genomics) using 10x Next GEM Technology barcode and validated by DNA quantification with Fragment Analyzer (kit High Sensitivity NGS) and qPCR (ROCHE LightCycler 480). Libraries were sequenced with an illumina NovaSeq 6000 (Illumina) and SBS (Sequence By Synthesis) techniques using NovaSeq Reagent kits (100 cycles). Output results and matrix generation were processed with 10X Genomics Cell ranger v3.1.0 software (<http://10xgenomics.com>).

All available mitochondrial gene sequences were recovered from the NCBI database (34, 35) and gene names corresponding to these sequences (Supplementary Table 2) were retrieved using blastn (36) on the *Biomphalaria glabrata* genome annotation version 1.6 available on Vector Base website ([https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/TMP TX\\_bgl aBB02\\_15/10/2021](https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/TMP TX_bgl aBB02_15/10/2021)) (37).

## Cell clustering and genes expression

Filtered matrix sorted by Cell Ranger (10X Genomics Cell Ranger 3.1.0) was used and analyzed on R (Version 4.1.0 (2021–05–18)) using Seurat package [Version 4.0.4 (38)]. Hemocytes with more than 50 unique expressed genes were kept and genes expressed in 3 or more cells were retained for the generation of the gene-cell data matrix and downstream analysis. Low quality cells were filtered out excluding cells with less than 750 or more than 3100 unique expressed genes and cells with a proportion of mitochondrial transcript higher than 5% were excluded from the analysis. Log-normalized method given by the Seurat package was used to normalize the data. Thereafter, 2,000 highly variable genes were obtained using FindVariableFeatures function, these genes were scaled and used to perform Principal Component Analysis (PCA). JackStrawPlot and ElbowPlot functions were used to determine the top principal component (15:25) that is most representative of the data set for each reduction. The dataset clustering was conducted by the FindClusters function according to identified PCs. Visualization in two dimensions of the clustering was made through the use of non-linear dimensional reduction, UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for dimension reduction) and tSNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) projection. We used Seurat (FindAllMarkers option using wilcoxon rank sum test for each cluster) to determine differentially expressed genes and gene markers (Supplementary Table 2) for each cluster ( $\text{Log}_2\text{FC} > 0.25$  and  $\text{min.pct} > 0.25$ ) and created a heatmap to represent the top n marker genes defining each cluster. Cluster-specific marker genes were determined by selecting shared characteristics as being differentially overexpressed with  $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ , expressed by a majority of cells (>80%) within the cluster and a minority of cells (<10%) in other clusters. All these marker genes were used to perform a GO enrichment analysis (fisher exact test, P-value > 0.01) using Blast2GO omicsbox (39) on *Biomphalaria glabrata* reference genome V1.6.

## Cell trajectory analysis

The cell lineage analysis was performed with bioinformatic tools Monocle3 (40) and slingshot (41) on the data processed by the Seurat package mentioned above after conversion to SingleCellExperiment object. Some transcriptomic clusters considered as being the most distant and different with respect to the marker genes that define them were removed from the analysis to perform this cell lineage. To identify temporally expressed genes we used a general additive model (GAM) based on bioinformatic workshop (42). R script used for all the bioinformatic analysis done with Seurat and Monocle3 packages were available on Zenodo (accession #: 10.5281/zenodo.6951346).

## Flow cytometry, cells sorting and Label-Free proteomic sequencing

Pooled hemolymph of 300 BgBRE snails was used for cytometry cell sorting. Briefly, hemolymph was extracted from the snails as previously described and immediately used for flow cytometry and cell sorting, 25  $\mu\text{L}$  of hemolymph was recovered from each snail for a total of 3.5 ml. Cell sorting was performed, using a FACS Canto from BD Biosciences (RIO Imaging Platform, Montpellier, France), according to the FSC and SSC parameters to discriminate each hemocyte population according to their size and granularity. With the help of FACSDIVA software, four gates were defined based on different SSC and FSC parameters (low SSC/FSC to high SSC/FSC). Hits detected in these gates were sorted, recovered on microscopic slides and observed under a light microscope to confirm the enrichment of different morphological hemocyte populations associated with the different settings of cell sorting gates. Finally, sorted hemocyte samples were recovered for label-free proteomic analysis. Recovered hemocytes were lysed in hypotonic buffer, protein extracts were quantified (2D-Quant kit protein quantification) and 200  $\mu\text{g}$  of proteins were solubilized in laemmli buffer 4x (Biorad, hercules California, USA), boiled at 95–100°C for 5 min, frozen at -80°C and send for label free sequencing to EDyP service facilities (INSERM, CEA, Grenoble, France). Protein preparation and mass spectrometry-based proteomic analyses were conducted as described in (43, 44). Protocol repeated, hereafter, from Pinaud et al., 2019. Briefly, extracted proteins were stacked in the top of an SDS-PAGE gel (NuPAGE 4 to 12%; Invitrogen) before in-gel digestion was performed using trypsin (sequencing grade; Promega). Resulting peptides were analyzed in duplicate by online nanoscale liquid chromatography tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) (UltiMate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos Pro; Thermo Scientific) using a 120-min gradient. Peptides and proteins were identified using Mascot software (Matrix Science) and confronted against either, Uniprot database and translated genome of *Biomphalaria glabrata* snail (available at vector base: <https://vectorbase.org/vectorbase/app>). Qualitative differences between samples were considered as potential markers of sorted hemocyte populations and used to infer scRNAseq clusters to a potential morphological population of hemocytes.

## Results

### Morphological description of *Biomphalaria glabrata* hemocytes

There is no real consensus on the morphological characterisation of hemocyte diversity for *Biomphalaria glabrata*.

To clarify this purpose, we decided to establish an “hemocytogram” of circulating *B. glabrata* hemocytes after plating. Three distinct hemocyte populations were identified: hyalinocytes, blast-like cells and granulocytes (Figures 1A–D). The hyalinocytes are large cells (size around 35  $\mu\text{m}$ ) with a large nucleus, characterized by different chromatin states (with a dense purple heterochromatin and a pale purple euchromatin) (Figure 1A). In their cytoplasm can be observed large unstained vacuoles. These cells are characterized by a great capacity of adherence to plastic slides and by their capacity to produce large and long pseudopodia (Figure 1A). They represented the main quantity of circulating hemocytes in *Biomphalaria glabrata*, 66.7%  $\pm$  9% (Figure 1E). The blast-like cells (Figure 1D), represented 21%  $\pm$  6% of circulating hemocytes (Figure 1E), they were small cells (around 8  $\mu\text{m}$ ), displaying a high nucleocytoplasmic ratio with very low adhesion capacities. These cells appear with a rounded shape even after plating on plastic slides (Figure 1D). Nuclei appeared very dense upon MCDh staining with a dark purple color (Figure 1D) indicating potentially a low level of gene transcription, these cells being often considered as pro-hemocytes. Finally, the third type of hemocytes were the granulocytes (Figures 1B, C) that represented 12.3%  $\pm$  3% of circulating hemocytes (Figure 1E), and were not able to adhere efficiently to plastic slides. Very few cells were able to form small filopodia and were mainly characterized by a spherical shape (Figure 1C). Granulocytes have a dense dark purple nucleus and always show neutrophilic (deep purple) to basophilic (dark blue) granules in their cytoplasm. However, among the population of granulocytes, we were able to distinguish some morphological differences. Some granulocytes were able to adhere efficiently to the slide and form long pseudopodia that could make them difficult to distinguish from hyalinocytes (Figure 1B), except that these cells possessed intracytoplasmic granulations, which make them belonging to granulocytes. The proportion of these different cell populations in hemolymph remain in agreement with the data available in the literature (24) although the sizing of these cells on plastic slides appeared very hazardous due to their variable adhesion capacities, the plasticity of their morpho-anatomic parameters, and their important size and shape variability. Thus, we were not able to define clearly, (i) the exact number of hemocyte populations and (ii) the delimitation between hemocyte subtypes. Facing such limitations, we proposed to use a scRNA-seq approach to decipher the hemocyte populations and their potential role or function using their transcriptional activity and gene expression patterns rather than their morphological parameters.

## Identification of 7 distinct clusters in *B. glabrata* hemocytes by scRNA-seq

To examine hemocyte heterogeneity by scRNA-seq, isolated hemocytes from a pool of 50 naive snails were subjected to droplet scRNAseq. Approximately 3000 cells were captured using the 10X Genomics Chromium microfluidic technique

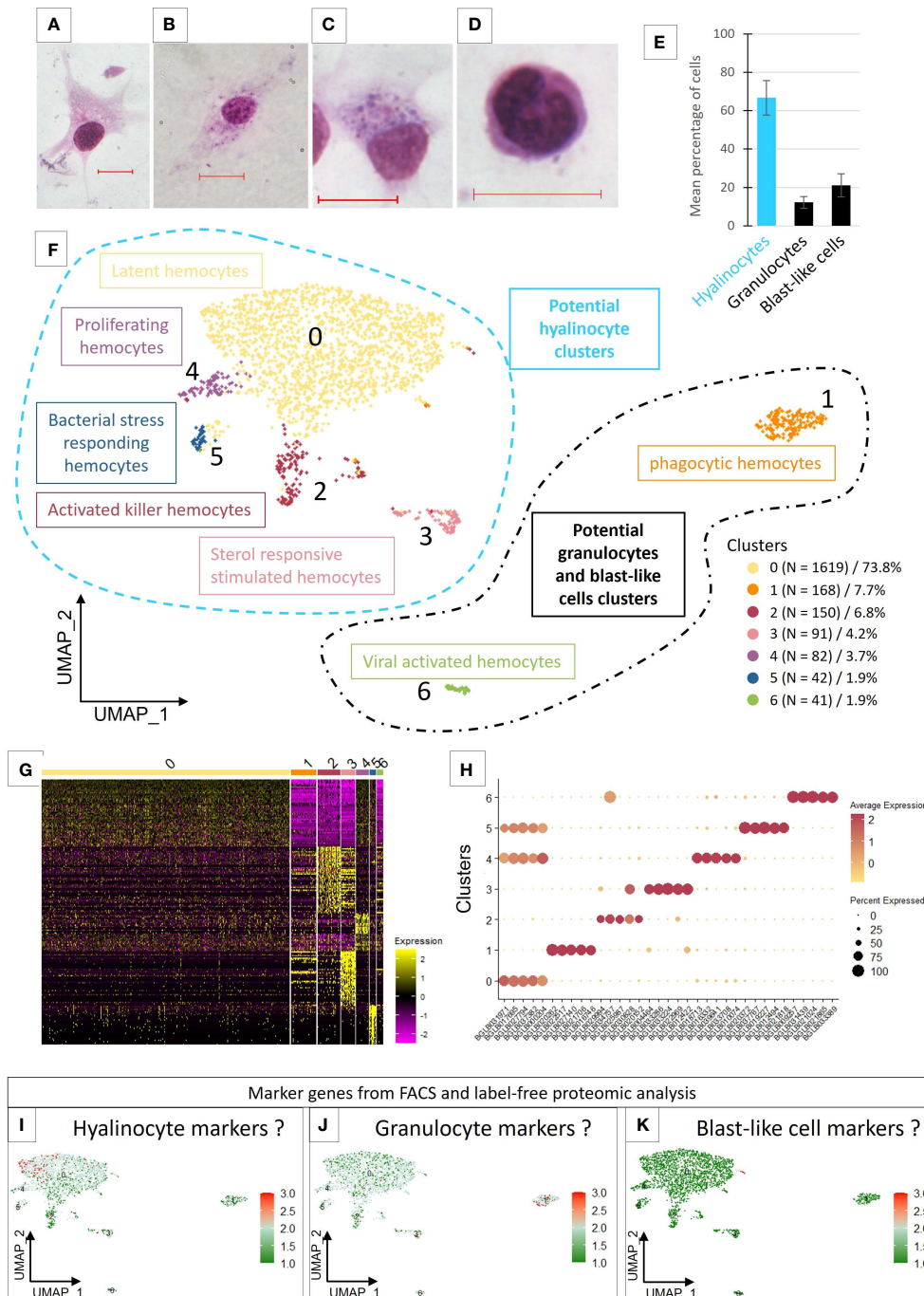
and submitted to RNA sequencing. After an initial process by Cell Ranger (10x Genomics Cell Ranger 3.1.0), the sequencing data were aligned to the *B. glabrata* reference genome (90.1% reads mapped to the genome). We obtain 2624 estimated cells with a median gene per cell corresponding to 1885 genes among the 19 820 total genes detected and a sequencing saturation at 66%. To retain high quality single cell RNA-seq data, we removed low-quality cells with gene number less than 750 and mitochondrial genes less than 5%. Seurat R package (Version 4.0.4) was used for data processing. Following such quality control, 2193 high-quality cells were used for further analysis. For each cell, an average number of 2470 genes expressed were obtained and 7 transcriptomic clusters were identified (Figure 1F). Regarding read coverage by clusters, cells in clusters 0, 2, 4 and 5 have a higher number of reads compared to cells in clusters 3, 1 and 6 (Supplementary Figure 1). These last 3 clusters may represent cells with low transcriptional activity or small cells like blast-like cells.

Most of the hemocytes gathered within a main cluster (cluster 0) which represented 73.8% of the total cells. The other clusters (cluster 1 to 6) represented from 7.7% (cluster 1) to 1.9% of the cells respectively (Figure 1F). We were able to define transcriptomic profiles and specific marker genes for each cluster (Figures 1G, H). Cluster 0 does not have genes that are completely specific to it and appears to share several defined marker genes with the clusters 4 and 5 (Figure 1H). Some marker genes of the Cluster 2 are also overlapping with cells of cluster 3, but the latter possess a very specific list of marker genes.

## Gene expression signatures and candidate markers for each hemocyte cluster

Annotation and understanding of *Biomphalaria glabrata* genome/transcriptome/proteome are still very sparse. Amongst the 31 985 defined genes for about 44 406 transcripts, less than the half possess at least a protein domain information, making every enrichment or functional analysis conditioned by annotation bias. Also, it exists a redundancy in *B. glabrata* gene annotation, meaning that same gene annotation or transcripts can have different gene name/position and different transcripts. Knowing such limits but in order to create a transcriptomic identity card for the different clusters, we were interested in the function of the marker genes detected with Seurat (Supplementary Table 2). When possible (sufficient number of genes), we performed a Gene Ontology enrichment analyses with the blast2GO tool (Supplementary Table 3), taking into account only the marker genes present in at least 80% of the hemocytes from the cluster considered.

Analysis of the enriched functions (Supplementary Table 3) showed that hemocytes from Cluster 0 expressed genes mostly



**FIGURE 1** (A–D) Light microscopy observation of MCDh-stained hemocytes. Red bars 10µm. (A) hyalinocyte; (B, C) granulocytes; (D) blast-like cell. (E) Average number of hemocytes (1844 cells total) from 10 naive individuals according to three morphological types. (F) Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction (UMAP) plot of the 7 hemocyte clusters identified in *B. glabrata* by scRNA-seq and their respective count of the cell number present in each transcriptomic cluster. (G) Heatmap representing the differential expression of the top 50 marker genes defined for each of the 7 transcriptomic clusters. (H) Dotplot representing the average expression of the 5 genes defined as markers for each cluster according to the percentage of cells expressing these genes per cluster. (I–K) represent the average expression levels of the genes defined as markers by the flow cytometry approach coupled with label free proteomics. Dotplot and UMAP representation of marker genes average expression of hyalinocyte (I), Granulocyte (J) and blast-like cells (K).

related to metabolism, energy production and protein synthesis but also functions involved in actin and cytoskeleton reorganization. These cells probably have an important translational activity but no specific specialization. We have in this cluster active cells, with generalist functions of cell maintenance but also cells able to express marker genes already described in the literature. Indeed, we found however several Pattern Recognition Receptors (PRRs) that can recognize different types of pathogens, and some of which have a very important role in immunity against *S. mansoni* parasite and especially in the recognition of this parasite, such as FREPs (45), MAM and LDL-receptor class A domain-containing 1-like (46) or genes containing von Willebrand factor EGF and pentraxin domain-containing 1 (47) that have been described in other models and which could have a role in suppressing or modulating the immunity (Supplementary Table 2). We proposed that cluster 0, named latent hemocytes (Figure 1F), is composed of circulating hemocytes that are waiting for activation in the case of a potential encounter and infection with a pathogen or the activation of alarmins. Moreover, some of the marker genes in this cluster are also expressed in clusters 4 and 5, which might suggest a strong cell filiation between these three clusters.

The five marker genes selected to characterize cluster 4 (Supplementary Table 2), were all genes involved in functions related to DNA replication and cell proliferation. Enrichment analyses confirm these functions (Supplementary Table 3). The cells in this cluster represent only 3.7% of the total number of cells (Figure 1E) considered in the analysis and may correspond to proliferating cells. Indeed, proliferation of circulating hemocytes has been yet demonstrated in naive *B. glabrata* snails with a proportion of 1.8% of hemocytes in proliferation (47), but no references has mentioned a specific hemocyte population capable of proliferating. These cells, considered as proliferating hemocytes (Figure 1F), thus appear to derive from cluster 0 and to be proliferating in response to an unknown stimulation or for maintaining a basal hemocyte turn-over.

Cluster 5 is defined by a few but specific marker genes with strong differential expression (log<sub>2</sub>FC) for the selected genes compared to all remaining cells (Supplementary Table 2). Most of these genes are not annotated. Some could have functions related to lipid metabolism (ganglioside GM2 activator) or being involved in response to pathogens (antimicrobial peptides, holotricin-3-like, PRRs). This cluster could correspond to bacterial stress responding hemocytes (Figure 1F).

Concerning cluster 3, the enriched functions (Supplementary Table 3) are mainly related to the cellular component of gene ontology. The enriched functions of this cluster tend to show active cells able to set up vacuolization and degradation processes by the lysosome. Thus, many cathepsins (L1-like, Z, B), G-type lectins, cystatin-B (48) are involved in these functions. At least 7 genes encoding proteases, cathepsins

(B, Z and D) and cathepsin like (L1) are represented as marker genes in this cluster and one cathepsin Z (BGLB004464) is specific to this cluster (Supplementary Table 2). Some of these molecules are known in the *B. glabrata/S. mansoni* model to have a possible role in the interaction with the parasite (49). We also find in this cluster functions involved in sterol and cholesterol metabolism, shown to have a role in modulating some immune pathways (50). This reinforces the idea that this cluster is a cluster of activated cells probably responding to a circulating factor and using sterols to respond, that is why we named this cluster sterol responsive stimulated hemocytes (Figure 1F).

In cluster 2, cells express some genes involved in immunity such as several cathepsins (L1-like, B, D, Z) as we can find in cluster 3 but with lower differential expression (Supplementary Table 2). This cluster is mainly marked by C-type lectin, peptidoglycan-recognition SC2-like or an apolipoproteins-like isoform X1 which is initially known for lipid transport but which may also have a role in the immune response and especially in encapsulation (23, 51). Other genes are strongly involved in different signaling pathways (MAPK, ERBB2, etc.) or in the regulation of cell necrosis and vacuole formation (Supplementary Table 3). The cells that make up this cluster could therefore be activated killer hemocytes (Figure 1F), either dying or degrading possible phagocytosed pathogens.

Cluster 1 represents 7.7% of the total cells (Figure 1E) in the analysis and is marked mainly by functions involved in the activation of the immune response and different pathways related to cell phagocytosis capabilities as well as functions involved in vacuolization and cytoskeleton rearrangement processes (Supplementary Table 3). Among the genes selected as potential marker genes for this cluster (Supplementary Table 2), we also find immune genes such as a fibrinogen-related protein J1 precursor and a cathepsin B-like. Thus, this cluster could be composed of activated cells possessing phagocytosis capabilities and as described with a smaller RNA content would be strongly considered as a blast-like cell cluster.

Cluster 6 expressed genes involved in cell differentiation and migration functions (ERBB2 signaling pathway) as well as genes having immune-related annotations like cathepsin and apolipoproteins, an immune receptor role like toll-like receptor or macrophage mannose receptor or even functions annotated to be involved in response to virus (Supplementary Table 3). This cluster is also marked by a high ribosomal activity marked by rRNA metabolic process and ribosome biogenesis functions and therefore probably a high translational activity. They are therefore cells with membrane and vesicular activity accompanied by modifications of the cytoskeleton, which could correspond once again to active phagocytic cells, may be in response to virus infection. We named this cluster viral activated hemocytes (Figure 1F).



## Label free proteomic from FFC/SSC-sorted hemocyte populations

Preliminary analyses of cell sorting by flow cytometry were coupled with label free proteomic analysis to attempt to associate morphology and final gene products with the objective to find specific markers of hemocyte populations. We can notice that the distribution of hemocytes according to the size and granulometry forms a continuum and does not allow to discriminate with accuracy one or more cell types or populations based on such cytometry characteristics (Supplementary Figure 2). Compared to a cell description on a microscopy slide where the hemocytes have specific adhesion capacities for each population, the hemocytes sorted by cytometry no longer have these characteristics. The cells are in suspension and therefore probably keep a round shape which prevents a simple discrimination by size and granulometry. However, the classical three morphological populations (hyalinocyte, granulocyte and blast-like cells) were attempted to be enriched by sorting in each of the gates (P1 to P4) (Supplementary Figure 2). Each of these gates corresponds to a specific FFC/SSC ratio gradient. The P4 fraction corresponds to cells defined as small to medium size with medium granularity. This fraction may allow an enrichment in hyalinocytes. The P3 fraction corresponds to cells of medium size and medium granulometry, which may allow the enrichment of blast-like cells but also some hyalinocytes. The P2 fraction corresponds to cells of small size and high granulometry, which did not give any enrichment of cells and was mostly composed of cell debris. This fraction was therefore not retained for the proteomic analyses. Finally, the P1 fraction corresponds to large size cells with high granulometry, which corresponds to a sample potentially enriched in granulocytes. The label-free proteomic analyses produce, for each of these sorted cell populations, the protein enrichment (Supplementary Table 4). The average expression of the genes encoding these proteins are used in the scRNA seq analysis to produce an expression mapping among the 7 clusters already described.

Unfortunately, the protein enrichment and the gene analysis from the identified proteins is not sufficient to obtain specific markers that fit with scRNAseq clustering. Indeed, all clusters seem to express all genes determined from the label free analysis. However, slight differences in the expression of these genes in some clusters are highlighted. First, we can see that few genes are specific to the fraction corresponding to an enrichment in blast-like cells. These genes are found to be carried by cells belonging to cluster 1 even though these cells seem to be closer to cluster 0 in the UMAP representation (Figure 1K). Genes representing the hyalinocyte-enriched fraction would be expressed by cells from clusters 0, 3 and 4 (Figure 1I) whereas clusters 1, 3 and 6 would represent cells expressing genes attributed to the granulocyte-enriched fraction (Figure 1J).

Overall results lead us to consider that cluster 0 may contain all the known cell types, since we have in this cluster

the expression of all the genes that are supposed to define our enriched fractions in the three different hemocyte morphological populations. Only markers expressed specifically by clusters 1 and 6 seem belonging to the fraction enriched in granulocytes. These two clusters are also very particular because they are very different in this analysis from all other clusters and express their own marker genes. The lineage analyses do not allow us to establish a link between these clusters and the other clusters, which prevents us from studying in more detail the links that may exist between all the other clusters and cluster 0. This is why we decided to subset out cluster 1 and 6 for further analyses.

## Cell lineage

The cell lineage analysis on all the 7 transcriptomic clusters was inconclusive. The most differentiated clusters in the analysis (clusters 1 and 6) prevent from defining relationships between cells in the other clusters. For this reason, we removed clusters 1 and 6 and re-run the cell lineage clustering analyses (Figure 2A). We identified 2 particular cell lineages (Figure 2B), both probably originating from cluster 0 chosen by default as the starting point of the pseudo-time trajectory construction. The first lineage path connects clusters 0, 4 and 3 and the second lineage connects clusters 0 and 2 (Figure 2B). Cluster 5 is not linked by the pseudotime analysis to the other clusters because it shares too many similarities in terms of expressed marker genes with cluster 0 (Figure 2C) and the probable lack of a sufficient number of cells for this cluster prevents a correct trajectory analysis. From the calculated pseudotime, we have estimated the top 100 most variable genes along this lineage (Figure 2D). We can immediately notice that most of the genes that define the lineages towards cluster 2 and 3 are genes known to be involved in various immune responses such as an integrin, toll-like receptor, several cathepsins, or an antimicrobial peptide hydramacin. These gene sets reinforce the hypothesis that clusters 4 and 3 may represent two steps of hemocyte activation following a yet unknown signalling with the cluster 4 as an intermediate state and the cluster 3 as a terminal state of activation. Furthermore, for each of these clusters we are able to assign specific genes with a possible link to immune responses. A set of these genes alone can define each of the differentiated clusters in our analysis as cluster 2 (Figure 2G), cluster 3 (Figure 2H) and cluster 5 (Figure 2I).

## Use of the literature to define different transcriptomic clusters

The preliminary flow cytometry and microscopy approaches do not allow us to accurately connect morphotypes with scRNAseq transcriptomic clusters. We therefore relied on the

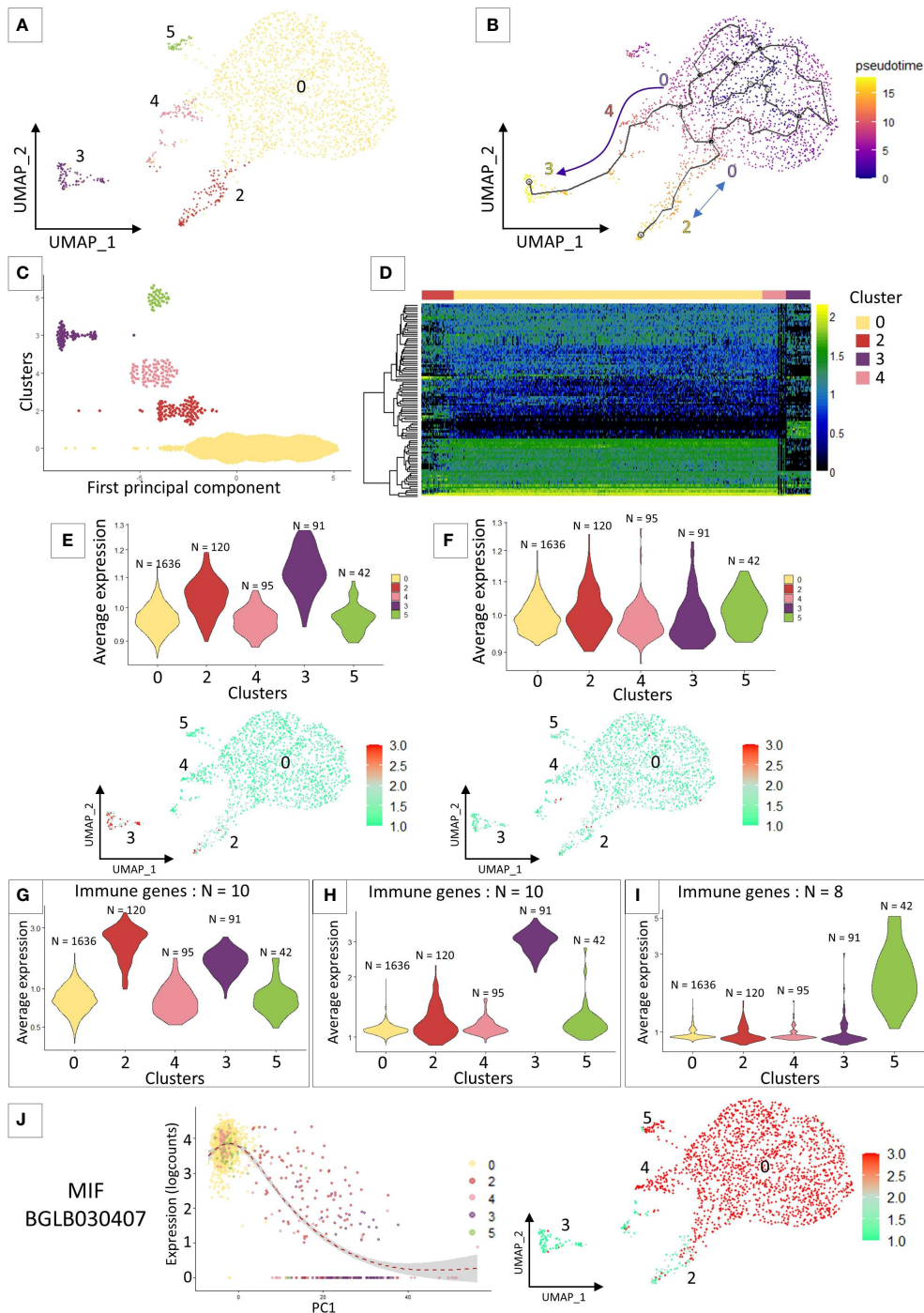


FIGURE 2

**(A)** UMAP representation of cluster 5 identified after removing clusters 1 and 6 from the previous analysis and performing reclustering. **(B)** Pseudo time analysis on the UMAP representation. Arrows represent the direction of the possible differentiation process between the different transcriptomic clusters. **(C)** Dotplot of the cluster cells ordered along the pseudo time. **(D)** heatmap representing the expression of the 100 most variable genes that characterized the pseudo-time analysis across the 4 clusters. **(E)** and **(F)** Violin plots of the average expression of marker genes from the literature. **(E)** represents granulocyte marker genes and **(F)** represents hyalinocyte marker genes. **(G, H)** and **(I)** Average expression of an immune gene set belonging to different "activated" clusters such as cluster 2 (**G**), cluster 3 (**H**) and cluster 5 (**I**). **(J)** Expression of the MIF gene along the pseudo-time (left graph) and the representation of its expression by the different cells of the analysis on the UMAP representation (right graph).

literature to find marker genes for our different hemocyte populations. As the latter is currently very limited, we focused on the recent work of Li and collaborators (28) that analyse in *Biomphalaria* the transcriptomic expression of hyalinocytes and granulocytes. We selected immune genes that authors were able to extract from their analysis and that were more strongly expressed either by hyalinocytes or granulocytes. We retrieved those immune gene orthologs, indistinguishable from the two mollusk strains (BS-90 and M-line strains) studied, from each of the two morphological hemocyte populations. We then averaged the expression of all genes, by cell type, that we are able to detect in our scRNAseq analysis to determine which transcriptomic cluster would be very likely to express these immune gene pools (Figures 2E, F). The immune marker genes defined for hyalinocytes using this approach, do not fit a particular cluster for this cell morphotype. All the immune genes taken in this analysis are expressed in all the clusters (Figure 2F) and especially are not differentially expressed between the clusters (Figure 2F). On the other hand, and as expected from previous analyses, the immune genes expressed by granulocytes in the literature are found to be more expressed in a part of the cells of cluster 2 and in the majority of the cells of cluster 3 (Figure 2E). These genes defined as granulocyte-specific were also found to be slightly over-expressed in cluster 1. Furthermore, if we look at some specific genes, found in a few rare articles defining a gene for a probable hemocyte population in *Biomphalaria*, such as granulin (BgGRN: BGLB011796), suspected to be expressed by some granulocyte subtypes (28, 52, 53), we notice that this gene seems to evolve along the pseudotime to be expressed by clusters 2 and 3. A gene that might be associated with granulin would be a toll-like receptor (54) that is found in our analyses to be expressed also by cells of cluster 2 (Supplementary Figure 3). All of these evidences could lead us to believe that a specialization of hemocytes takes place from cluster 0 to clusters 4 and 3 or to cluster 2. The latter could then be associated with possible granulocytic activated cells. We also find the expression of a gene belonging to the Macrophage Migration Inhibitory Factor family (MIF: BGLB030407), this protein has been shown to be overexpressed in some granulocyte-like hemocytes (55) and could serve as regulating hemocyte, proliferation activation and encapsulation response. The gene coding for this protein in our analysis is not found in cluster 3 and expressed in all the other clusters and in particular with a gradient of expression between cells in cluster 2 (Figure 2J). We can speculate that this gene expression pattern could then be an activation sign of certain hemocytes and of differentiation towards granulocyte cells.

## Discussion

Our current knowledge about *Biomphalaria glabrata* hemocytes is still very sparse. The different populations of

hemocytes have been only described so far by transmission electron microscopy (TEM) and flow cytochemistry approaches, or by optical microscopy and cell morphology description (24, 26, 27). Very few studies also address the question of the cell lineage of these hemocytes and the characterization of the hematopoiesis, by the amoebocyte producing organ (APO) (56, 57). To date, the scientific community agrees on the presence of at least 3 morphological populations defined only by their behaviour toward plating: hyalinocytes, granulocytes and blast-like cells. However, it seems to be a greater complexity and plasticity within these three large populations, and this diversity is very dependent on the tools used to characterize them (microscopy, flow cytometry, scRNA-seq).

Moreover, even the name given for each population was inconsistent in the literature, this increases the complexity of description of these populations [i.e., large adherent cells were called sometimes hyalinocytes or granulocytes depending on the paper considered (24, 26)]. For us, when hemocytes are allowed to adhere to a plastic slide, it is immediately obvious that the non-granulocytes adhere much better to the support by forming long pseudopodia and are considered as hyalinocytes (Figure 1A). However, it can also be seen that there are cells that are morphologically very close to hyalinocytes with intracytoplasmic granulations, that could be considered as adherent granulocytes or granular hyalinocytes (Figure 1B). Thus, the characterization of hemocytes by microscopy is very dependent on the technique employed (TEM, light microscopy, staining reagent used,) or the support used for plating (polystyrene, plastic or glass slides). Moreover, distinguishing those hemocyte populations was particularly complicated in flow cytometry when all hemocytes are in suspension, they all display a spherical shape resulting in a continuum of size and granularity. Nevertheless, we have counted these different populations in naive snails and found that the majority of hemocytes were hyalinocyte-like cells, then blast-like cells and finally granulocytes (Figure 1E). These data are fairly consistent with the proportions determined by (24).

The scRNA-seq technology brings *de-novo* and without *a-priori* gene enrichment and heterogeneity information from a complex cell suspension. It brings information as well about potential role and function of each hemocyte transcriptional population but can also determine a possible lineage relationship between all these cells. For this purpose, we decided to study circulating hemocytes of naive *B. glabrata* snail, considered as not having undergone any experimental infection. We identified 2 large groups (Figure 1F) based on their transcriptomic identity, where a large and complex population of probable hyalinocyte (cluster 0, 2, 3, 4 and 5) is well separated from 2 distant populations (clusters 1 and 6) of differentiated hemocytes which could then be associated with probable blast-like cells, because of the few transcripts found in these two clusters (Supplementary Figure 1) or with granulocytes (Figure 1F).

Moreover, the population distribution from microscopic observations fit the overall distribution of those 3 clusters (Figure 1E) (Figure 1F). All combined reveal a greater heterogeneity among circulating *B. glabrata* hemocytes compared to what have been defined by microscopy approaches alone (Figure 1E) but most likely potentially supported by a plasticity of hemocyte population (potentially from hyalinocyte activation pathway) rather than lineage-separated circulating cells. This high plasticity of hemocytes could also be accentuated by the large number of snails used to collect the hemocytes, which could add some inter-individual variation in the data analysis. This diversity in the origin of the hemocytes would then show the activation capacity of certain hemocyte types according to the specific physiological status of each individual, this could also explain the small number of cells observed for certain activated clusters such as cluster 3, which may originate from solely few individuals within the snails pool. The understanding of this plasticity rather than diversity of *B. glabrata* hemocytes will now deserve further investigation.

For each of these clusters, we provided a cell identity map by identifying their particular gene markers (Supplementary Table 3) to which we selected at least 5 marker genes defined as highly specific to each transcriptomic cluster (Supplementary Table 1). These marker genes helped us to define specific functions expressed by each of these hemocyte transcriptomic populations. However, the lack of deep annotation and literature for specific hemocyte markers prevent us from defining with precision a link between transcriptomic profile and morphological identity. At first glance, we hypothesised that hemocyte heterogeneity may be supported by plasticity in activation from few populations rather than large diversity of functionalized populations.

In an attempt to connect morphological features and scRNAseq clusters, we used FACS approaches of cell sorting based on basic morphological features such as size and granularity (FSC and SSC) of the hemocytes before analysing them with a global label-free proteomic approach. Nonetheless, as previously shown (47), *B. glabrata* hemocytes formed a continuum of size and granularity that does not allow us to accurately sort any particular hemocyte population. However, by defining specific gates on the FACS it was possible to recover fractions enriched by the three populations commonly accepted in our model (Supplementary Figure 2). From these sorted cell fractions, we performed a protein extraction, which was subjected to label-free LC-MS analyses. But unfortunately, the genes coding for the identified proteins did not allow us to link the hemocyte morphotypes to the different transcriptomic clusters. Indeed, we do not find by any particular differential expression of the marker genes defined for the hyalinocyte and blast-like cell fractions. However, a certain pattern seems to emerge for the genes belonging to the granulocyte-enriched fraction, which seem to be slightly overexpressed in the cells of clusters 1 and 6. These data seem to be corroborated by different

genes identified from the literature that were assigned to granulocyte clusters. Indeed, we find genes such as granulin, some toll-like receptors more strongly expressed in these clusters 1 and 6 or cell differentiation factors such as MIF gene (Figure 2J) which is practically no longer expressed in clusters 1 and 6 and these hemocytes follow a particular expression pattern along the pseudotime when we use the cluster 0 as starting point. Clusters 1 to 6 would therefore represent differentiating or differentiated cells. These hemocyte clusters are composed of rather active cells even if in these clusters the RNA count is low (Supplementary Figure 1). The marker gene set detected is however very specific to these clusters and strongly linked to various immune responses.

However, we decided to remove clusters 1 and 6 from the analyses because the genes expressed in these two clusters are very different from the other clusters. It was then impossible to obtain a cell lineage between these two clusters and the rest of the clusters grouped around cluster 0. Either the cells that compose clusters 1 and 6 are from different progenitors or they are from different cell lines that we were not able to capture by this drop-seq approach. To solve this problem one possibility would be to increase the number of hemocytes captured in order to detect the rare hemocytes in our study model that could link all the transcriptomic clusters in the analysis. With this increase in the number of hemocytes captured, it would also be important to increase the depth and sensitivity of sequencing in order to be able to detect more genes in all cells like the use of well-based scRNAseq methods including smartseq2-3 (58, 59). For example in this analysis, we were not able to detect certain genes known to be expressed in hemocytes such as biomphalysin or BgTEP (30, 60). BgTEP were known to be expressed by a subpopulation of blast-like cells (29), thus using BgTEP as a marker gene would be particularly relevant, if we were able to detect it in scRNAseq approach.

Cluster 0 regroups the majority of the cells in our analysis and preferentially expresses a multitude of PRRs and genes involved in energy production. The cells of this cluster may be probably be considered as latent, sentinel cells, harboring a large diversity of receptors waiting to be activated by a contact with a stimulus (pathogen, circulating alarmins, etc). The cells in this cluster also express all the marker genes of the three hemocyte morphotypes defined on the basis of data from proteomics or the literature. It would therefore seem that this cluster is possibly composed of several different hemocyte morphotypes or only hyalinocytes cells due to the large number of genes expressed which would suggest large cells, waiting for a biotic or abiotic signal to engage in a specific differentiation pathway. One possible scenario would be that some of these cells, from cluster 0, would enter into division (which could represent cluster 4) and then produce active cells (represented here by the cells of cluster 3 linked in the pseudo-time to cells of cluster 4). This differentiation from cluster 0 to cluster 4 and cluster 3, may also be supported by the analysis of the MIF gene

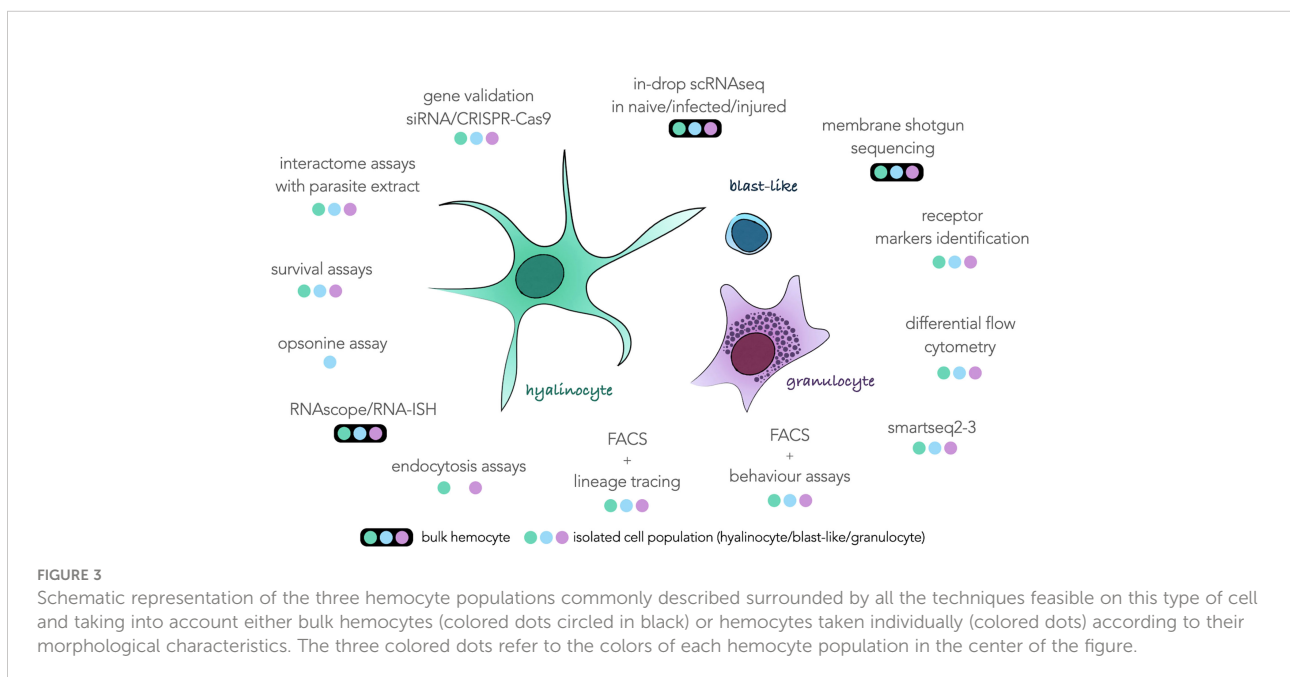
(Figure 2J) which could be considered as a differentiation factor towards granulocytes because of the decreasing of its expression along the pseudotime (Figure 2J) in the clusters identified in differentiation. This hypothesis of a progressive hemocyte differentiation may also be supported by recent studies conducted on crayfish (61) showing that in crustaceans a greater plasticity of hemocytes is also found and that the majority of hemocytes in this model are derived from a single common lineage. These hemocytes therefore tend to differentiate into functionally different populations where granulocyte-like hemocytes would be the terminal stage of differentiation. Based on our results, can we propose that a similar process of cell activation occurs in *B. glabrata* snails or more largely in invertebrates? This question will deserve further investigations.

One way to confirm this hypothesis would be to experimentally expose snails, and therefore hemocytes, to various pathogens and see if new populations would be able to emerge from this cluster 0. However, it is interesting to note that we find in cluster 6 and cluster 5, some sets of marker genes involved in responses to pathogens such as bacteria (cluster 5) or virus (cluster 6). These clusters could represent hemocytes that can be involved in the control of microbiota communities. Indeed, it is yet hypothesized that the immune system is necessary for the control and maintenance of the microbial communities associated with the holobionts in *B. glabrata* snails. This is particularly true for bacteria (62, 63) and potentially for virus control (64) in which clusters 5 and 6 may potentially be involved.

All the results in this study still prevent us from assigning each transcriptomic cluster to a particular hemocyte morphotype with certainty. However, this scRNAseq analysis

provides the basis for further descriptions of the function of each hemocyte type. The marker genes defined in this analysis allow us to draw an identity map of each of the transcriptomic clusters, and will be a terrific tool that can be used in a near future for the morphological validation of each of these cell groups. For example, a gene coding for a transmembrane protein (transmembrane 97-like) is highly expressed in cluster 1 and could be of great interest to determine if this cluster corresponds to one or more morphological cell types. But how can we physically separate our hemocytes? How to define more precisely the cells of cluster 0? The next challenges concerning the description of these hemocytes will consist in developing and combining more cutting-edge technology approaches of physical separation of hemocytes. We have summarized in Figure 3 an exhaustive list of all the techniques and analysis that will need to be performed on these hemocytes to reveal their possible functions in the organism and the morphology associated with each of these functions.

These approaches can be split in two strategies, using hemocytes and complex tissues as a bulk or using single isolated cells. More in-drop isolated scRNAseq sequencing would bring new information about response to infection or injury in hemocytes. More sequencing would bring more accurate marker genes that could be used for targeted approaches such as *in-situ* hybridisation, siRNA or CRISPR-Cas9. Unfortunately, those approaches could still not be relevant to obtain membrane markers that could be used for FACS purposes. Indeed, surface markers often have low levels of RNA abundance and can be under the method sensitivity threshold. For this purpose, we propose to enrich hemocyte membrane proteins for MS-MS analysis to identify proteins



harbored on hemocyte surfaces. Those proteins can then be used as targets for antibody-based isolation (FACS, MACS) or immunohistochemistry. As soon as several sub-populations of hemocyte can be isolated in flow cytometry gates, a novel era may start for the *Biomphalaria glabrata* community working on immunity. Obviously, it would pave the way for basic flow-cytometry immunology where cell populations are monitored following an immune stress, alarmin injection or parasite infection. The improvement of FACS techniques, coupled with approaches of more sensitive scRNAseq technologies such as smart-seq methods would increase the quality of transcriptome obtained for each population and be useful to characterize each of the morphological populations and their behaviour to certain pathogens or parasites. Moreover, those sorted sub-populations could then be used for *in-vitro* endocytosis or opsonin assays where we may observe the ability of the different hemocytes to interact, induce phagocytosis or actively endocytose differentially treated beads, parasites or pathogens.

Finally, determining the links between the different morphological populations and their functions is an essential step in understanding snail immune mechanisms, particularly in the context of immune response and innate immune memory acquisition towards the parasite *S. mansoni* responsible for intestinal schistosomiasis in humans. Much evidence leads to hemocyte while suggesting a support for innate immune memory. Here, we bring new evidence proving the plasticity over the diversity of hemocytes population in *Biomphalaria glabrata* and we bring new guidelines to transform hemocyte immunology research in invertebrates.

## Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The data presented in the study are deposited in the Sequence Read Archive (SRA) repository, accession number PRJNA844512.

## Author contributions

Investigation and experimental procedures: RP, MP, AP, RG and BG. Bioinformatic analysis: RP, SP, CC. Writing—Original Draft Preparation: RP, SP and BG. Writing—Review & Editing: RP, SP, EV, DD, RG, and BG. Project Administration: RG and BG. Funding Acquisition: DD and BG. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This study is set within the framework of the “Laboratoires d’Excellences (LABEX)” TULIP (ANR-10-LABX-41). DD and

BG were supported by the ANR AEROSNAIL (ANR-19-CE11-0016-01) from the French National Research Agency (ANR). BG was supported by the BQR from the University of Perpignan. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Acknowledgments

Thanks to cytometry facilities of the MRI platform (Montpellier ressource imagerie) as well as the EDyP service platform for their help in the development and implementation of cell sorting and label-free proteomics. Thanks to the technical staff of the IHPE laboratory, Jean-Francois Allienne for his expertise in molecular biology, Anne Rognon and Damien Pouzol for the maintenance of mollusc strains and their expertise on animal experimentation.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.956871/full#supplementary-material>

### SUPPLEMENTARY FIGURE 1

UMAP (A) and violinplot (B) of RNA count by cell among the different transcriptomic clusters.

### SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Graph representing the distribution of occurrence by flow cytometry as a function of SSC and FSC measurement. The four colored windows noted from P1 to P4, correspond to the selection criteria of the occurrences to carry out the cellular sorting. The results of the microscopic observations of each of these fractions are noted on the right of the graph.

### SUPPLEMENTARY FIGURE 3

(A) Expression of the granulin (BGLB011796) and (B) toll-like receptor (BGLB008602) gene along the pseudo-time and the representation of its expression by the different cells of the analysis on the UMAP representation.

## References

- Melillo D, Marino R, Italiani P, Boraschi D. Innate immune memory in invertebrate metazoans: a critical appraisal. *Front Immunol* (2018) 9:1915. doi: 10.3389/fimmu.2018.01915
- Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *BMB Rep* (2005) 38(2):128–50. doi: 10.5483/BMBRep.2005.38.2.128
- Coustau C, Gourbal B, Duval D, Yoshino TP, Adema CM, Mitta G. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish Shellfish Immunol* (2015) 46(1):5–16. doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.036
- Tetreau G, Pinaud S, Portet A, Galinier R, Gourbal B, Duval D. Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate. *Front Immunol* (2017) 8:1249. doi: 10.3389/fimmu.2017.01249
- Buchmann K. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Front Immunol* (2014) 5:459. doi: 10.3389/fimmu.2014.00459
- Shalek AK, Satija R, Adiconis X, Gertner RS, Gaubblomme JT, Raychowdhury R, et al. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nat* (2013) 498(7453):236–40. doi: 10.1038/nature12172
- Proserpio V, Mahata B. Single-cell technologies to study the immune system. *Immunology* (2016) 147(2):133–40. doi: 10.1111/imm.12553
- Stubbington MJ, Rozenblatt-Rosen O, Regev A, Teichmann SA. Single-cell transcriptomics to explore the immune system in health and disease. *Science* (2017) 358(6359):58–63. doi: 10.1126/science.aan6828
- Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat Rev Immunol* (2018) 18(1):35–45. doi: 10.1038/nri.2017.76
- Reid AJ, Talman AM, Bennett HM, Gomes AR, Sanders MJ, Illingworth CJ, et al. Single-cell RNA-seq reveals hidden transcriptional variation in malaria parasites. *Elife* (2018) 7:e33105. doi: 10.7554/eLife.33105
- Howick VM, Russell AJ, Andrews T, Heaton H, Reid AJ, Natarajan K, et al. The malaria cell atlas: Single parasite transcriptomes across the complete plasmodium life cycle. *Science* (2019) 365(6455):eaaw2619. doi: 10.1126/science.aaw2619
- Diaz Soria CL, Lee J, Chong T, Coghlan A, Tracey A, Young MD, et al. Single-cell atlas of the first intra-mammalian developmental stage of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Commun* (2020) 11(1):1–16. doi: 10.1038/s41467-020-20092-5
- Severo MS, Landry JJ, Lindquist RL, Goosmann C, Brinkmann V, Collier P, et al. Unbiased classification of mosquito blood cells by single-cell genomics and high-content imaging. *Proc Natl Acad Sci* (2018) 115(32):E7568–77. doi: 10.1073/pnas.1803062115
- Kwon H, Mohammed M, Franzén O, Ankarklev J, Smith RC. Single-cell analysis of mosquito hemocytes identifies signatures of immune cell subtypes and cell differentiation. *Elife* (2021) 10:e66192. doi: 10.7554/eLife.66192.sa2
- Cattenez PB, Sakr R, Pavlidaki A, Delaporte C, Riba A, Molina N, et al. Temporal specificity and heterogeneity of drosophila immune cells. *EMBO J* (2020) 39(12):e104486. doi: 10.15252/embj.2020104486
- Cho B, Yoon SH, Lee D, Koranteng F, Tattikota SG, Cha N, et al. Single-cell transcriptome maps of myeloid blood cell lineages in drosophila. *Nat Commun* (2020) 11(1):1–18. doi: 10.1038/s41467-020-18135-y
- Tattikota SG, Cho B, Liu Y, Hu Y, Barrera V, Steinbaugh MJ, et al. A single-cell survey of drosophila blood. *Elife* (2020) 9:e54818. doi: 10.7554/eLife.54818
- Koiwai K, Koyama T, Tsuda S, Toyoda A, Kikuchi K, Suzuki H, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals *penaeid* shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process. *Elife* (2021) 10:e66954. doi: 10.7554/eLife.66954.sa2
- Feng M, Swevers L, Sun J. Hemocyte clusters defined by scRNA-seq in *Bombyx mori*: In silico analysis of predicted marker genes and implications for potential functional roles. *Front Immunol* (2022) 13:852702–852702. doi: 10.3389/fimmu.2022.852702
- Feng M, Xia J, Fei S, Peng R, Wang X, Zhou Y, et al. Identification of silkworm hemocyte subsets and analysis of their response to baculovirus infection based on single-cell RNA sequencing. *Front Immunol* (2021) 12:1521. doi: 10.3389/fimmu.2021.645359
- Raddi G, Barletta ABF, Efreanova M, Ramirez JL, Cantera R, Teichmann SA, et al. Mosquito cellular immunity at single-cell resolution. *Science* (2020) 369(6507):1128–32. doi: 10.1126/science.abc0322
- Verjee MA. Schistosomiasis: still a cause of significant morbidity and mortality. *Res Rep Trop Med* (2019) 10:153–63. doi: 10.2147/RR.TM.S204345
- Castillo MG, Humphries JE, Mourão MM, Marquez J, Gonzalez A, Montelongo CE. *Biomphalaria glabrata* immunity: Post-genome advances. *Dev Comp Immunol* (2020) 104:103557. doi: 10.1016/j.dci.2019.103557
- Cavalcanti MGS, Mendonça AMB, Duarte GR, Barbosa C, De Castro C, Alves LC, et al. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Micron* (2012) 43(2–3):285–91. doi: 10.1016/j.micron.2011.09.002
- Matricon-Gondran M, Letocart M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*: I. characterization of hemocytes and fixed phagocytes. *J Invertebrate Pathol* (1999) 74(3):224–34. doi: 10.1006/jipa.1999.4876
- Prokhorova EE, Serebryakova MK, Tokmakova AS, Ataev GL. Hemocytes of mollusc *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, pulmonata). *Invertebrate Survival J* (2018) 15(1):346–351.
- Tokmakova AS, Serebryakova MK, Prokhorova EE, Ataev GL. Study of the proliferative activity of hemolymph cells in pulmonate molluscs. *Invertebrate Survival J* (2020) 17:63–74.
- Li H, Gharamah AA, Hambrook JR, Wu X, Hanington PC. Single-cell RNA-seq profiling of individual *Biomphalaria glabrata* immune cells with a focus on immunologically relevant transcripts. *Immunogenetics* (2021) 74:77–89. doi: 10.1007/s00251-021-01236-3
- Portet A, Galinier R, Pinaud S, Portela J, Nowacki F, Gourbal B, et al. BgTEP: an antiprotease involved in innate immune sensing in *Biomphalaria glabrata*. *Front Immunol* (2018) 9:1206. doi: 10.3389/fimmu.2018.01206
- Duval D, Pichon R, Lassalle D, Lafitte M, Gourbal B, Galinier R. A new assessment of thioester-containing proteins diversity of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Genes* (2020) 11(1):69. doi: 10.3390/genes11010069
- Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, Ryvkin P, Bent ZW, Wilson R, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* (2017) 8(1):1–12. doi: 10.1038/ncomms14049
- Mitta G, Galinier R, Tisseyre P, Allienne JF, Girerd-Chambaz Y, Guillou F, et al. Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Dev Comp Immunol* (2005) 29(5):393–407. doi: 10.1016/j.dci.2004.10.002
- Hansen EL. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): Establishment and characteristics. In: *Invertebrate Tissue Culture: Research Applications* Ed K Maramorosch (1976) 75–97. doi: 10.1016/B978-0-12-470270-7.50011-2
- Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* (2007) 36(suppl\_1):D13–21. doi: 10.1093/nar/gkm1000
- Zhang SM, Bu L, Laidemitt MR, Lu L, Mutuku MW, Mkoji GM, et al. Complete mitochondrial and rDNA complex sequences of important vector species of *Biomphalaria*, obligatory hosts of the human-infecting blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Sci Rep* (2018) 8(1):1–10. doi: 10.1038/s41598-018-25463-z
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* (1990) 215(3):403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Giraldo-Calderón GI, Emrich SJ, MacCallum RM, Maslen G, Dialynas E, Topalis P, et al. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Res* (2015) 43(D1):D707–13. doi: 10.1093/nar/gku1117
- Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM III, Zheng S, Butler A, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* (2021) 184(13):3573–3587. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.048
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* (2008) 36(10):3420–35. doi: 10.1093/nar/gkn176
- Cao J, Spielmann M, Qiu X, Huang X, Ibrahim DM, Hill AJ, et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature* (2019) 566(7745):496–502. doi: 10.1038/s41586-019-0969-x
- Street K, Rizzo D, Fletcher RB, Das D, Ngai J, Yosef N, et al. Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics* (2018) 19(1):1–16. doi: 10.1186/s12864-018-4772-0
- Lyu R, Qiao P, Kiselev V, Andrews T, Westoby J, Büttner M, et al. Analysis of single cell RNA-seq data” (2019). Available at: [https://scrnaseq-course.cog.sanger.ac.uk/website/index.htmlhttps://biocellgen-public.svi.edu.au/mig\\_2019\\_scrnaseq-workshop/index.html](https://scrnaseq-course.cog.sanger.ac.uk/website/index.htmlhttps://biocellgen-public.svi.edu.au/mig_2019_scrnaseq-workshop/index.html).
- Milbradt J, Kraut A, Hutterer C, Sonntag E, Schmeiser C, Ferro M, et al. Proteomic analysis of the multimeric nuclear egress complex of human cytomegalovirus. *Mol Cell Proteomics* (2014) 13(8):2132–46. doi: 10.1074/mcp.M113.035782
- Pinaud S, Portet A, Allienne JF, Belmudes L, Saint-Beat C, Arancibia N, et al. Molecular characterisation of immunological memory following homologous or

heterologous challenges in the schistosomiasis vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol* (2019) 92:238–52. doi: 10.1016/j.dci.2018.12.001

45. Lu L, Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Bu L. Genomic and transcriptional analysis of genes containing fibrinogen and IgSF domains in the schistosome vector *Biomphalaria glabrata*, with emphasis on the differential responses of snails susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) 14(10):e0008780. doi: 10.1371/journal.pntd.0008780

46. Lu L, Bu L, Zhang SM, Buddenberg SK, Loker ES. An overview of transcriptional responses of schistosome-susceptible (M line) or-resistant (BS-90) *Biomphalaria glabrata* exposed or not to *Schistosoma mansoni* infection. *Front Immunol* (2021) 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.805882

47. Portet A, Pinaud S, Chaparro C, Galinier R, Dheilily NM, Portela J, et al. Sympatric versus allopatric evolutionary contexts shape differential immune response in *Biomphalaria/Schistosoma* interaction. *PLoS pathogens* (2019) 15(3):e1007647. doi: 10.1371/journal.ppat.1007647

48. Vergote D, Bouchut A, Sautiere PE, Roger E, Galinier R, Rognon A, et al. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Int J Parasitol* (2005) 35(2):215–24. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.11.006

49. Myers J, Ittiprasert W, Raghavan N, Miller A, Knight M. Differences in cysteine protease activity in *Schistosoma mansoni*-resistant and-susceptible *Biomphalaria glabrata* and characterization of the hepatopancreas cathepsin b full-length cDNA. *J Parasitol* (2008) 94(3):659–68. doi: 10.1645/GE-1410R.1

50. Foo CX, Bartlett S, Ronacher K. Oxysterols in the immune response to bacterial and viral infections. *Cells* (2022) 11(2):201. doi: 10.3390/cells11020201

51. Whitten MM, Tew IF, Lee BL, Ratcliffe NA. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipoprotein III) in  $\beta$ -1, 3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J Immunol* (2004) 172(4):2177–85. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.2177

52. Pila EA, Gordy MA, Phillips VK, Kabore AL, Rudko SP, Hanington PC. Endogenous growth factor stimulation of hemocyte proliferation induces resistance to *Schistosoma mansoni* challenge in the snail host. *Proc Natl Acad Sci* (2016) 113(19):5305–10. doi: 10.1073/pnas.1521239113

53. Hambrook JR, Gharamah AA, Pila EA, Hussein S, Hanington PC. *Biomphalaria glabrata* granulins increase resistance to *Schistosoma mansoni* infection in several *Biomphalaria* species and induces the production of reactive oxygen species by haemocytes. *Genes* (2019) 11(1):38. doi: 10.3390/genes11010038

54. Pila EA, Tarrabain M, Kabore AL, Hanington PC. A novel toll-like receptor (TLR) influences compatibility between the gastropod *Biomphalaria glabrata*, and

the digenean trematode *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* (2016) 12(3):e1005513. doi: 10.1371/journal.ppat.1005513

55. Baeza Garcia A, Pierce RJ, Gourbal B, Werkmeister E, Colinet D, Reichhart JM, et al. Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* (2010) 6(9):e1001115. doi: 10.1371/journal.ppat.1001115

56. Sullivan JT, Pikios SS, Alonzo AQ. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* (2004) 90(1):92–6. doi: 10.1645/GE-3266

57. Barbosa L, Silva LM, Coelho PMZ, Santos SR, Fortes-Dias CL. Primary culture of the region of the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (2006) 101(6):639–43. doi: 10.1590/S0074-02762006000600010

58. Hagemann-Jensen M, Ziegenhain C, Chen P, Ramsköld D, Hendriks GJ, Larsson AJ, et al. Single-cell RNA counting at allele and isoform resolution using smart-seq3. *Nat Biotechnol* (2020) 38(6):708–14. doi: 10.1038/s41587-020-0497-0

59. Picelli S, Björklund ÅK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* (2013) 10(11):1096–8. doi: 10.1038/nmeth.2639

60. Galinier R, Portela J, Moné Y, Allienne JF, Henri H, Delbecq S, et al. Biomphalysin, a new  $\beta$  pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* (2013) 9(3):e1003216. doi: 10.1371/journal.ppat.1003216

61. Li F, Zheng Z, Li H, Fu R, Xu L, Yang F. Crayfish hemocytes develop along the granular cell lineage. *Sci Rep* (2021) 11(1):1–16. doi: 10.1038/s41598-021-92473-9

62. Huot C, Clerissi C, Gourbal B, Galinier R, Duval D, Toulza E. Schistosomiasis vector snails and their microbiota display a phyllosymbiosis pattern. *Front Microbiol* (2020) 10:3092. doi: 10.3389/fmicb.2019.03092

63. Portet A, Toulza E, Lokmer A, Huot C, Duval D, Galinier R, et al. Experimental infection of the *Biomphalaria glabrata* vector snail by *Schistosoma mansoni* parasites drives snail microbiota dysbiosis. *Microorganisms* (2021) 9(5):1084.

64. Galinier R, Tetreau G, Portet A, Pinaud S, Duval D, Gourbal B. First characterization of viruses from freshwater snails of the genus *Biomphalaria*, the intermediate host of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* (2017) 167:196–203. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.12.021





***D. Deciphering the innate memory response of Biomphalaria glabrata to Schistosoma mansoni at a single cell level.***

Rémi PICHON, Silvain PINAUD, Richard GALINIER, Benjamin GOURBAL

En préparation



## Introduction

The innate immune system of invertebrates is composed of three distinct responses which are physical barriers of the epithelium, cellular immune response and humoral immune response (Rowley & Powell, 2007). During the primary infection of an invertebrate, if the pathogen manages to pass the physical barrier, then it is recognized at the first encounter by the immune system and the cellular and humoral defense responses are coordinated to neutralize the intruder. This innate immune system was sometimes defined as non-specific and lacking memory unlike the adaptive immune system of vertebrates but for several decades now, we have realized that the invertebrates innate immune response can be stimulated following a primary infection, which results in effective protection following a second encounter with the pathogen. It was called innate immune memory (Gourbal *et al.*, 2018), and was phenotypically characterized in several organisms, like insects (Rodrigues *et al.*, 2010; Sheehan *et al.*, 2020), crustaceans (Low & Chong, 2020), nematodes (Yan *et al.*, 2020), and molluscs (Lafont *et al.*, 2020) and especially in the interaction between *B. glabrata*, a freshwater snail and its natural parasite *S. mansoni* responsible for the Bilharziasis where mechanisms begin to be more precisely described (Castillo *et al.*, 2020).

Schistosomiasis remains today the second human parasitic disease after Malaria, in terms of morbidity and mortality in endemic areas (Verjee, 2019), mainly South-America and sub-Saharan Africa. Schistosomiasis disease is caused by a flatworm of the genus *Schistosoma* which uses among others the gastropod *Biomphalaria* as an obligatory intermediate host to complete its life cycle (Théron *et al.*, 1997). Thus, the comprehension of the immunological interactions between *B. glabrata* and *S. mansoni* would help in developing new strategies to fight or control this disease. Many studies to date have focused on this innate immune system response to the parasite (Castillo *et al.*, 2020) but also in the characterization of phenotypic and molecular mechanisms of innate immune memory acquisition in *B. glabrata* in response to *S. mansoni* (Portela *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2016, 2019; Melillo *et al.*, 2018).

First, it was shown that the mollusc *B. glabrata*, was able to acquire an effective protection against a second infestation by the parasite *S. mansoni* (Sire *et al.*, 1998). In the sympatric interaction between *B. glabrata* and *S. mansoni*, that during a primary infestation the parasites mostly manage to develop into the host tissues. But when re-infestation is conducted on the same mollusc with parasites genetically close to those used during the primary infestation, then the mollusc acquires total protection against re-infestation (Portela *et al.*, 2013). This protection then takes between 7 and 10 days to be acquired by the snail (Sire *et al.*, 1998) and

passes from a mainly cellular response following the primo infestation, to an exclusively humoral response very early after the challenge. During the primary response, certain parasites do not manage to pass the defenses of the host and are encapsulated by the hemocytes, the immune cells in *B. glabrata*. After challenge, the humoral response kills all incoming parasites without any physical contact between parasite and hemocytes (Pinaud *et al.*, 2016). This shift from cellular to humoral response following a challenge is also accompanied by a molecular shift involving new immune effectors thus characterizing the memory response of the innate immune system of *B. glabrata* (Coustau *et al.*, 2016; Pinaud *et al.*, 2016).

Even if hemocytes do not participate directly at the site of infestation to kill the parasite during the challenge, a recent study (Pichon *et al.*, 2023) shows the key role played by these cells as the support of IIM and in the challenge response. A huge immune shift response can be observed in these cells similarly to the one observed in the whole snail (Pinaud *et al.*, 2016).

At least five subpopulations of hemocytes have been described to date in *B. glabrata*, based on morphological characteristics and have been grouped into 3 major populations (Cavalcanti *et al.*, 2012). (i) The granulocytes which are cells capable of adhering to the substrate by forming filopodia and pseudopodia and full of intracytoplasmic granules with lysosomal functions. (ii) The hyalinocytes, described as cells with a high capacity of adhesion to the substrate and lacking granulations. (iii) The blast-like cells, small cells (< 5  $\mu\text{m}$ ), without granulation, with a round profile and with a very low capacity of adhesion to the substrate and characterized by a high nuclear cytoplasmic ratio. During these different infestations and reinfestations, no changes in cell proportion could be observed for these different morphological populations of hemocytes (Pichon *et al.*, 2023). Consequently, the innate immune memory response for hemocytes must be characterized only at the transcriptomic level without being reflected at the morphological level.

Newer single cell sequencing technologies (scRNA sequencing) have defined a greater functional diversity and plasticity of hemocytes and revealed that at least 7 different transcriptomic populations could be described in *B. glabrata* (Pichon *et al.*, 2022). However, this scRNA seq technology has never been used to characterize the response of hemocyte populations or subpopulations against *Schistosoma mansoni* infestation following a primary infestation or in the context of IIM. Therefore, in this study, we performed a scRNAseq approach on snail hemocytes over a kinetic of infestation of *B. glabrata* snails by *S. mansoni*, following primary infestation and secondary challenge in an IIM acquisition context. This approach will help in identifying hemocytes cell populations mainly involved in the support of

IIM, and also characterized the transcriptomic response of these cells during IIM acquisition. Such an approach may give us new clues to understand how IIM is recorded, stored and reactivated efficiently when subsequent infection occurs in *Biomphalaria* snails.

## **Materials and methods**

### **Biological sample experiments**

We used a *Biomphalaria glabrata* strain originated from Recife locality in Brazil (BgBRE2), recovered in 1975 and maintained since then under constant laboratory conditions. Snails were maintained at 26 °C in glass aquaria and fed with green leaf lettuce ad libitum. The parasite used for these experiments is the sympatric strain *Schistosoma mansoni* (SmBRE) whose prevalence reach 100% following primary infestation when infected with 10 miracidia of *S. mansoni* SmBRE. (Théron *et al.*, 1997; Portela *et al.*, 2013). The immune memory phenotype is also complete and so a prevalence of 0% was observed following a second encounter with the pathogen (Pinaud *et al.*, 2016), total protection to re-infection.

### **Innate immune memory experiment protocols and hemocytes preparation for droplet scRNA sequencing**

In order to recover hemocytes from all kinetic points at the same time, we performed several backward infestations (Figure 1). 100 BgBRE snails were primo infested with 10 miracidia of SmBRE each at time T= 0 days. Half of these molluscs were challenged with 10 miracidia of SmBRE each at T = 15 days later and the hemolymph were collected 24h later, these molluscs correspond to sample HC1 (Challenge 1 day). The other half mollusks were kept and infested one day after (T = 1 day) and collected hemolymph at T = 16 days, this corresponds to sample HP15 (Primo infection 15 days). At time T = 15 days, 50 other molluscs were primo infested, and the hemolymph were collected 24h later and corresponds to sample HP1 (Primo infested 1 day). The naive samples were processed in the same way and are from the analysis in Pichon *et al.*, 2022. Pooled hemolymph (500µl) from 50 snails were recovered into 2ml tubes. These hemolymphs were mixed with 1.5ml of modified anticoagulant solution (98mM NaOH, 186mM NaCl, 1.7mM EDTA, 1.7mM citric acid) (Severo *et al.*, 2018). The samples were then all treated in the same way, as already described (Pichon *et al.*, 2022). Sample was passed through a 30µm pre-separation filter (Miltenyi Biotec) to eliminate cell aggregates and obtain

a suspension of individualized cells. Then hemocytes concentration was estimated using a Malassez chamber and cell viability was measured with trypan blue exclusion technique. Samples were then spin-down (2700g, 5min, 4°C) to pellet the hemocytes and re-suspended in 50µl of anticoagulant solution (30% of BGE medium (Hansen, 1976) and 70% anticoagulant modified solution) in order to obtain a concentration of 1000 cells per microliter. Samples were then processed by MGX platform (IGH Montpellier, France) for scRNA droplet isolation (Chromium, 10X genomics) and RNA sequencing.

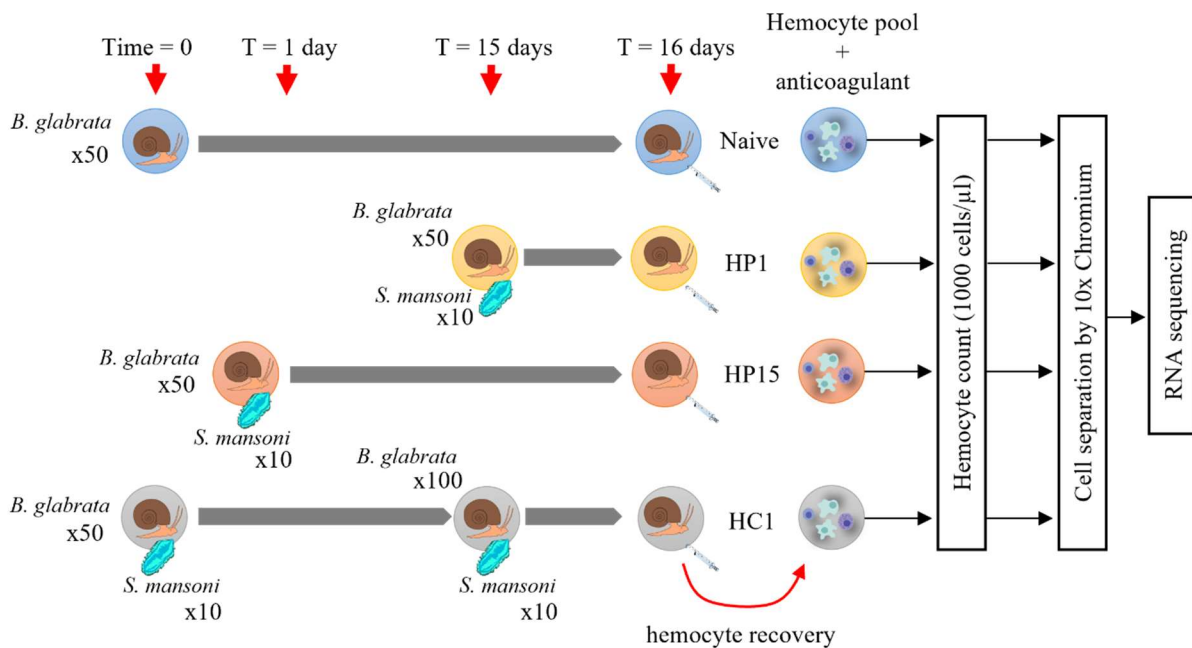


Figure 1: Schematic representation of the experimental protocol for the kinetics of infestation and reinfestation of *B. glabrata* by *S. mansoni* and hemocytes recovery for the chromium cell sorting and mRNA sequencing steps.

## Single-cell RNA sequencing and data processing

Single cell processing has been done according to the procedures of the MGX platform (Montpellier GenomiX). Briefly, single cell suspension was obtained by a Chromium Single-Cell Controller (10X Genomics). Library preparation was performed with Single Cell 3' Reagent kits V3.1 (10X Genomics) using 10x Next GEM Technology barcode and validated by DNA quantification with Fragment Analyzer (kit High Sensitivity NGS) and qPCR (ROCHE LightCycler 480). Libraries were sequenced with an Illumina NovaSeq 6000 (Illumina) and SBS (Sequence By Synthesis) techniques using NovaSeq Reagent kits (100 cycles). Output results and matrix generation were processed with 10X Genomics Cell ranger v3.1.0 software (<http://10xgenomics.com>).

All available mitochondrial gene sequences were recovered from the NCBI database (Wheeler *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018) and gene names corresponding to these sequences were retrieved using blastn (Altschul *et al.*, 1990) on the *Biomphalaria glabrata* genome annotation version 1.6 available on Vector Base website ([https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/TMPTX\\_bglaBB02](https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/dataset/TMPTX_bglaBB02), 15/10/2021) (Giraldo-Calderón *et al.*, 2015). The recovery of mitochondrial genes will allow to define and remove from the analysis the cells containing a too high level of expression of these genes, which is indicative of dying cells.

### **Cell clustering and gene expression**

Filtered matrix sorted by Cell Ranger (10X Genomics Cell Ranger 3.1.0) was used and analyzed on R (Version 4.1.0 (2021-05-18)) using Seurat package (Version 4.0.4, (Hao *et al.*, 2021)). Hemocytes with more than 50 unique expressed genes were kept and genes expressed in 3 or more cells were retained for the generation of the gene-cell data matrix and downstream analysis. Low quality cells were filtered out excluding cells with less than 750, 1000, 900 and 750 unique expressed genes for naïve, HP1, P15 and HC1 respectively or more than 3100 (naïve condition) and 3500 (all other conditions) unique expressed genes were excluded from the analysis as well as cells with a proportion of mitochondrial transcript higher than 5%. Log-normalized method given by the Seurat package was used to normalize the data and all the cells from all the samples were merged. Thereafter, 2,000 highly variable genes between cells were obtained using FindVariableFeatures function, these genes were scaled and used to perform Principal Component Analysis (PCA). JackStrawPlot and ElbowPlot functions were used to determine the top principal component that is most representative of the data set for each reduction. The dataset clustering was conducted by the FindClusters function according to identified PCs. Visualization in two dimensions of the clustering was made through the use of non-linear dimensional reduction, UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for dimension reduction).

We used Seurat (FindAllMarkers option using wilcoxon rank sum test for each cluster) to determine differentially expressed genes and gene markers for each cluster ( $\text{Log}_2\text{FC} > 0.25$  and  $\text{min.pct} > 0.25$ ) and created a heatmap to represent the top n marker genes defining each cluster. Cluster-specific marker genes were determined by selecting shared characteristics as being differentially overexpressed with  $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ , expressed by a majority of cells (>80%)



within the cluster and a minority of cells (<10%) in other clusters. Marker genes with  $\log_2FC > 0.5$  and express in at least 50% of the cells, were used to perform a GO enrichment analysis (fisher exact test, P-value > 0.01) using Blast2GO omicsbox (Götz *et al.*, 2008) on *Biomphalaria glabrata* reference genome V1.6. Enriched gene sets were exported to REVIGO (Supek *et al.*, 2011) to reduce redundant GO terms using the default parameters. The comparison between the clusters of the different times of the kinetics was done thanks to the FindMarkers function to recover differentially expressed genes ( $\log_2FC > 0.5$ ), all these genes were used to perform a GO enrichment analysis following the same procedure as described above.

### **Cell lineage and comparisons with hemocytes from naïve mollusks**

The Scmap package (Kiselev *et al.*, 2018) was used to compare the data obtained in the infestation and reinfestation kinetics time set (naive, HP1, HP15, and HC1), with previously published data from the naive condition (Pichon *et al.*, 2022). The purpose of this tool is to determine the presence or absence of new transcriptomic clusters when the data set is aggregated.

The cell lineage analysis was performed with bioinformatic tools Monocle3 (Cao *et al.*, 2019) and slingshot (Street *et al.*, 2018) on the data processed by the Seurat package mentioned above after conversion to SingleCellExperiment object. Cell lineage allows to highlight the links between transcriptional clusters and to deduce the differentiation patterns of these clusters by following the expression changes of some key genes between the cells in the analysis.

## **Results**

### **In silico analysis and clusters identification by scRNA-seq in *B. glabrata* hemocytes in a kinetic of primary infection and secondary challenge: acquisition of IIM.**

For each time point of the kinetic of IIM acquisition, approximately 3000 cells were captured by 10X Genomics Chromium microfluidic technology and RNA sequenced by miseq. The data obtained after sequencing were aligned to the *B. glabrata* genome (between 85.2% and 90.1% of reads mapped to the genome) and processed by the standard CellRanger pipeline (10x Genomics Cell Ranger 3.1.0), allowing us to obtain 2624, 4851, 3827, and 3956 cells for naive, HP1, HP15, and HC1 samples, respectively (Annexes Table 1). After removing from the

analysis poor quality cells containing either too little RNA detected (possibly droplets containing no cells but free RNA) or too much RNA detected (possibly cell doublets in the same droplet) and removing cells containing too much mitochondrial genes (>5%), we obtain 2193, 4439, 3191 and 3013 cells for the naive, HP1, HP15 and HC1 samples respectively. These high-quality cells were used for the rest of the analyses using Seurat software (Version 4.0.4). Data integration was not performed due to the low batch effect observed on the merged data, represented by a PCA reduction (Figure 2A), compared to the data corrected by the Mutual Nearest Neighbors (MNN) method (Figure 2B). Therefore, the merged data were kept for the analyses. The data were merged, and 7 transcriptomic clusters were identified (Figure 3A).

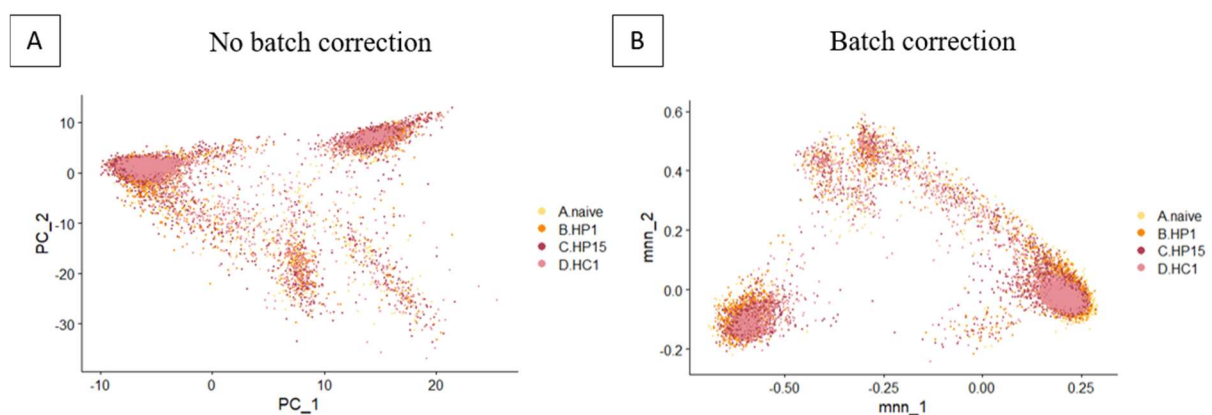


Figure 2: Principal component projection of the aggregate data set before batch correction (A) and after batch correction by Mutual Nearest Neighbor algorithm (MNN) (B).

Of the 12,836 cells analyzed, the majority of them are shared between cluster 0 (59.8%) and cluster 1 (21.3%). All other clusters represent only 18.9% of the cells in the analysis (Figure 5A). Among the latter, the cells that make up cluster 3 are found in the analysis mainly in condition HP15 (Figure 3C et D) and represent 5.4% of the total cells in the complete kinetics. The analysis of these 7 transcriptomic clusters was based on the identification, in a first step, of specific markers of each of these clusters on the whole data set of the 4 kinetic times. Figure 5B shows that all these clusters are supported by a very specific list of marker genes, only cluster 0 (grouping the majority of cells) seems to share some of its marker genes with clusters 2 and 3. Cluster 3 is special because it is mainly represented for the HP15 condition (Figure 3C) and very close in terms of gene expression to cluster 0, however, the cluster still has its own marker genes that are not found in the other clusters of the analysis (Figure 3E) suggesting a specialization of this group of cells.

## Cluster analysis and comparison between each time of IIM acquisition kinetics

Of the 7 clusters defined in this analysis, clusters 0, 1 and 3 appear to be the most dynamic cell clusters in this kinetics of infestation and reinfestation of *B. glabrata* by *S. mansoni*. In terms of cell number proportion per cluster and per samples (Figure 3D), cluster 0 represents 75% of all cells in the naive sample. Analysis of the marker genes in this transcriptomic cluster, independent of the kinetic times, reveals cells with active metabolism, with functions related generally to ATP production but also directed towards some particular metabolic pathways such as the pentose phosphate pathway and the TCA cycle (through an enrichment of functions related to pyruvate metabolism). The marker genes of this cluster belong also to diverse families of PRRs (pathogen recognition receptors) (BgA2M, BgC3-1, toll receptors, FREP3, etc.) and therefore, the cells that compose this cluster, are probably able to respond to a large variety of stimuli.

This last point could explain the decreases, in terms of proportion of cells in this cluster along the kinetic of infection. Indeed, this cluster could be a reservoir of cells waiting for a stimulus to differentiate and thus come to enlarge some other clusters. Cluster 0 represents 67% of cells at 1-day post-infestation, 42% at 15 days and 55% after challenge (Figure 3D). The majority of the functions carried by the genes found differentially regulated in cluster 0 between the naive and HP1 conditions are involved in communication, cell signaling, but also cell adhesion and locomotion. Some functions are involved in the regulation of phagocytosis as well as the regulation of cytokine production involved in the inflammatory response. At 15 days, we also find some functions related to the regulation of locomotion/migration, but the majority of the functions are related to a defense response, stress response and energy production through the regulation of metabolic proteins and the modification of certain pathways such as the electron transport chain. The HC1 time is defined by the same functions as for the HP15 time.

The significant decrease in the proportion of cells from Cluster 0 at HP15 may potentially be due to the increase in proportion of the Cluster 3. This cluster is detected in all other conditions at very low levels and is formed by only 14, 1 and 2 cells respectively for the naive, HP1 and HC1 conditions whereas it is represented by 676 cells (21.2%) in the HP15 condition (Figure 3D). The absence of Cluster 3 except for the HP15 sample prevents us from performing any differential expression analyses between the experimental conditions. However, cluster 3 shares some of the marker genes of cluster 0 but has very specific marker genes (Figure 3E). The annotation of these genes does not allow us to have a precise enrichment of the genes expressed for this cluster, so no precise idea of the enriched GO function of these

cells could be proposed. However, the direct analysis of the genes allowed us to highlight particular PRR genes such as FREP4 strongly expressed in more than half of the cells of this cluster, or macrophage mannose receptor and Toll-like receptor 4. We also found 3 complement-like factors TEP, BgA2M and BgC3-1 already highly expressed in cluster 0 but also the TEP BgC3-3, not found in the other clusters and strongly expressed in cluster 3 by more than half of the cells of the cluster. The gene found most strongly expressed in almost all cells of this cluster codes for arginase 1, involved in the metabolism of arginine and nitric oxide, but above all, arginase 1 is considered a cellular marker of M2 macrophage differentiation (Yang & Ming, 2014; Jablonski *et al.*, 2015). Finally, Cluster 3 seems to regroup cells involved in differentiation processes and especially sensitive to the infestations and the presence of the parasite in snail tissue.

Cluster 1 is also strongly impacted during this kinetic. It represents 9.2% of the cells in the naive condition and increases to nearly 24% of the total cells in each of the other conditions of the kinetics (Figure 3D). The marker genes define this cluster code for functions related to metabolism and mRNA production but especially functions related to phagocytosis, cytokine response and thus more generally to the regulation of the immune response. Among the marker genes, we can find one's coding for several TEP superfamily members (BgC3-1, BgA2M) also present in cluster 0, and genes related to chromatin remodeling. Some cathepsins (L1, F) are also found strongly expressed in the majority of cells of cluster 1. These proteases play important roles in innate immunity, notably in apoptosis processes or in TLR (Toll Like Receptor) signalling pathway (Conus, 2010).

The most differentially expressed genes in this cluster ( $\log_2FC > 5$ ) and expressed by almost all cells (>90%) are glutathione S transferases-like involved in detoxification of oxidative stress, and a gene encoding a 97-like transmembrane protein. This last protein is associated with human cancers. At 1 day post primo infestation, actin and cytoskeleton reorganization functions are enriched in cluster 1 cells. Whereas 15 days post primo infestation as well as 1 day post challenge, we find, in addition to functions related to the reorganization of the actin and the cytoskeleton, a majority of functions directly related to immunity, the regulation of immune processes or the production of cytokines.

Cluster 2 represents 7% of the hemocytes in the naive sample (Figure 3D) and has a slight decrease in samples HP1 and HP15, respectively at 4% and 5.7%. Finally, it is found in higher proportion for HC1 by exceeding 10.5% of the total hemocytes. The functions that most define this cluster are related to the regulation of necrotic cell death, but several functions are

related to immunity, cytokine production and immune-signaling pathways (ERBB, NF-kappaB, JNK cascade, etc.). The study of marker genes shows that this cluster is an active cluster of the response to pathogens, by the over-regulation in a majority of the hemocytes in this cluster of genes involved either in the recognition of pathogens (e.g., peptidoglycan-recognition SC2-like), or in their elimination (antimicrobial peptides, cathepsin (L1, B), macrophage-expressed gene 1). Surprisingly, the genes mentioned above are rather downregulated when comparing cluster 2 between the two samples Naïve and HP1. The functions affected following primary infestation seem to be related to the immune response of hemocytes, energy production (PPP) and reorganization of actin and the cytoskeleton. These functions are preserved 15 days after primary infestation and do not seem to change even after the challenge, so this cluster remains relatively stable once primary infestation has occurred.

The last clusters (4, 5, and 6) represent altogether only 7% of all hemocytes in the experimental infestation kinetics (Figure 3D). Cluster 4 represents only 3% of the cells and unfortunately too few marker genes are identified to permit a meaningful enrichment analysis. The marker genes in this cluster appear to be involved in ribosomal functions, but also in cytoplasmic translational activity. In response to infestations, this cluster responds by producing heat shock protein 90, antimicrobial peptides and by increasing transcription factors. But also, by the under regulation of several ribosomal subunits and the oxidative phosphorylation pathway.

Cluster 5 represents 3% of the cells in the assay (Figure 3D) and the number of these cells varies very little during the infestation kinetics. The marker genes of this cluster code for functions mainly related to the lysosome, vacuolization, and lytic vacuole production. For this cluster, it is difficult to highlight functions enriched by genes differentially regulated between conditions. However, the genes that define this cluster have a very strong differential expression with the other cells in the analysis and these genes are very specific to this particular cluster. A high proportion of genes are not annotated for this cluster but among those that are, we find, among the most differentially expressed genes, 5 cathepsins ( $\log_2FC > 3$ ) probably related to vacuolization functions and again allowing to assume that these cells are very active immunologically. However, it is difficult to make a direct link with *S. mansoni* infestations because this cluster also reacts very little in terms of gene expression at different times of the kinetics and it is therefore difficult to highlight particular functions for each time of the kinetics.

Cluster 6 is a very small group of cells representing 1% of the overall analysis and tends to be totally impossible to detect for some points of the kinetic, for example 0.18% or 8 cells

were detected for sample HP1 (Figure 3D). This cluster 6 is characterized by very specific marker genes and with a significant differential expression compared to the hemocytes of the other clusters, however, solely few marker genes belonging to this cluster are annotated in the *B. glabrata* genome, so it is quite impossible to highlight enriched functions. Among these genes, we find a gene coding for a TEP (BgTEP2) or for hexokinase 2 showing that metabolism related to glycolysis seems activated for these hemocyte cells. This cluster does not respond to primary infestation but seems to respond more strongly from 15 days after primary infestation and after challenge, with genes encoding antimicrobial peptides or genes encoding metabolic functions related to the respiratory electron transport chain or the regulation of lipoproteins.

Interestingly, the set of clusters defined during this infestation and reinfestation kinetics correspond to clusters described recently in the characterization of hemocytes of naïve *B. glabrata* snails (Pichon *et al.*, 2022). We find very few cells defined as unassigned when comparing the set of hemocytes in the kinetics of infection (and the associated clusters) to the previously published data (Figure 3F). Thus, we do not have in the analyses, regrouping the complete kinetics, the appearance of new cells that are transcriptionally very different compared to previously published data upon naïve cells. Based on the enriched functions and the marker genes that compose these clusters, we can assign the different clusters of this analysis (complete kinetic) to the potential functions already defined for these transcriptomic clusters: cluster 0 corresponds to latent hemocytes, cluster 1 to phagocytic hemocytes, cluster 2 to activated killer hemocytes, cluster 4 to viral activated hemocytes, cluster 5 to sterol responsive stimulated hemocytes and cluster 6 to bacterial stress responding hemocytes (Figure 3G). Cluster 3 does not appear alone in the literature but is included in the cells grouped as latent hemocytes, this cluster can be defined as a group of cells responding to an infestation by *S. mansoni*.

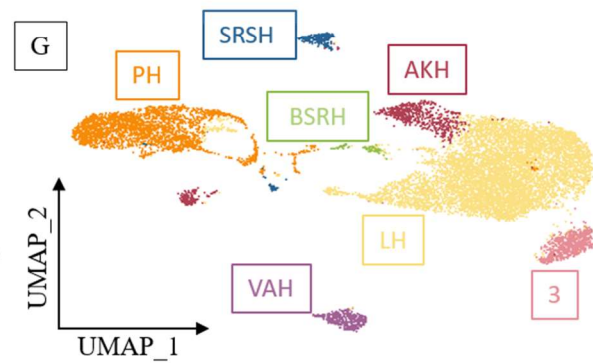
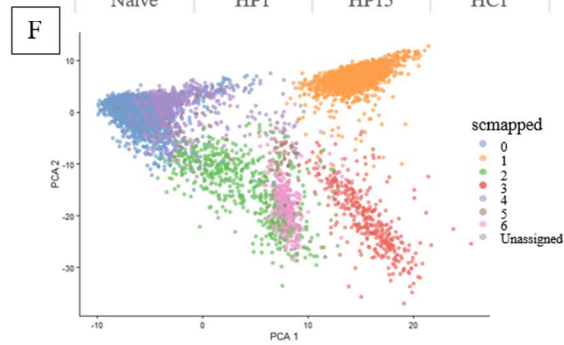
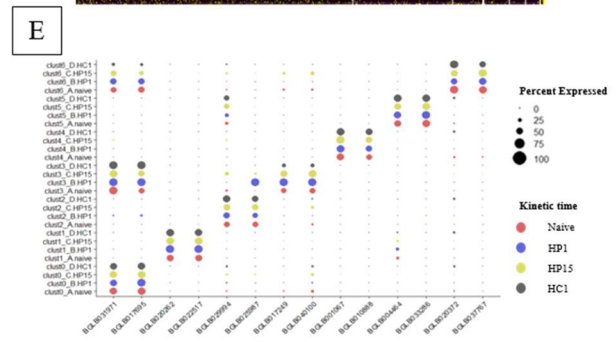
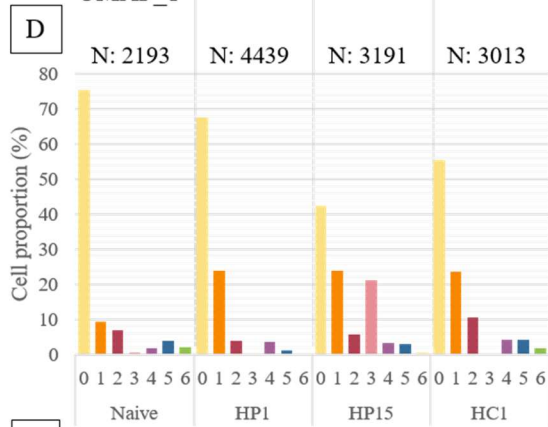
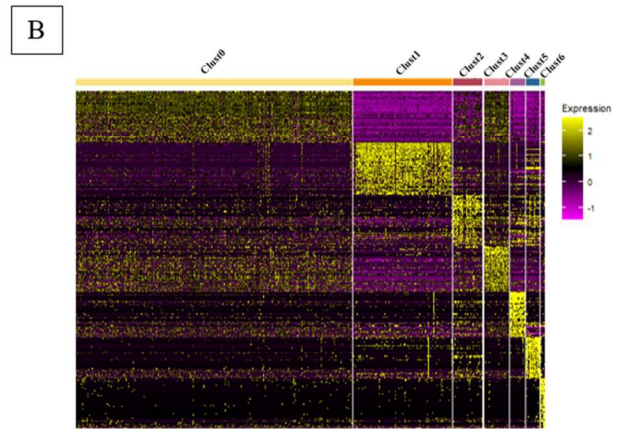
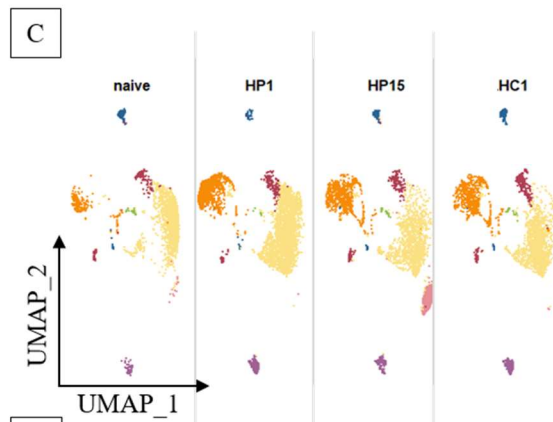
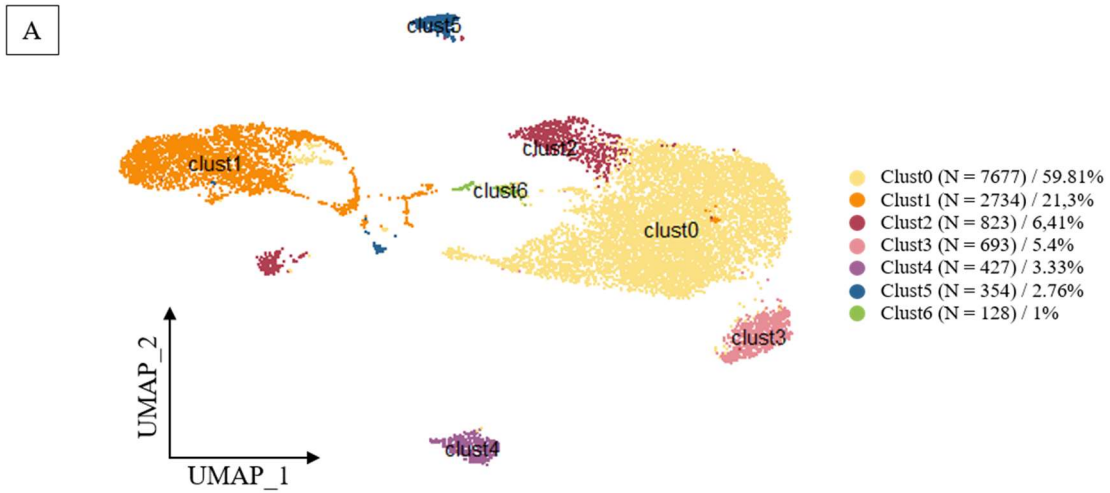


Figure 3: (A) Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction (UMAP) plot of the 7 transcriptomic clusters identified in *B. glabrata* hemocytes by scRNA-seq and their respective cell count number present in each transcriptomic cluster. (B) Heatmap representing the differential expression of the top 50 marker genes defined for each of the 7 transcriptomic clusters. (C) UMAP projection of the 7 transcriptomic clusters for each of the infestation and reinfestation kinetics time points. (D) Bar graph showing the proportions of cells present in each of the transcriptomic clusters at the different kinetic time points independently of each other. (E) Dotplot representing the percentage of cells expressing 2 genes defined as markers for each transcriptomic cluster for each of the different times of the kinetics. (F) scMapped projection and comparison of cells from the complete kinetic analysis and the transcriptomic clusters defined in the literature (Pichon et al., 2022). (G) UMAP projection of the kinetic analysis and corresponding cluster names from the literature. LT: Latent hemocytes; PH: Phagocytic hemocytes; AKH: Activated killer hemocytes; VAH: Viral activated hemocytes; SRSH: Sterol responsive stimulated hemocytes; BSRH: Bacterial stress responding hemocytes.

### ***Cell lineage analysis and immune memory expression pattern***

Cell lineage analyses on the kinetic dataset were conclusive and revealed the likely presence of two different cell lineages in *B. glabrata* hemocytes (Figure 4). We still do not have cell markers to define the progenitor cells of the hemocytes but from these analyses, it would appear that cluster 0 is the starting point of all other clusters (Figure 4A). The first cell lineage is mainly carried by the hemocytes of cluster 1 and the second cell lineage by the hemocytes of cluster 4 (Figure 4B). The establishment of the cell lineage leading to cluster 1 is carried by genes with immune potential such as cathepsins (B-like and L1-like) for example. These genes are found in some cells of cluster 2 and 5 and then strongly expressed in cluster 1 as we can see from the example of the expression of cathepsin B-like in Figure 4C and D. The links between cluster 0 and 4 seem to be more complex to set up, few cells of cluster 0 seem to express the genes of cluster 4, which seems to express very specific genes (Figure 3B). Finally, a large proportion of the genes that define this cell lineage are genes coding for various ribosomal subunits and also coding for genes involved in the mitochondrial respiratory chain.

Along these cell lineages, it turns out that we are not able to precisely define the transcriptomic clusters responding to the transcriptomic shift or recalled type response defined in the total hemocytes analysis (Pichon *et al.*, 2023). However, the average expression of all genes defined as specific to the primary infestation by the global RNAseq analysis show that this immune response is probably carried by clusters 0, 3 and 6 based on the uMAP representation of the gene expression distribution among the analysis (Figure 4E). The violin plot shows that the average expression of all these genes involved in primo response have a higher expression pattern than the other clusters (Figure 4E). The genes defined as specific to the sustained response are predominantly carried by clusters 0, 2 and 3 but also some cells from



the cluster 6 seem to respond too (uMAP representation) (Figure 4F). The average expression determined by the violin plot, confirms higher expression of these genes specifically in cluster 2 and 3 (Figure 4F).

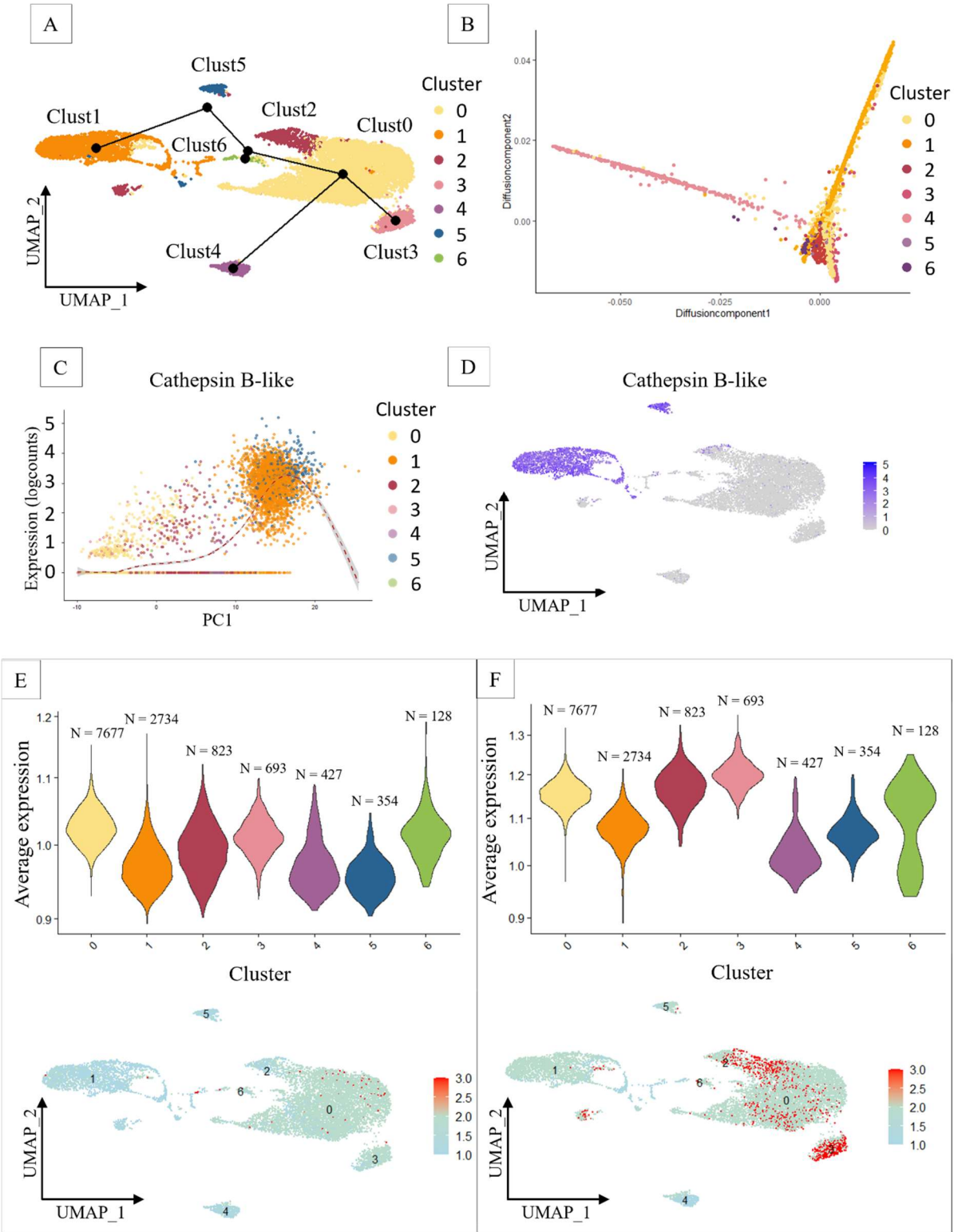


Figure 4: (A) Slingshot trajectory graph represented by predicted lineage (black features) connecting the different transcriptomic clusters on the UMAP representation. (B) Predicted lineage trajectory using diffusion map pre-processing. (C) Expression of the cathepsin B-like (BGLB013804) along the pseudo time. (D) Representation of cathepsin B-like (BGLB013804) expression by the different cells on the UMAP representation of the transcriptomic clusters. (E) Violin plot and UMAP representation of the average expression of a set of primo specific immune response marker genes from literature. (F) Violin plot and UMAP representation of average expression of set of sustain immune response marker genes from literature.

## Discussion

This study analyzes for the first time in an invertebrate, *B. glabrata*, the response of hemocytes in the acquisition of innate immune memory against the *S. mansoni* parasite, using a single cell RNA sequencing approach. This work is in continuity with the research conducted by our team on the characterization of the mechanisms of innate immune memory (IIM) acquisition in *B. glabrata* hemocytes in response to *S. mansoni* (Pichon *et al.*, 2023). However, this study was conducted on hemocyte pool, not considering the full diversity of hemocyte populations and the likely response of each to *S. mansoni* infestations.

In this new scRNA sequencing we study by looking not only at hemocytes from naive individuals but also the response of each transcriptomic population to *S. mansoni* infestation and reinfestation. The infestation kinetics including a naive time (hemocytes coming from mollusks that have not encountered the parasite) and three post-infestation times (HP1 and HP15) and reinfestation (HC1) allowed us to obtain an important cell number, i.e. 12,836 cells, that can be analyzed (Figure 3D), which of course allows us to have a better depth of analysis and thus a better definition of the likely transcriptomic clusters present in *B. glabrata*. Thus, we can define 7 transcriptomic clusters in this analysis (Figure 3A). Six out of 7 clusters were similar to the one characterized in our previous study conducted on hemocytes of naive *B. glabrata* snails (Pichon *et al.*, 2022) (Figure 3G). The cells that formed the dividing hemocytes cluster in the study of naive hemocytes alone are no longer found in the complete analysis as a well-defined cluster, but the cells are distributed in the other clusters of the analysis. A new cluster could be characterized, cluster 3, defined as a cluster undergoing differentiation induced by the presence of the parasite in the mollusks (Figure 3A and B).

The large number of cells brought to this analysis also allows us to find hypothetical cell lineages. By these new analyses, we can link the PH and VAH clusters to all other clusters (Figure 4A). We thus provide new evidence that the different populations of hemocytes are more the result of hemocyte plasticity rather than the expression of several separate cell lineages. Cluster 0 appears as the starting point of two lineages (Figure 4B), leading to the

clusters that appear to be the most differentiated in this analysis (clusters 1 (PH) and 4 (VAH)). Cluster 3 is peculiar in this analysis, its low representation in the naive, HP1 and HC1 times of the infestation kinetics suggests that these cells take some time to accumulate in the host and are then "consumed" during the challenge. The hemocytes that make up this cluster may die after performing their functions during the challenge (Ashida *et al.*, 2011), including degranulating large amounts of humoral factors, which are known to be responsible for the death of the parasite after challenge (Pinaud *et al.*, 2016). The organism then needs some time to reproduce these cells while waiting for a new encounter with the pathogen. Only the addition of several intermediate kinetic times between the HP1 and HP15 times but also after challenge could shed light on the appearance and establishment of this hemocyte cluster following the various infestations.

The tendency for clusters 1 and 2 to increase in cell proportion at different kinetic times compared to the naive sample also suggests a response of these transcriptomic clusters to the various infestations (Figure 3C and D). The fact that cluster 0 has a tendency to lose cells in each of the kinetic times reinforces the fact that this cluster could be the source of all the others. Regarding clusters 4, 5 and 6, given the too low number of cells, it is risky to draw conclusions about their overall proportion dynamics during the kinetics. Finally, it is quite surprising, to observe in scRNAseq variations in cell proportions between the conditions of this kinetic given that morphologically, the 3 hemocyte populations do not vary according to *S. mansoni* infestations, only the overall hemocyte proportion increases in response to the infestations (Pichon *et al.*, 2023). This implies that definitively transcriptomic and morphologic cell populations do not correlate.

Thus, in *B. glabrata* we have an increase in the number of hemocytes and an increase in the expression of certain immune genes in these hemocytes, but this does not translate into morphological population changes. These results seem to be in agreement with the literature that highlights the importance of hemocyte abundance and the expression level of certain transcripts as markers of resistance to *S. mansoni* (Larson *et al.*, 2014; Emmanuel A. Pila, Gordy, *et al.*, 2016). This is a rather atypical response in invertebrates as studies on mosquito (Rodrigues *et al.*, 2010), bivalves (De la Ballina *et al.*, 2022), or even some mollusks such as *Oncomelania hupensis* in response to *S. japonicum* (Zhang *et al.*, 2021) among others, show variations in the abundance of certain hemocyte populations in response to various infestations. However, a study counteracts these assertions (De Melo *et al.*, 2020) by showing an increase in the number of granulocytes in response to sensitization of molluscs by the parasite. This

parameter should therefore be further investigated by more precise approaches to characterize morphological populations during IIM acquisition kinetics, using transmission electron microscopy in particular (Cavalcanti *et al.*, 2012).

From the point of view of gene expression, all transcriptomic clusters seem to respond to the primo infestation as well as to the secondary challenge. Among the most promising clusters in their ability to respond specifically to *S. mansoni* infestations we can highlight the clusters 2 and 3. Cluster 2 appears to respond immediately after primo infestation. The enriched functions show the activation of immune response as well as probable reorganizations of the cytoskeleton suggesting some cell activation and the probable preparation of these cells to the encapsulation functions defined as the major response of primary infestation (Portela *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2016).

Among the genes that respond to this infestation, we find a toll-like receptor gene known to be important in the response to the *S. mansoni* parasite. These PRRs have been shown to be associated with granulocytes from *S. mansoni* resistant strains (Pila *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2021). Cluster 3 is strongly represented only 15 days after the primo infestation but, more importantly, the cells that compose this cluster express very specific genes. Thus, we find expressed in this cluster complement-like genes such as a TEP (Thioester Containing Protein) BgC3-3 (Duval *et al.*, 2020) found strongly and constitutively expressed in resistant molluscs (Marquez *et al.*, 2022). Complement factors have been shown to play a major role in metazoans in general and in the humoral immune response of invertebrates (Ashida *et al.*, 2011). Moreover, in the amphioxus *Branchiostoma belcheri*, genes coding for three complement factors (C3, C6 and Bf) are found over-regulated in an immune memory context in response to several pathogens (bacteria) (Wang *et al.*, 2009).

FREP4 (fibrinogen related proteins) is also found strongly differentially expressed by more than half of the cells in this cluster 3. FREPs are considered as PRRs and have been extensively studied in compatibility polymorphism and matching phenotypes in the interaction between *S. mansoni* and *B. glabrata*. Indeed, FREP4 has been shown to be able to recognize several pathogens such as the trematode *Echinostoma paraensei* but also a strong expression in response to *S. mansoni* at the sporocyst stage (Zhang, Zeng, *et al.*, 2008; Hanington, Lun, *et al.*, 2010). Finally, a gene encoding arginase 1 is found to be one of the marker genes of this cluster due to its expression in all cluster 3 cells. The overexpression of this gene is quite surprising because its probable immune function is still poorly known in *B. glabrata* and often attributed to an action of the parasite to prevent the production of nitric oxide (NO) compounds by the

hemocytes to destroy the parasite. Yet arginase 1 is regularly found highly upregulated in hemocytes from resistant mollusks and forming a capsule around the parasites to kill them (Zhang *et al.*, 2016). But also generally it is found in resistant and susceptible mollusks in both proteomic and transcriptomic studies (Larson *et al.*, 2014; Dinguirard *et al.*, 2018). The most interesting thing about the definition of this cluster by the expression of arginase I, is that this molecule, as we have seen previously, is also a marker in vertebrates of macrophage activation in contexts of trained immunity (Yang & Ming, 2014; Jablonski *et al.*, 2015). So, we suppose that this cluster 3 could be a cluster of cells with a memory immunity expression pattern.

When we now look at the expression of genes in each of the clusters according to the different immune memory response expression patterns in *B. glabrata* (Coustau *et al.*, 2016; Pinaud *et al.*, 2016), we realize that genes with sustaining expression behavior (defined in the global RNA seq analyses) are carried by cells in clusters 0, 2, and 3 in our analysis (Figure 4F). The lack of intermediate points between each of the samples probably prevents the detection of other memory immunity response patterns such as the transcriptomic shift detected after challenge in the global RNA sequencing analyses (Pichon *et al.*, 2023). Indeed, in the past analyses, the massive response of hemocytes is mainly around 12 hours after the second infestation. It is at this time that hemocytes respond by overexpressing thousands of genes specific to these times, and thus such a response should be characterized by the appearance in scRNA seq of one or more new transcriptomic populations. But we may have missed this moment in our analysis. Unless this massive response is produced by all the hemocytes at the same time and quickly returns to a basal state of expression identical to the other points.

These analyses reinforce, at the end, that clusters 2 and 3 are activated clusters following primary infestation with *S. mansoni* and would probably play a role in the memory immune response of hemocytes. Knowing, moreover, that the preparation of the cells, their training (in reference to the trained immunity of vertebrates) is done almost exclusively before the second infestation and therefore the cells of these clusters could have acquired an immune memory which was expressed in the first hours following the second infestation.

Finally, three major hemocyte populations have been described to date, hyalinocytes, granulocytes and blast-like cells based mainly on morphological characters observed under microscopy (Cavalcanti *et al.*, 2012; Prokhorova *et al.*, 2018). However, the first single cell RNA sequencing study on hemocytes has proven the diversity of hemocytes populations to be more complex (Pichon *et al.*, 2022) and have allowed us to characterize 7 transcriptomic clusters and thus probably 7 distinct hemocyte populations from non-stimulated snails. These

7 transcriptomic clusters are characterized by specific marker gene sets and revealed two particular lineages that probably have a common origin in a cluster of probable latent hemocytes. We finally find during the infestation and reinfestation kinetics the same transcriptomic populations with the difference of cluster 3 which seems to be very specific to HP15 time. The link that might exist between the 3 morphological populations described in microscopy and the 7 transcriptomic populations described in scRNAseq still remains very complex to establish.

In conclusion, these scRNA seq analyses allowed the identification of a probable new hemocyte population following *S. mansoni* infestation. Two transcriptomic clusters (cluster 2 and 3) stand out more specifically from this analysis in response to the parasite although all transcriptomic clusters seem to respond to the various infestations. Now, to go further in the characterization of hemocytes in response to the parasite it is necessary to confirm marker gene by QPCR and be able to link the transcriptomic clusters defined by this scRNA seq approach to the different morphological populations by In Situ Hybridization (ISH) in particular.

## Annexes

Table 1: Alignment quality check on the *Biomphalaria glabrata* genome as well as the number of cells detected before seurat analysis.

Sample	Naive	HP1	HP15	HC1
Estimated Number of Cells	2624	4851	3827	3956
Mean Reads per Cell	70601	62445	84434	89719
Median Genes per Cell	1885	2203	2148	1790
Number of Reads	185257268	302922615	323132687	354929085
Valid Barcodes	96,5	96,9	96,9	96,4
Sequencing Saturation	66	65,2	68,8	66,7
Q30 Bases in Barcode	96,4	96,4	96,4	96,4
Q30 Bases in RNA Read	93,5	93,3	93,7	93,7
Q30 Bases in Sample Index	91,4	95	96,1	94,1
Q30 Bases in UMI	95,9	96	95,9	95,9
Reads Mapped to Genome	90,1	89,5	89,1	85,2
Reads Mapped Confidently to Genome	84,1	84,6	84	79,3
Reads Mapped Confidently to Intergenic Regions	31,3	26,3	28,6	33,1
Reads Mapped Confidently to Intronic Regions	6,2	7,3	7,7	6,4
Reads Mapped Confidently to Exonic Regions	46,6	51	47,7	39,8
Reads Mapped Confidently to Transcriptome	42,9	46,8	43,8	36,2
Reads Mapped Antisense to Gene	2,4	2,7	2,5	2,4
Fraction Reads in Cells	70,4	85,4	74,7	61,4
Total Genes Detected	19820	20139	20936	21040
Median UMI Counts per Cell	7087	8500	7427	4963



## ***E. Discussion Générale des approches de « single cell RNA sequencing »***

Au vu de la littérature, les hémocytes, ainsi que la glande albumen de *B. glabrata*, sont parmi les principaux acteurs de la réponse immunitaire innée du mollusque face à des infestations par *S. mansoni* (Coustau *et al.*, 2015). Jusqu'à présent, les efforts se sont portés sur la caractérisation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire de *B. glabrata*, et uniquement d'un point de vue global, au niveau des hémocytes (Mitta *et al.*, 2005; Lockyer *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2020; De Melo *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021). Toutes ces approches ont permis l'identification d'une grande quantité et d'une grande diversité de facteurs immunitaires. L'objectif maintenant est d'agréger l'ensemble de ces données, pour mieux comprendre et définir la réponse des hémocytes lors d'une infestation par le parasite *S. mansoni*. Cependant, malgré tous ces gènes et fonctions immunitaires caractérisés pour les hémocytes, la communauté scientifique n'est pas réellement en accord sur la définition des différents types hémocytaires, et sur leurs rôles et fonctions spécifiques chez *B. glabrata*. Comme nous avons pu le voir en introduction de ce chapitre de thèse, sur la base de la littérature scientifique, il est possible de définir au moins 3 populations morphologiques d'hémocytes chez *B. glabrata* : les granulocytes, les hyalinocytes et les blast-like cells. Ainsi, pour déterminer le rôle des hémocytes dans la réponse au parasite, il est indispensable de pouvoir décrire les fonctions associées à chacune de ces populations dans cette réponse immunitaire. Mais avant cela, il faut pouvoir définir clairement, et par des méthodes non biaisées (qui n'utilisent pas les capacités d'adhésion des hémocytes par exemple), l'ensemble des populations hémocytaires existantes. Ce chapitre pose alors les bases permettant de répondre à ces deux problématiques.

En effet, ce chapitre révèle, pour la première fois, une plus grande hétérogénéité des populations hémocytaires (au niveau transcriptionnel), contrairement aux descriptions faites jusqu'à ce jour, sur la base de caractères morphologiques, dans la littérature scientifique (Martins-Souza *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2012; Prokhorova *et al.*, 2018). Grâce à l'utilisation d'outils de séquençage massif, appliquée aux nouvelles technologies d'individualisation cellulaire (« single cell RNA sequencing ») (Figure 19), nous avons pu caractériser une diversité de probables populations hémocytaires transcriptionnelles encore jamais décrite chez *B. glabrata*. La technologie de séparation des cellules, basée sur des « droplet » (Wang *et al.*, 2021), s'est révélée extrêmement efficace pour individualiser les hémocytes. Grâce à ces approches, il a été possible de récupérer environ 3000 cellules par échantillon provenant de différents pools de mollusques. La profondeur de séquençage ainsi que le séquençage en 3' utilisé par la technologie 10x genomics, est un point limitant dans ces



analyses. En effet, elles ne permettent pas, d'une part, de capturer l'ensemble des ARNm produits par une cellule, mais uniquement les plus exprimés, ou du moins ceux avec le plus d'affinité pour la chimie de cette technologie, soit environ 10% des transcripts (Yamawaki *et al.*, 2021), et elles possèdent, d'autre part, un biais attendu vers l'extrémité 3' des ARNm, là où d'autres technologies permettent une meilleure définition de chaque gène, par des séquençages plus longs et en « paired end » (Wang *et al.*, 2021). Malgré cela, et grâce au nombre important de cellules analysées, cette technique a permis la mise en évidence de 7 clusters transcriptomiques, et probablement 7 populations transcriptomiques hémocytaires différentes chez *B. glabrata*. Ces clusters sont tous retrouvés dans les 4 temps de la cinétique d'infestation et de réinfestation, permettant de retracer de probables lignages cellulaires entre tous les clusters, révélant une grande plasticité de ces hémocytes dérivant tous probablement d'une même population originelle.

Au cours de cette cinétique d'infestation et de réinfestation, l'ensemble des clusters semble répondre au parasite *S. mansoni*. Mais parmi ces clusters détectés dans la cinétique globale, seuls trois (clusters 0, 2 et 3) ressortent particulièrement prometteurs, en réponse au parasite. Le cluster 0 représente des hémocytes latents, et est probablement la population originelle à partir de laquelle dérivent les autres lignages des autres clusters de l'analyse. Le cluster 3 est le plus particulier, du fait de son expansion 15 jours après la primo infestation et de l'expression de certains gènes bien connus dans la réponse immunitaire contre le parasite (FREP, TEP, etc.). Enfin le cluster 2, qui ressort avec le cluster 3, comme des groupes de cellules exprimant les gènes ayant une réponse immunitaire mémoire de type « sustain », et représente tout de même près de 30% des gènes induits lors de l'analyse de la MII en transcriptomique globale (Pichon *et al.*, 2023). Ces analyses n'ont cependant pas permis de révéler de nouveaux clusters transcriptomiques capables de supporter le « shift » immunitaire caractéristique de la réponse immunitaire mémoire chez *B. glabrata* (Pinaud *et al.*, 2016). Nous savons maintenant que la réponse transcriptomique des hémocytes à la suite d'une réinfestation (challenge) par *S. mansoni* est déclenchée immédiatement suite à ce challenge, connaît un pic d'activation à 12h, et retourne à un état basal au bout de 24h (Pichon *et al.*, 2023). C'est ce qui est observé aussi dans cette analyse de scRNA seq, car les clusters transcriptomiques ne changent pas entre une primo infestation et un challenge (à part pour le cluster 3 qui disparaît au challenge). Mais dans ces analyses de scRNA seq, il manque probablement des échantillons intermédiaires, à la suite du challenge (6h et/ou 12h après challenge), qui permettraient probablement de détecter les cellules responsables de ce « shift » transcriptomique. En effet,

les contraintes liées au plan expérimental d'une cinétique d'infestation inverse permettant d'obtenir l'ensemble des échantillons au même moment, ont forcé le choix des temps de la cinétique. Cependant, le succès de telles techniques de séparation cellulaire pour les hémocytes, la puissance d'analyse des outils bioinformatiques utilisés et surtout la baisse constante des coûts liés au scRNA seq permettraient de faire de nouvelles expériences sur plus de temps de cinétique.

Cette technique de scRNA seq est un outil indispensable dans la définition sans *a priori* des différentes populations hémocytaires, et dans la caractérisation de la réponse de chacune d'elles à divers pathogènes. Cet outil permet l'identification précise de marqueurs moléculaires spécifiques de chacune de ces probables populations, mais à lui seul ne permet pas d'assigner un cluster transcriptomique à une population morphologique spécifique. L'étape suivante sera donc d'utiliser les données générées par ces approches « omiques », afin d'assigner à chaque population morphologique un ou plusieurs clusters transcriptomiques. Pour cela, et grâce à l'avancée des technologies, de nouvelles expériences de cytométrie en flux ont pu être réalisées sur des hémocytes de pools de mollusques (BgBRE) au cours d'une cinétique d'infestation et de réinfestation similaire à celle réalisée pour les analyses de scRNA seq (Figure 20). Grâce à la précision de ces trieurs de cellules, il serait à présent possible de séparer plus précisément de 3 à 4 populations hémocytaires. Ces populations probables sont symbolisées par des encadrés rouges de la Figure 20. Nous pourrions ensuite récupérer ces populations et tenter, par des approches de PCR quantitative, par exemple, ou par de nouvelles approches de scRNA seq, de relier morphologie et expression transcriptomique. D'autres techniques plus coûteuses peuvent aussi être développées, comme l'hybridation *in situ* des ARN, que nous avons démarrée au laboratoire afin d'identifier la morphologie associée à l'expression de certains gènes marqueurs (Figure 21). Cette technique permettrait de cibler très spécifiquement les gènes marqueurs définis par les approches de scRNA seq directement dans des cellules fixées sur lame, nous permettant de définir la morphologie de celles-ci, et donc d'associer à chaque cluster la population hémocytaire dans laquelle elle se trouve.

Enfin, les données générées sur l'ensemble de ces 12 836 cellules, mais aussi celles permettant leurs identifications morphologiques, vont permettre le développement du premier atlas hémocytaire chez *B. glabrata*. Le but sera de pouvoir mettre au service de la communauté scientifique, un atlas, dans un premier temps hémocytaire, mais qui pourra être enrichi de cellules provenant de tissus ou d'organes de *B. glabrata*, dans des conditions naïves bien sûr, mais aussi en réponse à divers pathogènes, comme *S. mansoni*. Il sera alors possible d'identifier

les profils moléculaires de certains hémocytes, notamment en suivant l'expression de gènes d'intérêt au cours de la cinétique d'infestation et de réinfestation à *S. mansoni*, et de les connecter à des descriptions cellulaires plus "conventionnelles" (microscopie, etc.). Nous pouvons retrouver ce type d'atlas cellulaire à plus grande échelle, avec le projet lancé chez l'humain (Regev *et al.*, 2017), mais aussi chez le parasite *S. mansoni* par la mise en place, pour l'instant, d'un atlas cellulaire d'adultes (mâles et femelles) mais aussi du stade schistosomule du parasite (Diaz Soria *et al.*, 2020; Wendt *et al.*, 2020).

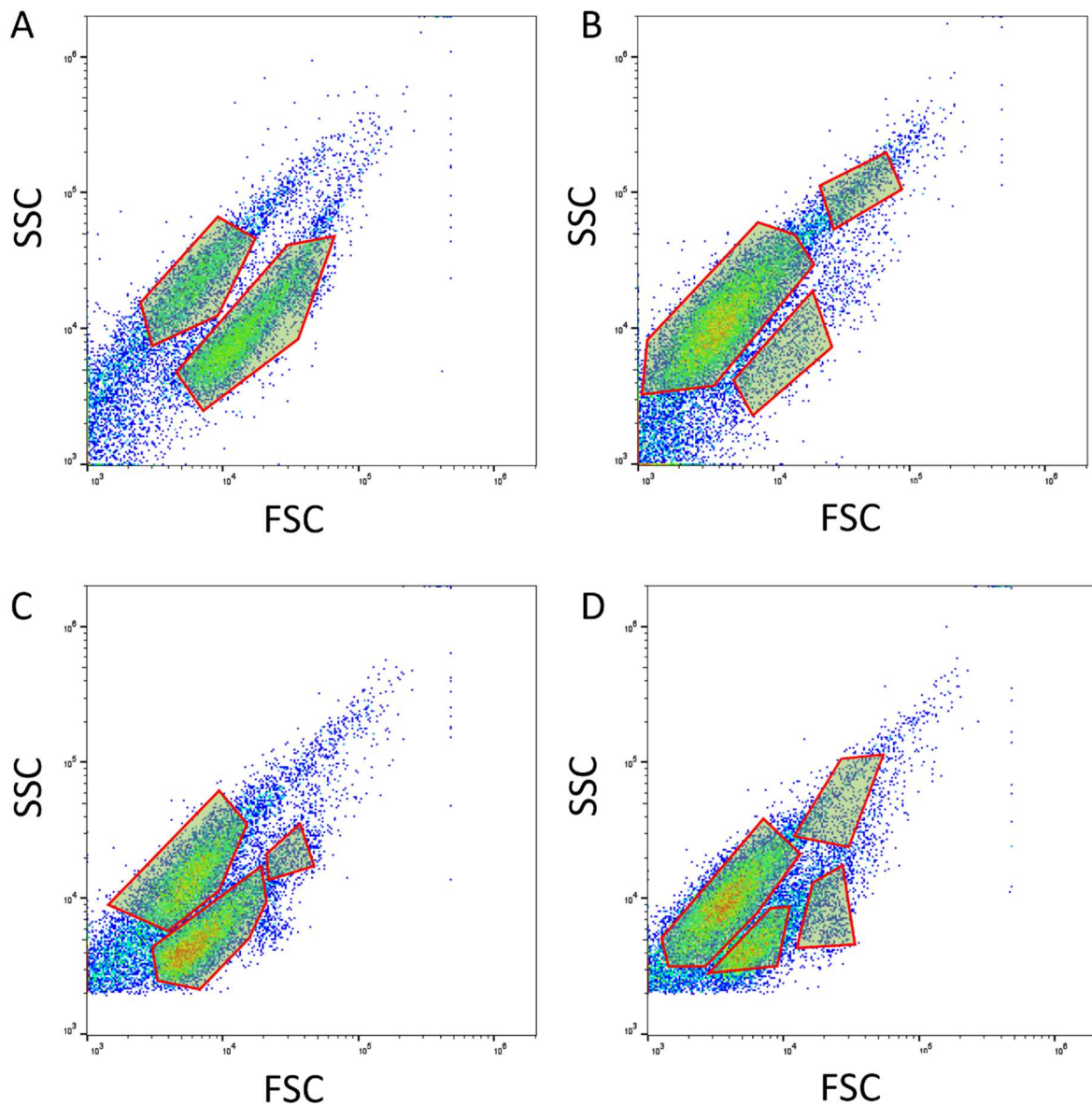


Figure 20: Tests préliminaires de cytométrie en flux. Comptage de 20 000 évènements pour chacune des conditions traitées et affichées sur une échelle logarithmique en fonction du SSC (« side scatter ») et du FSC (« forward scatter »). A: condition naïve; B: condition 1 jour après primo infestation; C: condition 16 jours après primo infestation; D: condition 1 jour après le challenge. Les encadrés rouges symbolisent de possibles populations hémocytaires différentes en fonction de la taille des cellules et de leur granulométrie.

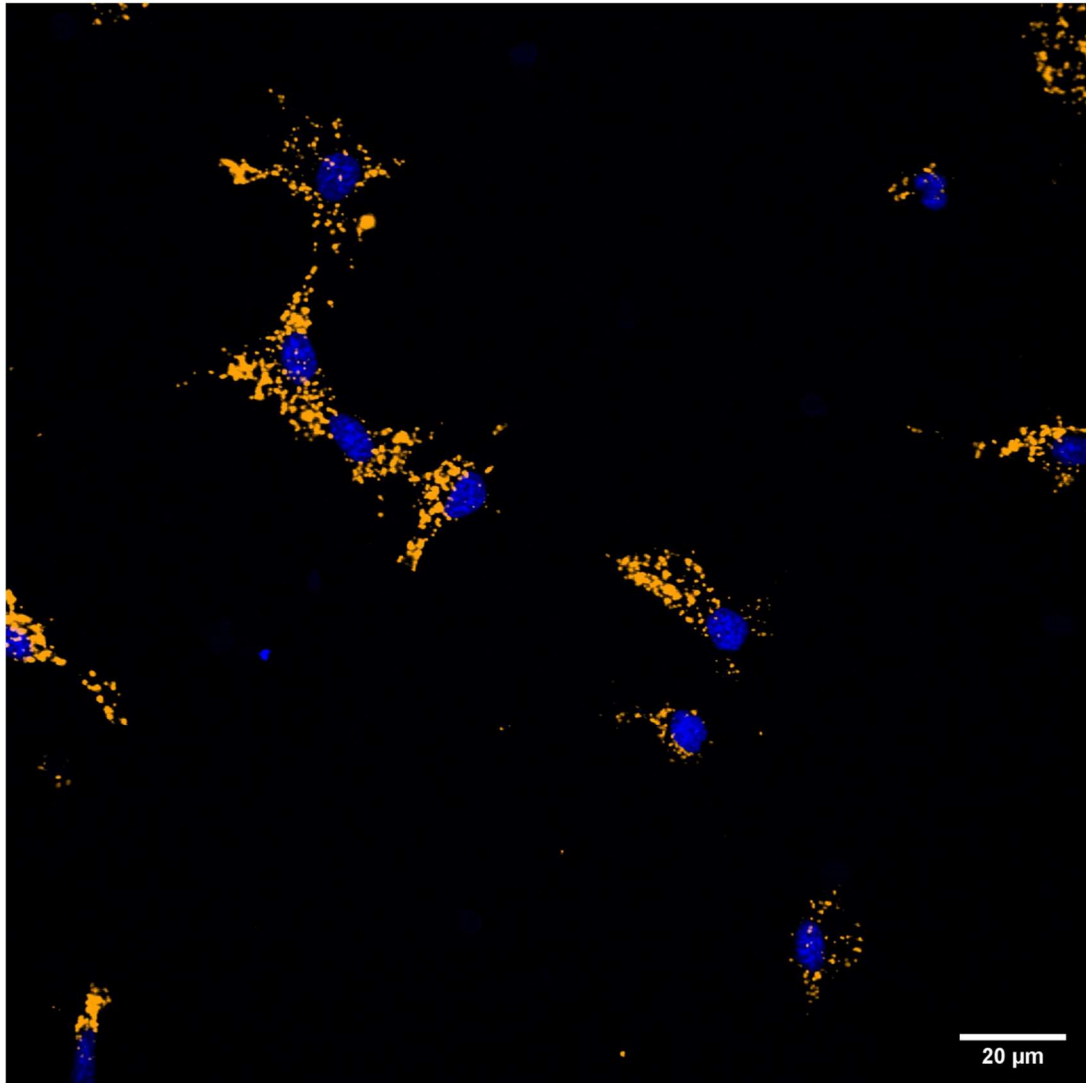


Figure 21: Observation en microscopie confocale (grossissement x100) de transcrits cibles (orange) révélés par des approches de RNAscope sur hémocytes de *B. glabrata* fixés sur une lame de verre. Les noyaux des hémocytes sont révélés par marquage DAPI.



**Chapitre III :**  
**Développement d'outils de transgénèse et de validation**  
**fonctionnelle du métabolisme dans la MII chez *B. glabrata***

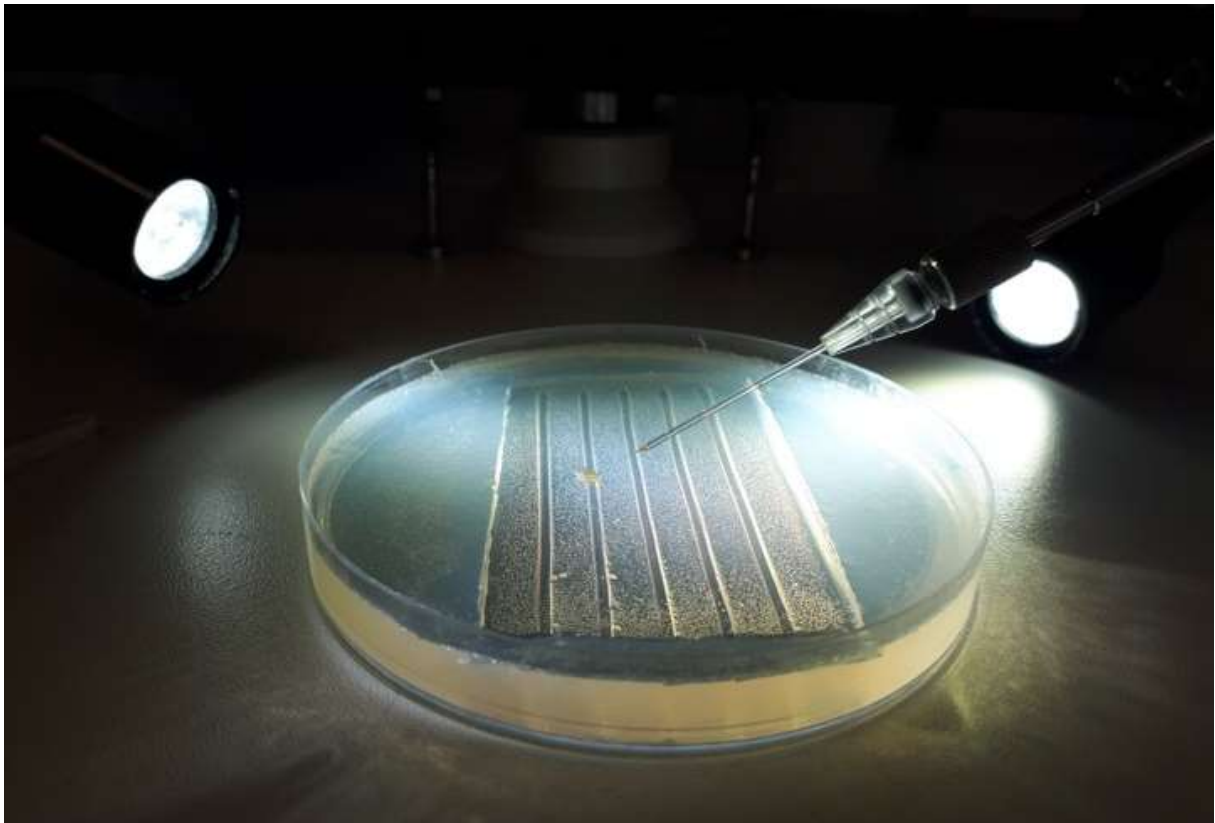


Photo précédente : Photo représentant la micro-injection d'une masse d'œufs de *Biomphalaria glabrata* sous une loupe binoculaire.

L'apport des nouvelles technologies de séquençage massif est un atout indéniable dans l'objectif de décrire les mécanismes moléculaires de l'acquisition de la mémoire immunitaire chez *B. glabrata*. Cependant, ces techniques donnent une image certes précise, mais très globale de l'état transcriptionnel des cellules à un moment donné, ou dans notre cas, en réponse à une infestation et une réinfestation par *S. mansoni*. Nous avons aussi fait le choix de limiter ces analyses à un compartiment cellulaire très spécifique, les hémocytes, et donc ne pas prendre en compte, bien sûr, l'entière complexité de la réponse au pathogène. Ainsi, nous avons pu montrer que les hémocytes sont porteurs de la mémoire immunitaire innée (MII) chez *B. glabrata* (cf. chapitre I), ce qui répond en partie à la première question de cette thèse, mais ouvre alors sur une multitude d'autres questions dont ce dernier chapitre de thèse posera les premières bases, et apportera les premiers résultats d'une meilleure caractérisation de la MII.

La première partie de ce chapitre s'intéressera à une nouvelle technique de transgénèse, en cours de développement au laboratoire, et portant sur l'utilisation d'une transposase. L'un des freins à l'étude des mécanismes moléculaires chez *B. glabrata* est probablement le manque d'outils nous permettant d'agir directement sur le génome du mollusque. Le développement de tels outils sera d'un enjeu majeur dans les recherches futures, en ce qui concerne la MII, mais aussi dans tous les domaines de recherche impliquant *B. glabrata*, en nous permettant la création de nouvelles lignées transgéniques de ce mollusque.

La deuxième partie de ce chapitre portera sur la validation fonctionnelle des conclusions que nous avons tirées dans le premier chapitre de cette thèse, sur le rôle probable du métabolisme cellulaire dans l'acquisition de la MII. Jusqu'à présent, nous pouvions mettre en exergue des changements métaboliques dans les hémocytes à la suite de l'infestation par *S. mansoni*. Cependant, nous ne savons pas si ces derniers changements font bien partie des premières briques composant le déclenchement de la MII, et s'ils induisent bien les modifications épigénétiques ressemblant aux changements épigénétiques induits lors de la mémoire entraînée des vertébrés que nous observons et qui pourraient être un prérequis à l'acquisition de la MII chez *B. glabrata*. Pour permettre de valider ces hypothèses, nous avons fait le choix de bloquer ou d'induire, par l'utilisation de drogues spécifiques, ces voies métaboliques clés et de mesurer leur effet sur le phénotype de mémoire immunitaire entre le mollusque et le parasite *S. mansoni*.

Finalement, cette partie s'intéresse au développement d'outils et de techniques innovantes dans le but de réaliser de véritables validations fonctionnelles, à la fois concernant



les hypothèses et conclusions tirées de cette thèse, mais aussi de questions plus fondamentales auxquelles les recherches antérieures n'ont pas pu ou eu la possibilité de répondre.

## ***A. Transformation génétique par transgène chez *Biomphalaria glabrata****

### ***1. L'outil de transposition***

Jusqu'à présent, la lutte contre la Schistosomiase, et donc contre le parasite *S. mansoni*, s'est largement focalisée sur l'utilisation d'une chimiothérapie de masse, utilisant une molécule, le praziquantel (Cf. introduction), couplée à une tentative de contrôle systématique des vecteurs (mollusques) par l'utilisation de molécules molluscicides. Les problèmes posés par cette approche sont multiples car, comme nous avons pu le voir, des résistances peuvent apparaître au praziquantel (Ismail *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2012). Des personnes sont rapidement réinfestées, faute de protection durable de ces thérapies (Molehin *et al.*, 2022). Les molluscicides ont un impact écologique très discutable sur les zones où ils sont utilisés, bien que de nombreuses recherches portent sur la découverte de nouvelles molécules, tirées des plantes, et probablement plus écologiques (Ibrahim & Ghoname, 2018). Ces derniers manqueront de toute façon de spécificité, car les mollusques font preuve d'une forte résilience, et vont rapidement repeupler les cours d'eau traités (Coelho & Caldeira, 2016). Donc, même si toutes ces approches combinées ont eu un fort impact sur la morbidité des populations humaines, elles ne suffisent pas à contrôler efficacement la maladie (Coelho & Caldeira, 2016). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches de lutte et de contrôle de cette maladie, ce que nous proposons de faire, en nous focalisant sur une meilleure compréhension des interactions immunobiologiques entre le mollusque *B. glabrata* et son parasite *S. mansoni*.

Une des approches possibles pourrait être l'utilisation et l'implémentation en milieu naturel, dans les zones où le parasite est présent, de mollusques résistants à *S. mansoni*, naturellement ou ayant acquis cette résistance grâce à la MII (Hubendick, 1958; Famakinde, 2018). Le développement d'outils de modification du génome pourrait être une solution efficace pour produire ces mollusques résistants. Grâce à l'avancée des technologies de séquençage massif, le génome de *B. glabrata* ne nous est plus inconnu (Raghavan & Knight, 2006; Adema *et al.*, 2017). Ce dernier nous a permis de réaliser toutes les analyses au cours de cette thèse (Cf. Chapitre I et II), et nous a surtout donné l'occasion de mettre en évidence une multitude de gènes au potentiel immunitaire contre *S. mansoni* (Famakinde, 2018; Castillo *et al.*, 2020). Cependant, nous ne connaissons pas encore le rôle exact de tous ces gènes, et surtout leur implication dans la réponse à *S. mansoni*. Le développement d'un outil, capable d'éditer le

génomique des mollusques, se révèle indispensable. D'une part, pour réaliser des études de génomique fonctionnelle complètes, et donc mieux définir le rôle de tous ces gènes immunitaires. Et d'autre part, pour provoquer des modifications génétiques, notamment par l'ajout de gènes d'intérêt (de résistance à l'infestation), sous le contrôle de promoteurs dits constitutifs (permettant l'expression constante du gène qu'il contrôle dans l'organisme), ou de promoteurs inductibles (par exemple par l'infestation par *S. mansoni*). Ce type d'approche est déjà étudiée dans d'autres modèles vecteurs, comme chez le moustique (Wang & Jacobs-Lorena, 2013; Kyrou *et al.*, 2018), afin de limiter la propagation du parasite *Plasmodium falciparum* et la transmission de la malaria. Dans cet exemple, la technologie CRISPR-Cas9 a été utilisée pour bloquer l'expression du gène doublesex femelle (AgdsxF) chez *Anopheles gambiae*, et provoque ainsi une stérilité des femelles dans les populations maintenues en laboratoire. L'idée, dans ces expériences, est de pouvoir introduire ces femelles stériles dans les milieux naturels, afin qu'elles entrent en compétition avec les populations sauvages, dans le but de réduire la capacité de transmission de la maladie. Ce type d'approche pourrait être réalisé avec notre modèle d'étude *B. glabrata*, non pas cette fois-ci, par la stérilisation des femelles tentée chez l'anophèle, étant donné que *B. glabrata* est capable d'autofécondation, mais en implémentant dans le génome des mollusques sauvages sensibles, des gènes de résistance. La technique CRISPR-Cas9 a montré sa faisabilité dans d'autres modèles mollusques (Abe & Kuroda, 2019) mais également du côté du parasite *S. mansoni* (Ittiprasert *et al.*, 2019). Cependant, cette technologie reste complexe à mettre en œuvre, et est toujours en cours de développement dans les laboratoires. C'est pourquoi nous avons décidé de proposer une nouvelle approche de modification du génome, basée sur l'utilisation de transposons, certes moins précise que les « ciseaux moléculaires », mais tout aussi efficace pour éditer les génomes.

Nous avons recherché, un élément transposable actif dans une gamme d'organisme appartenant à des phyla variés et phylogénétiquement éloignés, pour optimiser nos chances de succès chez un nouvel organisme mollusque comme *B. glabrata*. Nos recherches se sont focalisées sur l'utilisation de l'élément transposable *Minos* (Franz & Savakis, 1991). Cet élément transposable de la superfamille des Tc1/mariner, de classe II (mécanisme de « couper/coller »), a été découvert pour la première fois chez *Drosophila hydei* (Franz & Savakis, 1991) (Figure 22). Il fonctionne grâce à la conjugaison de deux transposons, deux éléments dits autonomes et non autonomes. Un transposon autonome porte, entre ses deux régions répétées et inversées (ITR, Figure 22), un gène codant pour une transposase active. Alors qu'un transposon dit non autonome, porte toujours ces régions répétées (ITR)

fonctionnelles, mais le gène de la transposase, quant à lui, n'est pas fonctionnel. Cependant, ce transposon non autonome peut être créé en y incorporant un gène d'intérêt (promoteur et gène codant pour la GFP par exemple), et utilisé par une transposase active qui sera capable de reconnaître les sites de transposition (ITR). Ainsi, le transposon contenant le gène d'intérêt pourra être intégré dans le génome de l'espèce transfectée aléatoirement, dans des parties du génome avec des sites « TA » (Klinakis *et al.*, 2000). Un plasmide contenant un transposon non autonome est appelé plasmide donneur, alors qu'un plasmide ou un ARNm codant pour une transposase active est appelé plasmide ou ARNm auxiliaire (« helper ») (Pavlopoulos *et al.*, 2007). Cet élément *Minos* est particulièrement intéressant pour une application sur le modèle *B. glabrata*, puisque cet élément transposable a montré son activité dans un grand nombre d'organismes différents. Il a montré être actif dans des modèles vertébrés (Zagoraiou *et al.*, 2001), chez certains diptères comme la drosophile (Loukeris *et al.*, 1995) et l'anophèle (Catteruccia *et al.*, 2000), et plus généralement dans plusieurs espèces d'insectes (Pavlopoulos *et al.*, 2007) et de crustacés, et plus récemment chez certains chordés comme *Ciona intestinalis* (Sasakura *et al.*, 2003).



Figure 22: Représentation schématique de la structure de l'élément *minos* isolé chez *Drosophila hydei*. IDR: "inner direct repeat"; ITR: "inverted terminal repeat"; ODR: "outer direct repeat". Schéma tiré de (Pavlopoulos *et al.*, 2007).

Grâce à l'utilisation de cet élément transposable *Minos*, nous souhaitons mettre en place une méthodologie efficace de transformation génétique de *B. glabrata*, en se basant sur les expériences de transformation génétique, qui ont été développées par l'équipe de Michalis Averof de l'institut de génomique fonctionnelle de Lyon, sur le crustacé *Parhyale hawaiiensis* (Pavlopoulos & Averof, 2005). La technique développée par cette équipe nécessite, dans un premier temps, l'utilisation de matériel moléculaire spécifique, comme un vecteur de transposition (plasmide), contenant l'élément transposable *Minos*, que nous avons décrit plus haut, ainsi qu'un promoteur constitutif ou inductible chez *B. glabrata*. Il est essentiel de fournir au système une source de transposase active, soit par l'utilisation d'un plasmide portant la séquence de la transposase *Minos* sous contrôle du même promoteur actif chez *B. glabrata*, soit par l'utilisation d'ARNm de la transposase synthétisée *in vitro* à partir d'un plasmide, contenant la séquence de l'ARNm de cette transposase, que nous utiliserons aussi chez *B. glabrata* (pBlueSKMimRNA a été donné par Michalis Averof (Addgene plasmid # 102535 ; <http://n2t.net/addgene:102535> ; RRID:Addgene\_102535)) (Pavlopoulos *et al.*, 2004). Dans un

deuxième temps, il sera nécessaire de développer des techniques précises permettant l'injection dans l'hôte de ce matériel moléculaire, soit par la micro-injection directe, soit par l'utilisation de lipofectant, soit par une combinaison des deux.

Nous nous sommes dirigés sur l'amélioration des techniques de micro-injection préalablement mises au point dans la modification du méthylome de *B. glabrata* (Luviano *et al.*, 2022). Afin de pouvoir créer des lignées de mollusques transgéniques, il est nécessaire de pouvoir réaliser ces transformations génétiques au stade le plus précoce du développement de l'embryon, le stade une cellule permettant l'intégration du transposon dans l'ensemble des cellules de l'organisme, et donc des cellules germinales. Peu d'études à ce jour portent sur le développement embryonnaire de *B. glabrata*. Au début des années 2000, certains scientifiques se sont intéressés au développement embryonnaire de la coquille de l'escargot (Bielefeld & Becker, 2002), mais les seules études relativement complètes du développement de l'embryon, depuis le stade une cellule, datent des années 90 (Kawano Camey *et al.*, 1992). *B. glabrata* pond ses œufs, après autofécondation ou reproduction sexuée, dans l'eau sur des supports solides. Les œufs, d'un nombre très variable, sont contenus et entourés d'une masse gélatineuse (Figure 23), produite par des glandes mucipares et oothécales, servant probablement à la protection des œufs, en formant une capsule relativement rigide, transparente, laissant apparaître les œufs et les cellules embryonnaires (Hathaway *et al.*, 2010). Le développement et les divisions cellulaires des embryons dans chaque masse d'œufs se fait de façon asynchrone entre les différents œufs d'une même masse (Kawano Camey *et al.*, 1992) (Figure 23).

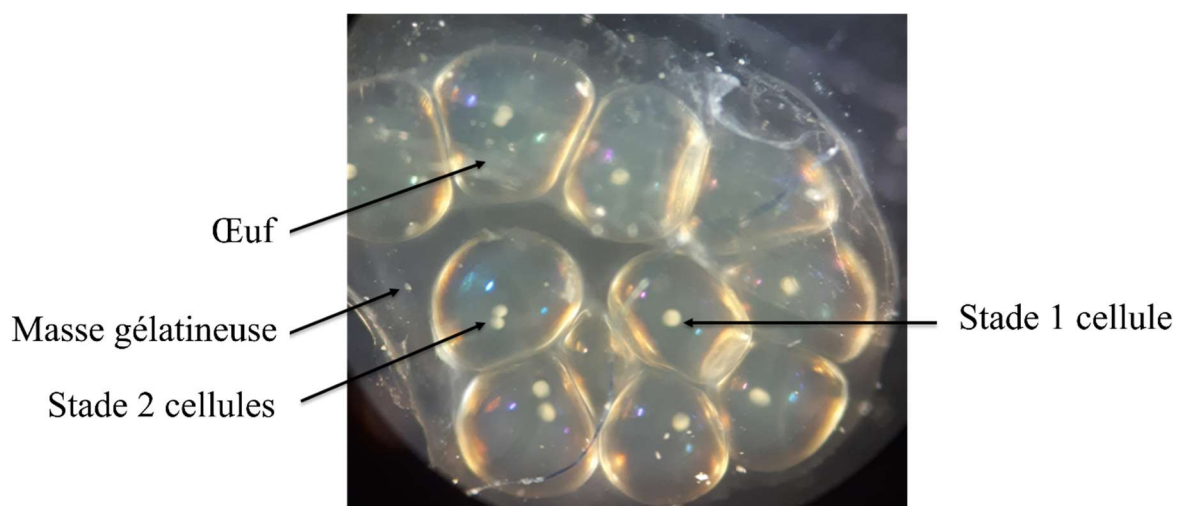


Figure 23: Photo représentant une masse d'œuf de *B. glabrata*, contenant des cellules embryonnaires à différents stades de développement. Le diamètre d'un œuf est d'environ 1mm.

Pour permettre le développement et la validation du matériel moléculaire (promoteur, injection plasmidique et ARNm, etc.) envisagé, nous avons décidé d'axer nos expériences sur les seules lignées de cellules en culture de *B. glabrata*, les cellules Bge (« *B. glabrata* Embryonic cell line »), par l'utilisation de lipofectant. Ces cellules maintenues *in vitro*, possèdent deux avantages non négligeables. Le premier est directement lié au développement de la technique utilisant les transposons dans un nouveau modèle comme *B. glabrata*. En effet, cette technique n'ayant jamais été utilisée dans ce modèle, il existe encore beaucoup de zones d'ombre (techniques de micro-injection couplées ou non à l'utilisation de lipofectant, stade de développement optimal pour la micro-injection, etc.), et il est nécessaire d'optimiser avant de pouvoir déterminer l'efficacité du matériel génétique utilisé (promoteur, transposase, etc.). Le deuxième point d'intérêt de ces cellules est lié à leur utilisation, dans la caractérisation de l'interaction *B. glabrata*/*S. mansoni*, permettant de substituer un modèle complexe (mollusque) par un modèle plus « simple » (cellules en culture). Ces cellules peuvent s'avérer utiles, notamment par la mise en place d'une lignée transgénique, les utilisant comme une usine biologique, et permettre l'expression de gènes immunitaires d'intérêt, par exemple par injection de ces cellules Bge transformées chez des mollusques receveurs (xénogreffes).

## ***2. La méthode de transgénèse par l'utilisation de transposase chez B. glabrata***

### ***i. Détermination du promoteur et création du plasmide donneur***

Nous avons, dans un premier temps, dû trouver un promoteur actif chez *B. glabrata*. Pour cela, la littérature ne fournit pas de données pour cet escargot, cependant, grâce aux travaux de Laursen et Yoshino dans les années 90 (Laursen *et al.*, 1997; Yoshino *et al.*, 1998), nous avons été capables de récupérer la séquence promotrice du gène codant pour une protéine « heat-shock » de 70-KD (HSP70). Cette séquence promotrice s'avère d'autant plus intéressante pour la poursuite de ces techniques de transgénèses, étant donné que des HSP70 sont régulièrement retrouvés dans les études portant sur la réponse à *S. mansoni* (Lockyer *et al.*, 2004; Zahoor *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2017). En effet, plusieurs gènes codants pour des HSP70 se retrouvent sur-régulés, en réponse à une infestation et une ré infestation par *S. mansoni* dans les hémocytes de *B. glabrata* (Pichon *et al.*, 2023). C'est donc un promoteur qui, en plus d'être fonctionnel chez ce mollusque, pourrait s'avérer être aussi inductible, soit par l'infestation soit par le biais de stress thermiques (Yoshino *et al.*, 1998). Nous avons ensuite fait le choix de synthétiser *in vitro* le plasmide (Figure 24) contenant un gène rapporteur, ici un gène codant

pour la protéine EGFP, sous contrôle du promoteur HSP70. Ce promoteur et gène sont encadrés par les deux régions permettant la transposition par *Minos* (Figure 24).

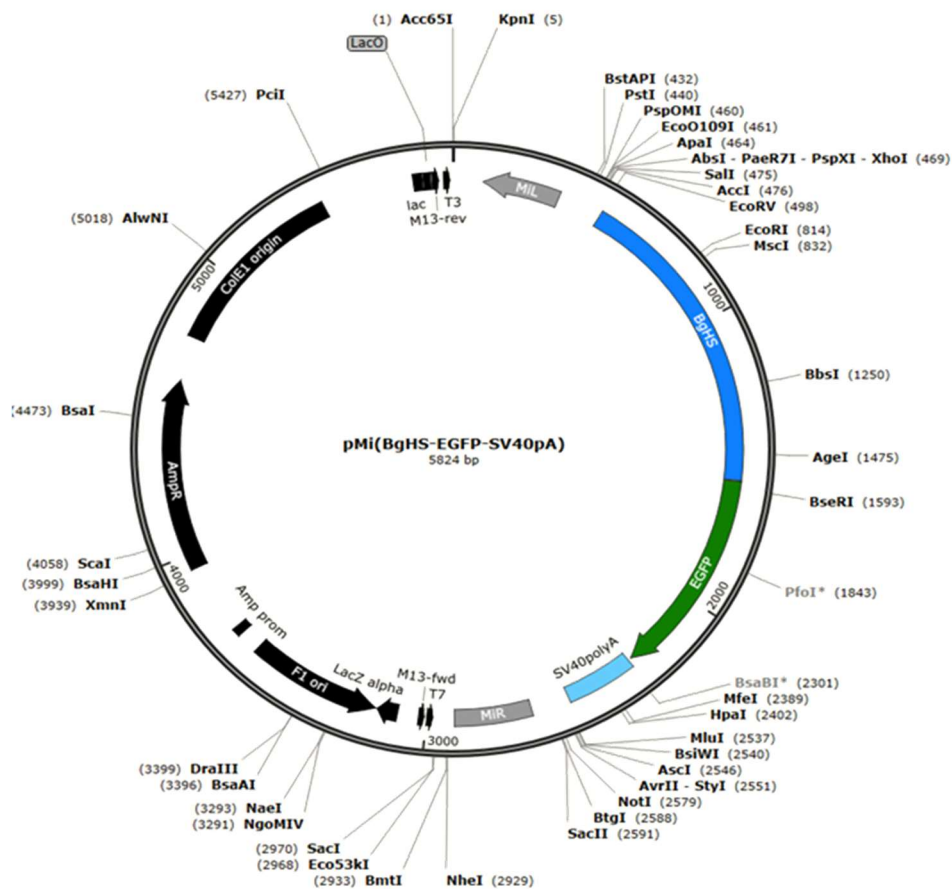


Figure 24: Carte de restriction du plasmide pMi(BgHS-EGFP-SV40pA) contenant les sites de transposition Minos (MiR et MiL), la position du promoteur HSP70 (BgHS) ainsi que du gène de la protéine rapporteur EGFP.

## ii. Transfection ADN, ARN de cellules Bge et tests d'excision

Dans un deuxième temps, il nous est nécessaire de tester l'activité du promoteur HSP70 dans les cellules Bge, et de réaliser alors les premiers tests de transfection d'ADN plasmidique sur cellules de *B. glabrata* en culture. Nous avons choisi de tester un lipofectant particulier (K4® Transfection System - DNA & RNA Transfection (Biontexas)), capable de délivrer aux cellules de l'ADN, mais aussi de l'ARNm, dans le but de réaliser *in fine* des co-transfections de plasmide, contenant le transposon et d'ARNm codant pour la transposase. Les cellules Bge maintenues en milieu Bge (Hansen, 1976) ont donc été mises dans 3 puits d'une plaque de culture cellulaire de 24 puits (environ 1000 cellules par puits). Les cellules sont alors maintenues 24h à 26°C pour atteindre la confluence des cellules dans chaque puits et les laisser adhérer naturellement au fond de ceux-ci. Le milieu de culture est alors remplacé par une solution de CBSS (Chernin's balanced salt solution) puis, les cellules sont exposées au mélange

transfectant K4 et plasmide pMi(BgHS-EGFP-SV40pA) (Figure 24) pour un ratio de 1 (1µg de plasmide) : 4 (4µl de transfectant) pendant 6h. Enfin, le milieu contenant le transfectant est remplacé par du milieu Bge, et les cellules sont laissées en culture à 26°C pendant 24h avant d'être observées en microscopie à fluorescence (Figure 25). La transfection d'ARNm, avec ce kit de transfection K4, n'a jamais été réalisée chez *B. glabrata*. Avant de réaliser les premiers tests de co-transfections, il est tout d'abord important de tester la transfection d'ARNm seul. Pour cela, nous avons utilisé de l'ARNm EGFP produit *in vitro* grâce au kit T7 mMACHINE mMACHINE (Ambion) que nous avons mis en présence de cellules Bge en culture dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits, comme dans l'expérience précédente de transfection ADN. Le même protocole est utilisé, mais cette fois-ci, avec un ratio ARNm/Transfectant de 1 (2.4µg d'ARNm) : 2 (4.8µl de transfectant) et 1 : 3.

Enfin, l'utilisation de cette technologie des transposons, dans ce modèle d'étude *B. glabrata*, permettra de démontrer ou non la présence d'une transposase endogène, capable de prendre en charge le transposon fourni par le plasmide donneur, et ainsi perturber le bon déroulement de ces expériences lorsque les co-transfections avec de l'ARNm *Minos* seront entreprises. Pour ces expériences d'excision du transposon, nous utilisons un plasmide test (pMLRTet(Lorist) donné par Michalis Averof & Charalambos Savakis (Addgene plasmid # 102537 ; <http://n2t.net/addgene:102537> ; RRID:Addgene\_102537), (Klinakis *et al.*, 2000)) dont nous possédons des amorces PCR (F1 : 5'-TGCATTCTCTATGCT-3' ; R1 : 5'-CCAGCTGGCTTATCGAAA-3'), flanquant les sites de transposition contenant un gène exprimant la tétracycline. La transfection des cellules Bge par ce plasmide est réalisée suivant les mêmes paramètres que ceux utilisés pour la transfection du plasmide pMi(BgHS-EGFP-SV40pA) (Figure 24). Les cellules sont ensuite lavées au CBSS, reprises, et lysées, avant de récupérer l'ADN total pour l'amplification par PCR avec les amorces spécifiques au plasmide pMLRTet(Lorist). De l'ADN génomique total de cellules Bge de mollusque *B. glabrata* (BgBRE), ainsi que des concentrations décroissantes de plasmide (1/10ème à 1/10000ème) (Figure 27) ont été utilisés comme contrôle de l'amplification PCR et de la spécificité.

### ***iii. Micro-injection sur embryon***

Une fois toutes ces expériences menées sur les cellules Bge, il sera nécessaire d'utiliser cette technologie de transposition sur des mollusques entiers. L'objectif étant de cibler les lignées germinales de l'escargot, pour développer des lignées transgéniques stables de *B. glabrata*, dans un premier temps, en intégrant dans le génome le gène codant pour l'EGFP afin

de valider la faisabilité et, dans un deuxième temps, n'importe quel gène immunitaire d'intérêt. Du fait de la morphologie particulière des œufs de *B. glabrata* et de la petite taille de son embryon (Figure 23), nous avons utilisé des techniques de micro-injection, afin de délivrer au plus proche de l'embryon, le matériel moléculaire (plasmide + ARNm) nécessaire à la transformation génétique. En effet, l'embryon est à la fois très petit, mais aussi libre dans l'œuf ce qui empêche de réaliser une micro-injection directement dans la cellule embryonnaire. Il faudrait, soit faire deux perforations de l'œuf (une pour maintenir l'embryon et l'autre pour injecter), soit extraire l'embryon de son œuf, ce qui pour l'instant est extrêmement compliqué voire impossible avec le matériel à notre disposition. Nous devons donc injecter les constructions plasmidiques plus les ARNm, non pas dans l'embryon directement, mais dans l'œuf. Cela nous oblige à déterminer si les ADN et ARNm injectés dans l'œuf sont capables d'atteindre l'embryon, et surtout de pénétrer dans la cellule. S'ils ne sont pas rentrés « naturellement » dans la cellule, il faudra alors utiliser des transfectants *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons utilisé un dextran Rhodamine B fluorescent de 10 kDa, pour tester à la fois les techniques de micro-injection, le matériel de micro-injection (aiguille, quantité de matériel injecté, etc.), la capacité du matériel fluorescent à accéder à l'intérieur des cellules embryonnaires lorsqu'il est injecté dans l'œuf, et à mesurer la viabilité des embryons à la suite de toutes ces manipulations. Les injections ont été réalisées sur des embryons au stade une cellule, la capacité du dextran à pénétrer les cellules embryonnaires a été mesurée en retirant et en lavant au CBSS certains embryons de leurs œufs, et le reste des œufs injectés ont été maintenus dans l'eau à 25°C jusqu'à leur éclosion pour mesurer la viabilité des embryons.

### ***3. Résultats préliminaires et perspectives***

#### ***i. Transfection ADN et ARNm de cellules Bge***

Les premières observations faites sur des cellules Bge, transfectées avec seulement le plasmide donneur contenant le promoteur HSP et le gène rapporteur EGFP, montrent que ce promoteur HSP est bien actif dans ces cellules. L'utilisation de ce nouveau transfectant K4 permet de délivrer le plasmide sans provoquer de surmortalité des cellules ainsi que la construction plasmidique à un nombre conséquent de cellules Bge, où le rendement de transfection est estimé aux alentours de 10% (Figure 25). Les mêmes expériences ont été réalisées avec de l'ARNm EGFP préalablement transcrit *in vitro*. Les résultats sont encourageants et montrent que le transfectant utilisé est capable de délivrer de l'ARNm aux cellules Bge (Figure 26).



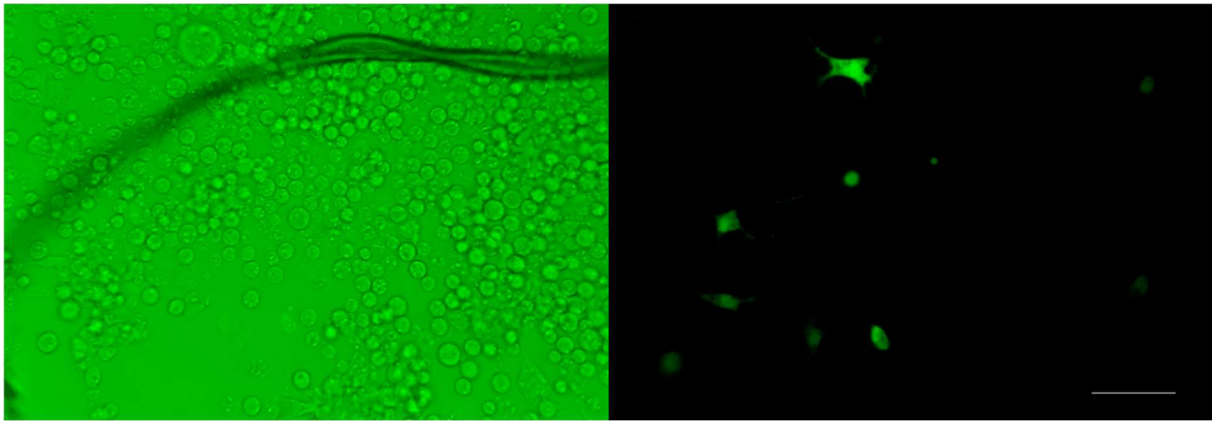


Figure 25: Observation au microscope inversé d'un puits de plaque 24 puits de culture cellulaire au grossissement X20 de cellules Bge transfectées avec le plasmide pMi(BgHS-EGFP-SV40pA) et exprimant le gène rapporteur EGFP. La barre blanche représente 100 $\mu$ m.

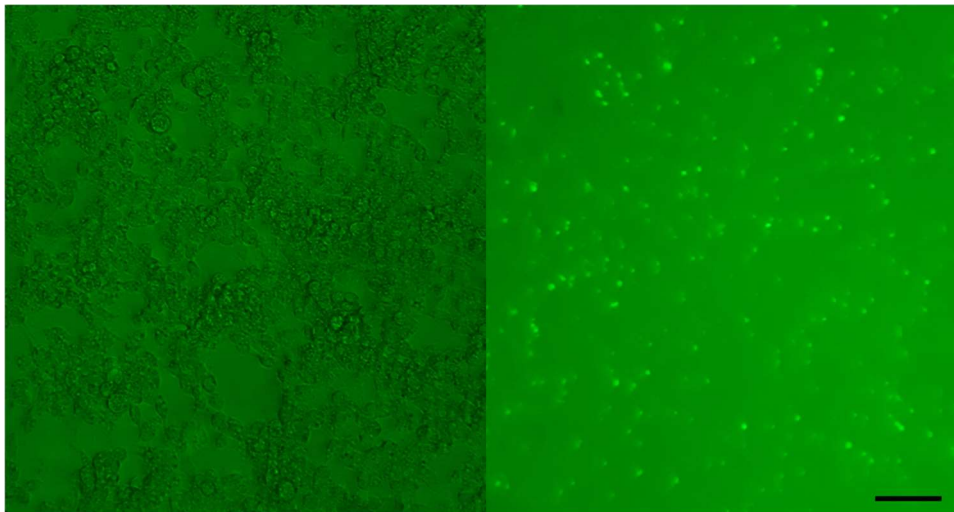


Figure 26: Photographie d'un plan large de cellules Bge en culture après transfection d'ARNm EGFP. Observation réalisée avec une loupe binoculaire au grossissement X10, permettant de rendre compte du fort taux de transfection des cellules. La barre noire représente 200 $\mu$ m.

Ce type d'analyse reste encore préliminaire. Les simples observations microscopiques de transfection d'ADN et d'ARNm, séparément l'une de l'autre, montrent une bonne efficacité de transfection des cellules (entre 5% et 10%), mais ne sont pas assez précises pour déterminer le pourcentage des cellules transfectées. Des analyses de cytométrie en flux doivent être réalisées, afin d'évaluer exactement le taux de transfection dans les cellules Bge. Mais finalement, ces expériences ne portent que sur la transfection de cellules par de l'ADN ou de l'ARNm, mais pas des deux en même temps (co-transfection). Pour pouvoir créer une lignée de cellules Bge et, *in fine*, une lignée de mollusques transgéniques, il est indispensable de fournir au plasmide donneur une transposase active chez *B. glabrata*. Mais avant cela, il faut s'assurer qu'une telle molécule n'est pas déjà présente dans les cellules Bge, ce qui pourrait compromettre le contrôle de la transposition du gène rapporteur dans le génome des cellules. Les tests de transfection avec le plasmide pMLRTet(Lorist) et l'analyse PCR du transposon

(Figure 27B) ont montré que dans les cellules Bge, aucune transposase capable d'agir sur les sites de transposition *Minos* n'est active dans ces cellules. Une amplification PCR autour de 200pb aurait été le signe de la présence d'une transposase active dans ce modèle (Figure 27A), or le gel d'électrophorèse (Figure 27B) ne révèle qu'une bande autour de 2200pb, correspondant à l'amplification du transposon non clivé, toujours intégré dans le plasmide, et donc aucune transposition endogène n'a pu être observée.

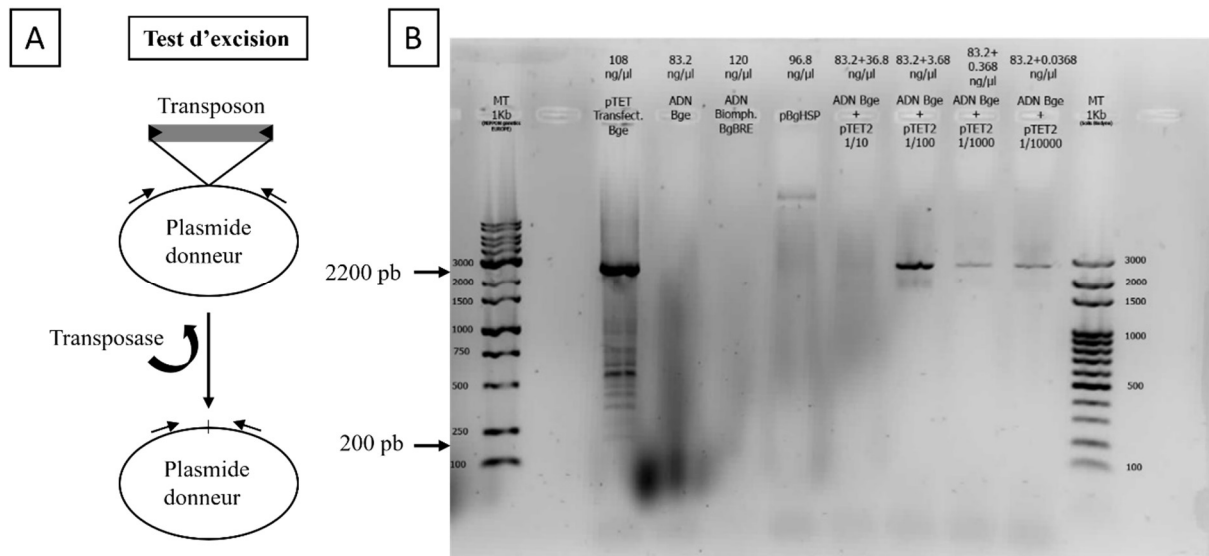


Figure 27: A. Représentation schématique de l'action de la transposase sur le plasmide ainsi que l'emplacement des amorces PCR (schématisées par les flèches noires à la surface des plasmides). B. Gel d'électrophorèse montrant l'amplification, par des amorces flanquant les éléments de transposition *Minos*, du plasmide donneur pMLRTet(Lorist) (pTET) à partir d'ADN total de cellules Bge ayant été transfectées. L'ensemble des autres puits d'électrophorèse représentent différents contrôles d'amplification au niveau de l'ADN de cellules Bge (sans transfection préalable), d'ADN de mollusque entier, d'un autre plasmide (pBgHSP) ou encore de l'ADN de cellules Bge auquel est ajouté différentes concentrations de plasmide r (pTET2) avant l'amplification PCR. MT = Marqueur de taille.

## ii. Les perspectives de transgénèse de cellules Bge

Les techniques et matériels moléculaires de base étant validés, il est maintenant essentiel de procéder aux premières co-transfections (ADN/ARNm) dans les cellules Bge. Ces expériences sont en cours, avec l'utilisation, une nouvelle fois, du plasmide pMLRTet (Lorist) co-injecté dans les cellules avec de l'ARNm *Minos*, grâce au transfectant K4. Une simple amplification PCR, comme montré en Figure 27, permettra de révéler le « saut » du transposon sous l'action de la transposase. Lorsque cette étape sera réussie, nous pourrons alors réaliser les mêmes transfections, mais cette fois-ci en utilisant le plasmide pMi(BgHS-EGFP-SV40PA). Si l'intégration dans le génome des cellules Bge est stable, nous devrions être capables de garder, sur le long terme, des cellules exprimant l'EGFP. Cependant, même si le taux de transfection semble bon (autour de 10%), la proportion de cellules transfectées est très minoritaire par rapport aux cellules non transfectées. Il faut donc pouvoir « enrichir » nos cultures de cellules

transfectées, en supprimant les cellules ne contenant pas d'insertion du transposon. Deux techniques sont alors à notre disposition. La première consiste à trier par cytométrie en flux (FACS) ces cultures cellulaires, afin de récupérer les cellules exprimant la GFP. La majorité de ces cellules auront subi au moins un événement d'intégration du transposon, cependant, il sera indispensable de trier un grand nombre de cellules pour avoir une chance par la suite, de maintenir et d'accroître le nombre de cellules Bge en culture. La deuxième, quant à elle, nous obligerait à reconstruire un plasmide donneur en intégrant, par exemple, un gène de résistance à un antibiotique couplé ou non à un gène rapporteur comme la GFP, nous permettant par la suite de discriminer les cellules transfectées de celles qui ne l'ont pas été. Une telle technique demanderait de nombreux tests de transfection et de développement en plus de la création de ce nouveau plasmide.

### ***iii. Micro-injection de dextran fluorescent dans l'œuf***

Le challenge de la micro-injection, c'est de co-injecter de l'ADN, le plasmide donneur (contenant le transposon), et la transposase sous forme d'ARNm, directement dans l'embryon du mollusque. Cependant, avec les technologies à notre disposition, injecter directement dans la cellule embryonnaire semble impossible à réaliser. L'embryon est d'une part, mobile dans l'œuf, donc difficile à approcher et nécessiterait de percer à deux endroits ce dernier pour maintenir l'embryon pendant l'injection. Cela altérerait l'intégrité de l'œuf et donc la viabilité de l'embryon. Et d'autre part, l'embryon de *B. glabrata*, surtout au stade une cellule, est extrêmement petit (Figure 23). Il faudrait alors l'extraire de l'œuf pour avoir des chances de réussir l'injection. Nous n'avons pas d'autre choix que de micro-injecter directement dans l'œuf, au plus proche de l'embryon, bien que nous ne sachions pas si le matériel moléculaire injecté sera capable d'entrer dans les cellules embryonnaires. Nous ne savons pas si l'embryon dans l'œuf est entouré d'une membrane, et dans un tel cas, nous serions obligés d'utiliser un lipofectant qui délivrera *in vivo* le plasmide et l'ARNm. Les expériences de micro-injection préalablement mises au point au laboratoire (Luviano *et al.*, 2022), qui utilisaient un transfectant, généraient un taux de mortalité élevé des embryons (96%). Pour améliorer la survie des mollusques, il faudrait probablement s'abstenir de l'utilisation d'un transfectant. Un test d'injection de dextran fluorescent de 10kDa dans l'œuf a montré que cette substance est entrée dans les cellules embryonnaires sans utiliser de transfectant (Figure 28C et D). Une contrainte supplémentaire est que la composition de la masse gélatineuse, contenant les œufs, empêche l'injection d'une quantité précise de matériel dans les œufs, venant parfois boucher en partie

l'aiguille du capillaire d'injection. Cependant, ces expériences montrent que nous sommes capables d'injecter une quantité variable, et parfois importante, de matériel dans les œufs sans altérer la viabilité de l'embryon (Figure 28A et B). L'ensemble des embryons micro-injectés avec le dextran est arrivé à maturité. Ils ont éclos normalement (100% de survie). Le dextran s'est même conservé dans les mollusques après éclosion (Figure 29), non pas dans toutes les cellules, mais il semblerait avoir été stocké dans la partie interne de la coquille du mollusque, du moins jusqu'à la fin de ces expériences préliminaires, soit 2 semaines après éclosion.

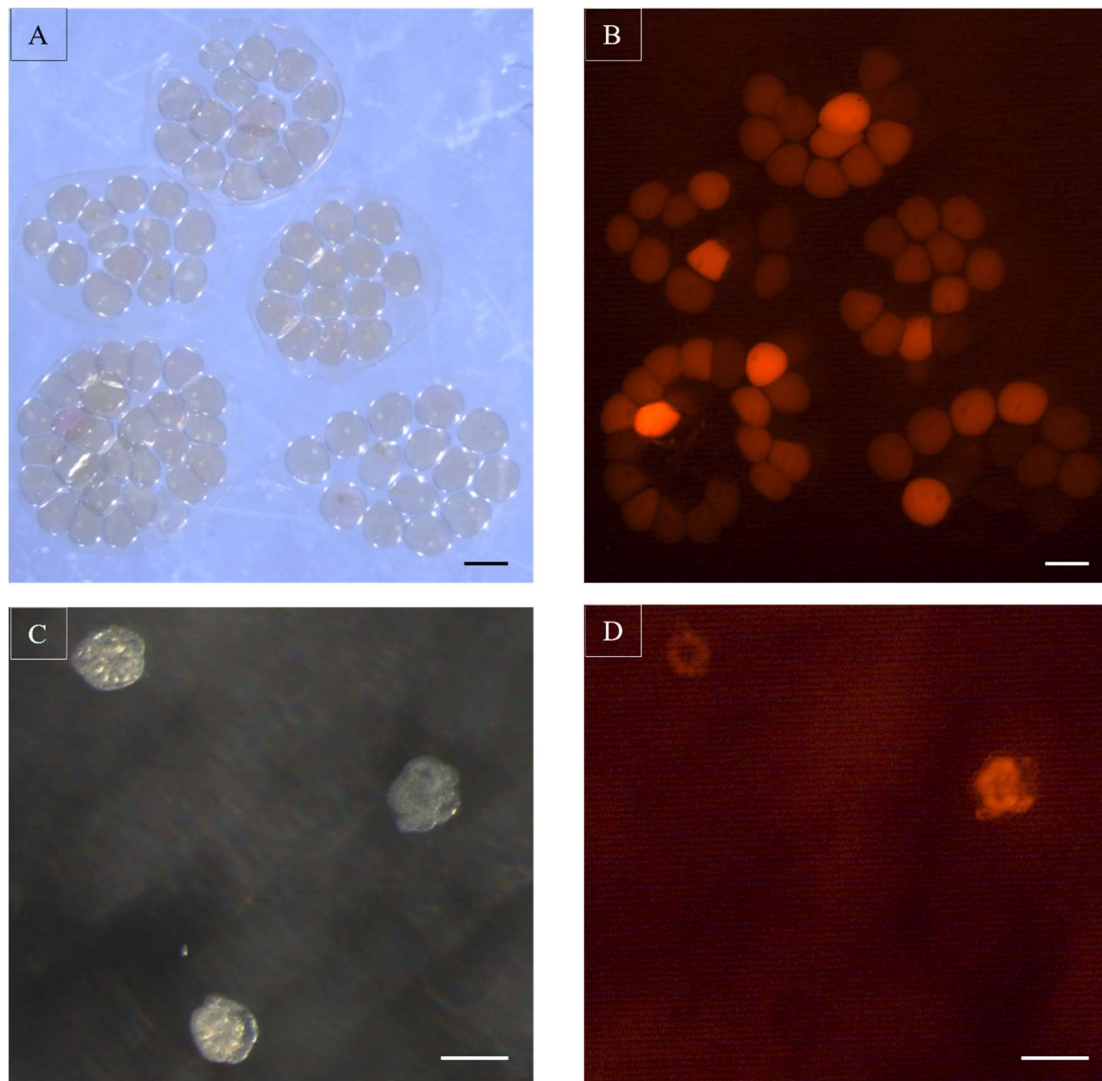


Figure 28: Photos de masses d'œufs de *B. glabrata* (A et B) et d'embryons extraits de l'œuf (C et D) transfectés avec un dextran rhodamine B de 10 kDa, observés sous loupe binoculaire en lumière blanche (A et C) et en fluorescence (B et D). Barre noire et blanche : 1mm (A et B) ; 200 $\mu$ m (C et D).

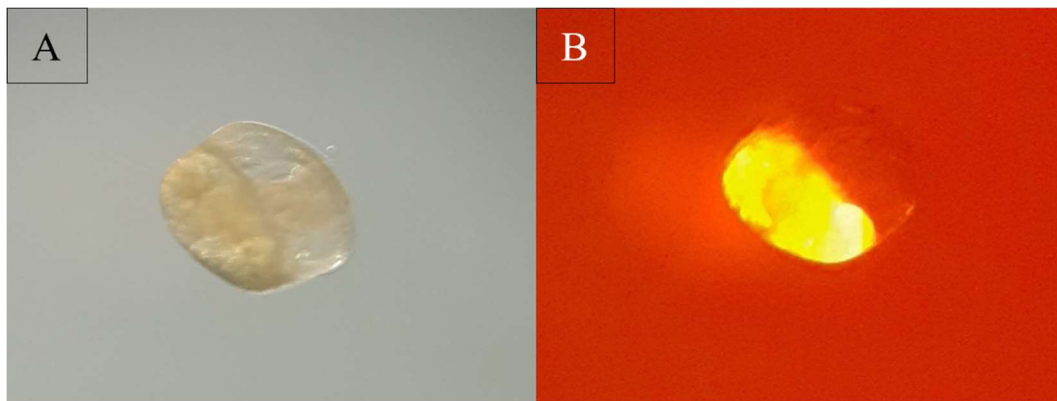


Figure 29: Photos de *B. glabrata* après éclosion (1 jour) observé sous loupe binoculaire en lumière blanche (A) et en fluorescence (B). Le mollusque fait une taille d'environ 1mm à l'éclosion (A et B).

#### 4. Conclusion et objectifs à court terme sur les embryons et les cellules Bge

Nous pouvons aujourd'hui transférer de l'ADN et de l'ARNm aux cellules Bge. Nous savons que ces cellules ne possèdent pas de transposase active, naturellement capable de traiter le transposon *Minos*, mais qu'elles ont la capacité d'exprimer un gène rapporteur comme l'EGFP, sous le contrôle d'un promoteur HSP synthétisé *in vitro*. Ces expériences ont été décisives dans l'évaluation de la faisabilité de la mise en place des techniques de transgénèse dans ce modèle d'étude. En ce qui concerne le développement de cette technique de transgénèse sur cellule Bge, il ne nous reste qu'à définir les paramètres optimaux de co-transfection et d'activité de la transposase *Minos* dans ces cellules en culture, par les mêmes approches d'amplification PCR que celles réalisées précédemment (Figure 27). Une fois la confirmation de l'activité de la transposase prouvée, nous pourrions produire les premières lignées transgéniques de cellules Bge, exprimant dans un premier temps, simplement une molécule rapportrice comme la GFP. Cette technique ne pourra être utilisée que pour faire exprimer n'importe quelle molécule (immunitaire par exemple) à ces cellules en culture. Concernant le promoteur utilisé (HSP), des études plus poussées sur les possibilités d'induction de ce promoteur devront être réalisées avant de procéder aux expérimentations sur l'embryon, afin de savoir s'il est possible de l'induire par un stress thermique, ou par le stress causé par une infestation par *S. mansoni*. Ces expériences pourront être couplées avec de la cytométrie en flux afin de nous permettre de récupérer des fractions enrichies en cellules portant les modifications génétiques recherchées.

Une fois la technologie éprouvée sur le modèle Bge, nous aurons la possibilité de l'adapter au modèle plus complexe embryonnaire de *B. glabrata*. Les expériences préliminaires ont montré que le matériel de micro-injection utilisé, pour délivrer, dans un premier temps, un

dextran fluorescent, était assez précis, sans altérer la viabilité de l'embryon. Cependant, les molécules d'ADN (plasmide) et d'ARNm nécessaires pour ces expériences de transgénèses, sont bien plus grosses que le dextran (10 kDa) utilisé, et pourraient donc être bloquées à l'extérieur de l'embryon. En effet, la masse moléculaire d'un nucléotide est de 330 Da et un plasmide d'environ 5000 pb devrait faire autour de 3 300 kDa. Il serait judicieux, dans un premier temps, d'injecter un dextran fluorescent de plus grande taille. Si cette molécule passe à travers les différentes barrières de l'embryon, alors il sera peut-être possible d'injecter de la même façon le matériel génétique nécessaire à la transformation génétique. Sans compter, bien sûr, d'autres facteurs, comme la nature des charges portées par nos produits injectés, qui peuvent aussi entrer en compte dans leurs capacités à entrer dans les cellules. Mais si ce dextran d'un plus haut poids moléculaire n'est pas capable de passer les différentes barrières alors, nous serons dans l'obligation d'utiliser un transfectant *in vivo*. Ce dernier peut être toxique pour l'embryon et, par conséquent, rendre la procédure de transfection encore plus complexe.

## ***B. Le rôle du métabolisme cellulaire dans l'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez B. glabrata***

### ***1. Le métabolisme cellulaire acteur clé de l'acquisition de la MII***

#### ***i. L'effet Warburg comme mécanisme clé dans la MII***

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons été en mesure de démontrer que *B. glabrata*, et plus précisément les cellules de l'immunité innée de cet escargot, les hémocytes, sont capables de développer une mémoire immunologique efficace et spécifique contre le parasite *S. mansoni*. Ce processus appelé MII a été caractérisé pour la première fois dans ce modèle d'étude, au niveau phénoménologique en réponse à une réinfestation par *S. mansoni*, mais aussi par la vaccination avec des extraits de parasite, ou encore du plasma de mollusque primé (Portela *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2016). Des approches, plus poussées, de ces mécanismes au niveau moléculaire, ont aussi permis de mettre en évidence un shift transcriptomique au niveau du mollusque entier, un phénomène déterminant dans l'acquisition de cette MII chez *B. glabrata*. Nous avons par ailleurs confirmé l'existence de ce shift dans les hémocytes, faisant de ces cellules un des supports de la MII. Grâce aux analyses « omiques » faites sur les hémocytes, nous avons pu montrer une forte corrélation entre les infestations par *S. mansoni* au cours d'une cinétique d'acquisition de la MII et la modification de plusieurs paramètres épigénétiques mais également au niveau métabolique. En temps normal, lorsque les cellules sont au « repos », ces dernières utilisent préférentiellement les voies de la

phosphorylation oxydative pour subvenir à la majorité de leurs besoins énergétiques par la production notamment d'ATP. Cependant, cette voie métabolique est difficilement inductible pour les cellules et, lorsque ces dernières sont confrontées à un besoin énergétique immédiat, elles sont obligées de basculer cette production d'énergie vers des voies, certes moins performantes dans la production d'ATP (en termes de quantité), mais plus facilement inductibles comme la voie de la glycolyse anaérobie avec *in fine* la production d'acide lactique. Ce shift métabolique, ou effet Warburg, est bien connu pour les cellules cancéreuses (Warburg, 1956), et est aussi un des mécanismes fondamentaux dans l'acquisition de la « trained immunity » (mémoire entraînée) des organismes vertébrés (Netea & van der Meer, 2017).

Dans le modèle d'étude *B. glabrata*, nous avons mis en évidence un probable effet Warburg dans les hémocytes en réponse à l'infestation par *S. mansoni*. En effet, les analyses de métabolomique ciblée faites sur ces cellules immunitaires ont démontré une accumulation et une production plus importante de métabolites clés comme le lactate, signe d'une augmentation de l'activité de la voie de la glycolyse anaérobie (Cf. Chapitre I). Cette modification métabolique entraîne aussi l'accumulation d'autres métabolites clés du cycle de Krebs comme le fumarate et l'activation de certaines autres voies comme la voie de la glutamine. Tous ces changements rappellent certes les mécanismes de la « trained immunity ». Cependant, nos expériences les montrent sans apporter de validation fonctionnelle quant à l'importance de ces changements métaboliques dans l'acquisition de la MII dans les cellules de *B. glabrata*, ainsi que la relation de cause à effet qui peut exister entre les différentes infestations et plus généralement dans la réponse globale du mollusque. Mais alors, comment valider avec certitude l'importance de ces changements métaboliques dans les processus d'acquisition de la MII chez *B. glabrata* ? Une des solutions serait de produire des lignées transgéniques viables de mollusques, chez lesquelles nous aurions perturbé l'expression de certains gènes clés de ces voies métaboliques. Cependant, la technologie qui pourrait nous permettre de faire cela est en cours de développement (Cf. Chapitre III.A.). La solution technique que nous avons choisie de suivre, nous a été inspirée, d'une part, par les mêmes expériences de validation fonctionnelles chez les vertébrés et la « trained immunity » et, d'autre part, via des mesures directes de paramètres physico-chimiques en lien avec le métabolisme cellulaire (Cf. Chapitre I.C.), que nous avons réalisées sur les hémocytes et les cellules Bge. Cette solution repose sur l'utilisation de drogues qui ciblent spécifiquement certains enzymes ou voies métaboliques.

L'objectif est de définir des drogues capables, *in fine*, d'activer ou de réprimer une partie des mécanismes d'acquisition de la MII, en venant perturber la mise en place d'une

reprogrammation métabolique, que nous avons observée dans les hémocytes. Pour cela, nous avons utilisé des inhibiteurs fonctionnels du métabolisme tels que la metformine, l'oxamate et le 2-Deoxyglucose (2-DG) (Cf. Chapitre I.C.4. ; Figure 13).

En ce qui concerne la metformine, cette drogue est principalement connue pour son action sur le complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie chez les modèles vertébrés (Fontaine, 2018). C'est une molécule couramment utilisée chez l'Homme comme traitement contre le diabète de type 2 (Dziubak *et al.*, 2018). La plupart des inhibiteurs de la chaîne respiratoire ont des effets pléiotropes rendant la seule inactivation de l'OxPhos complexe. En agissant sur le complexe I de la chaîne respiratoire, la metformine réduit le ratio ATP/AMP et active un senseur clé du métabolisme : la protéine AMP kinase (AMPK). La metformine permet l'inhibition de l'OxPhos et devrait favoriser l'induction de la glycolyse comme autre source de production d'énergie par les cellules (Rena *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2021).

Les deux autres drogues choisies, oxamate et 2-DG, ont un effet relativement similaire sur la production d'énergie par la glycolyse, mais agissent à deux endroits différents de cette voie. Ces deux drogues ont montré leur activité dans le modèle *B. glabrata*, et notamment dans les cellules Bge lors de nos expériences de Seahorse (cf. Chapitre I partie III), mais aussi parce qu'elles sont utilisées dans d'autres modèles notamment pour perturber la MII (Arts, Carvalho, *et al.*, 2016; Bekkering *et al.*, 2018). Le 2-DG est un analogue du glucose, il entre en compétition avec ce dernier et contribue à l'inhibition de l'hexokinase, une enzyme impliquée dans la première étape de la voie de la glycolyse (Mulder *et al.*, 2019). L'oxamate, quant à lui, est un analogue du pyruvate qui cible spécifiquement la lactate déshydrogénase, une enzyme permettant la conversion du pyruvate en lactate et donc de bloquer la glycolyse dans la dernière étape de la voie, le tout en forçant le pyruvate à entrer dans le cycle de Krebs ce qui induit une augmentation de l'activité de la voie de l'OxPhos (Awasthi *et al.*, 2019). Cette drogue devrait empêcher l'accumulation de certains métabolites du cycle du TCA tout en limitant les changements épigénétiques associés et donc la MII.

Bien que certaines de ces drogues aient montré une action sur des cellules en culture de *B. glabrata* (Cf. Chapitre I.C.4.), elles n'ont, à ce jour, jamais été testées sur les mollusques entiers. Cette partie de thèse développera les premières expériences de toxicité menées principalement sur une drogue, la metformine. Ainsi que les analyses de métabolomique ciblées réalisées sur le plasma de mollusques, sous l'effet de ces trois drogues, permettant de mesurer précisément, dans le compartiment hémolympatique, leurs actions sur le métabolisme général des escargots.



## ***2. Des drogues ciblant le métabolisme comme outils de validation fonctionnelle***

### ***i. Tests de toxicité des drogues***

#### **Chez l'hôte *B. glabrata***

Les mollusques sont exposés aux différentes drogues par baignation (Metformin (CAS 1115-70-4), Oxamate (CAS 565-73-1), 2-DG (CAS 154-17-6)) : 0, 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 et 200 mM. Trois réplicas (trois groupes de trois mollusques par puits de plaque de culture cellulaire de 12 puits) par condition ont été réalisés sur des escargots entre 9 et 11mm de diamètre. Etant donné que nous ne connaissons pas le temps de demi-vie de ces drogues, dans l'eau et dans les organismes, nous avons choisi de renouveler les doses de chaque drogue chaque jour après le début de l'exposition par baignation, pour maintenir une concentration journalière identique durant 4 jours. Durant cette expérience, deux marqueurs de trait de vie des escargots ont été suivis, comme la fréquence des battements cardiaques (mesurés en battement par minute), réalisée sur l'ensemble des mollusques, et la consommation de nourriture (en mesurant la masse en mg de salade consommée tous les 24h) mesurée par puits (regroupant donc 3 mollusques).

#### **Chez le parasite *S. mansoni***

A l'heure actuelle, seule la toxicité de la metformine a pu être testée sur le parasite. Comme les mollusques ont été traités par baignation, nous évaluerons la toxicité de la drogue sur les stades miracidium du parasite. Nous calculerons, d'une part, la toxicité de la drogue sur le parasite lui-même, en regardant la vitesse de nage et son comportement. D'autre part, nous mesurerons l'impact de la drogue sur la capacité du parasite à infester son hôte et, à se développer dans les tissus de ce dernier, en présence des drogues, par la réalisation de tests d'infestation avec des parasites exposés et non exposés à la drogue. Les mollusques seront ensuite disséqués 15 jours après infestation pour mesurer les prévalences et intensités parasitaires entre ces différents groupes expérimentaux.

## **Effet de la drogue sur le comportement et la nage des parasites**

Deux réplicas d'un pool de 10 SmBRE ont été mis en contact par balnéation avec différentes concentrations de metformine : 0, 0.1, 1, 5, 10, 25 mM. Des vidéos de nage et du comportement général des miracidia ont été prises sous loupe binoculaire, afin de mesurer la vitesse de nage des miracidia, grâce au logiciel ImageJ (version 1.41), en prenant les parcours de nage les plus rectilignes possibles.

## **Effet de la drogue sur la capacité des parasites à se développer *in vitro***

Quatre réplicas de 10 miracidia ont été placés dans des plaques 12 puits de culture cellulaire dans un milieu de culture CBSS, un cocktail d'antibiotiques (3X Pénicilline, Streptomycine et Amphotéricine B, Sigma Aldrich 516104-M), ainsi que différentes concentrations en metformine : 0, 0.1, 1, 5, 10, 25 mM. Pendant 24h, la transformation des miracidia en sporocystes primaires est alors évaluée et le pourcentage de parasites capables de se transformer (déterminé par leur capacité à perdre complètement leurs plaques ciliées) est alors noté pour chaque concentration de metformine. Leur viabilité est également appréciée, par observation du battement des cellules flammes (néphridies), qui est un bon marqueur de viabilité chez ces organismes (Moné, Mitta, *et al.*, 2010).

## **Effet de la drogue sur l'infestation**

Les miracidia ont été exposés à différentes concentrations de metformine : 0, 0.1, 1, 5 mM pendant 15 min. Trois cents miracidia ont été utilisés par condition (concentration de drogue) afin d'infester 30 BgBRE avec 10 miracidia par mollusque. Les mollusques sont fixés 15 jours plus tard dans une solution de Raillet-Henri (NaCl 6g, acide acétique 20mL, Formol 40% 50mL, QSP H<sub>2</sub>O), les mesures d'intensité et de prévalence de l'infestation sont quantifiées par dissection des mollusques et par analyse de la présence de sporocystes.

### ***ii. Métabolomique ciblée***

Afin de réaliser les analyses de métabolomique ciblée sur le plasma de *B. glabrata*, trois concentrations pour les trois drogues (metformine, 2-DG, oxamate) ont été choisies : 0, 1 et 5 mM. Par condition de concentration, 12 mollusques (taille entre 9-11mm) ont été mis en contact avec ces drogues par balnéation pendant 24h. L'eau, contenant les drogues, est renouvelée au

bout de 12h afin de maintenir une concentration en drogue constante. A l'issue du traitement, l'hémolymphe des mollusques est récupérée, poolée par deux et centrifugée pendant 5 min à 2700 g et à 4°C. Par échantillon, 20µl de plasma est alors récupéré pour former les 6 répliques d'analyse, et mélangé à 480 µL de méthanol pour la conservation (congélation instantanée dans l'azote puis à -80°C) jusqu'à l'analyse. La technique de métabolomique ciblée est détaillée dans le premier chapitre de cette thèse (cf. chapitre I partie I), et pour chaque drogue, 100 métabolites ont été analysés.

Les données récupérées ont été traitées grâce à MetaboAnalyst (v 5.0, <https://www.metaboanalyst.ca/>) (Pang *et al.*, 2022). La normalisation des données s'est faite en utilisant les statistiques Pareto (centrée sur la moyenne et divisée par la racine carrée de l'écart-type de chaque variable) et une transformation logarithmique générale (glog) (Durbin *et al.*, 2002; van den Berg *et al.*, 2006). Tous les échantillons exposés aux différentes drogues ont été analysés grâce à l'algorithme « Partial Least Square-Discriminant » (PLS-DA) pour déterminer l'importance des variables en projection (VIP) de chaque métabolite. Ces derniers, ayant une P-value < 0.05 (test T de Student) et une valeur VIP > 1, sont considérés comme significativement différents entre les groupes.

### ***iii. Expériences de « shift » métabolique***

La metformine est la seule drogue que nous ayons pu, à ce jour, tester *in vivo* pour mesurer son impact sur l'activation de la MII et son effet sur une infestation par *S. mansoni*. Par l'utilisation de la metformine, nous souhaitons bloquer la voie de l'Oxphos et activer la voie de la glycolyse, comme expliqué en introduction de cette partie. Nous voulons déterminer le temps de mise en contact des mollusques avec les drogues, dans le but de mesurer un effet de ces dernières sur le métabolisme de ce modèle mollusque, bien sûr, mais aussi sur l'acquisition ou la répression de la MII. Au total, 90 mollusques BgBRE ont été utilisés, et la concentration à 1 mM de drogue a été choisie pour cette expérience. Un pool de 30 BgBRE a été maintenu dans la drogue pendant 3 jours, un autre pendant 10 jours et le dernier pool n'a pas été mis en contact avec la drogue et a servi de contrôle négatif. Après le contact avec la drogue, les mollusques ont été mis dans de l'eau et ont subi une infestation 15 jours après par *S. mansoni* (10 miracidia / mollusque). Le contrôle négatif a été également infesté dans les mêmes conditions que les autres pools. Les mollusques sont ensuite fixés au Raillet-Henri 15 jours suivant l'infestation et disséqués pour mesurer l'intensité et la prévalence de l'infestation.

### 3. Résultats préliminaires sur l'utilisation des drogues

#### i. Effet de la metformine

Les tests de toxicité de la metformine sur les mollusques (BgBRE) ont montré une toxicité de la molécule. En effet, à partir de 5 mM, les mollusques ne se nourrissent plus (Figure 30B) (Kruskal-Wallis = 12.97, df = 5, P-value < 0.05, test de Dunn P-value < 0.05). La fréquence cardiaque n'est plus mesurable au-delà de 25 mM (Figure 30A) (Kruskal-Wallis = 26.89, df = 5, P-value < 0.05, test de Dunn P-value < 0.05) et, à partir de 100 mM (Figure 30A et B), l'espérance de vie des mollusques n'est que de quelques heures. Ces données, de trait de vie sur le mollusque, nous ont permis de définir une gamme de concentration qui ne semble pas toxique pour les escargots (entre 0.1 et 1mM) et sur laquelle, nous nous sommes appuyés pour réaliser les tests de toxicité sur le parasite.

Du côté parasites, les concentrations de metformine utilisées (de 0.1 à 5mM) n'affectent ni le comportement des miracidia dans l'eau, ni la transformation *in vitro* de ces derniers en sporocystes primaires. Seule une concentration de metformine de 5mM affecte significativement la prévalence de l'infestation par des parasites traités avec la drogue, faisant passer cette dernière de 100% à 85% (Figure 30C), l'intensité, quant à elle, ne semble pas être perturbée, même si une tendance non significative à la baisse est observée. Toutes ces expériences révèlent un seuil de toxicité de 5mM de metformine, à la fois pour le mollusque, mais aussi pour le parasite et les paramètres d'infestation. Il sera donc nécessaire de choisir des concentrations de drogues plus faibles que 5mM pour lesquelles il y a un effet conséquent sur le métabolisme de *B. glabrata*.

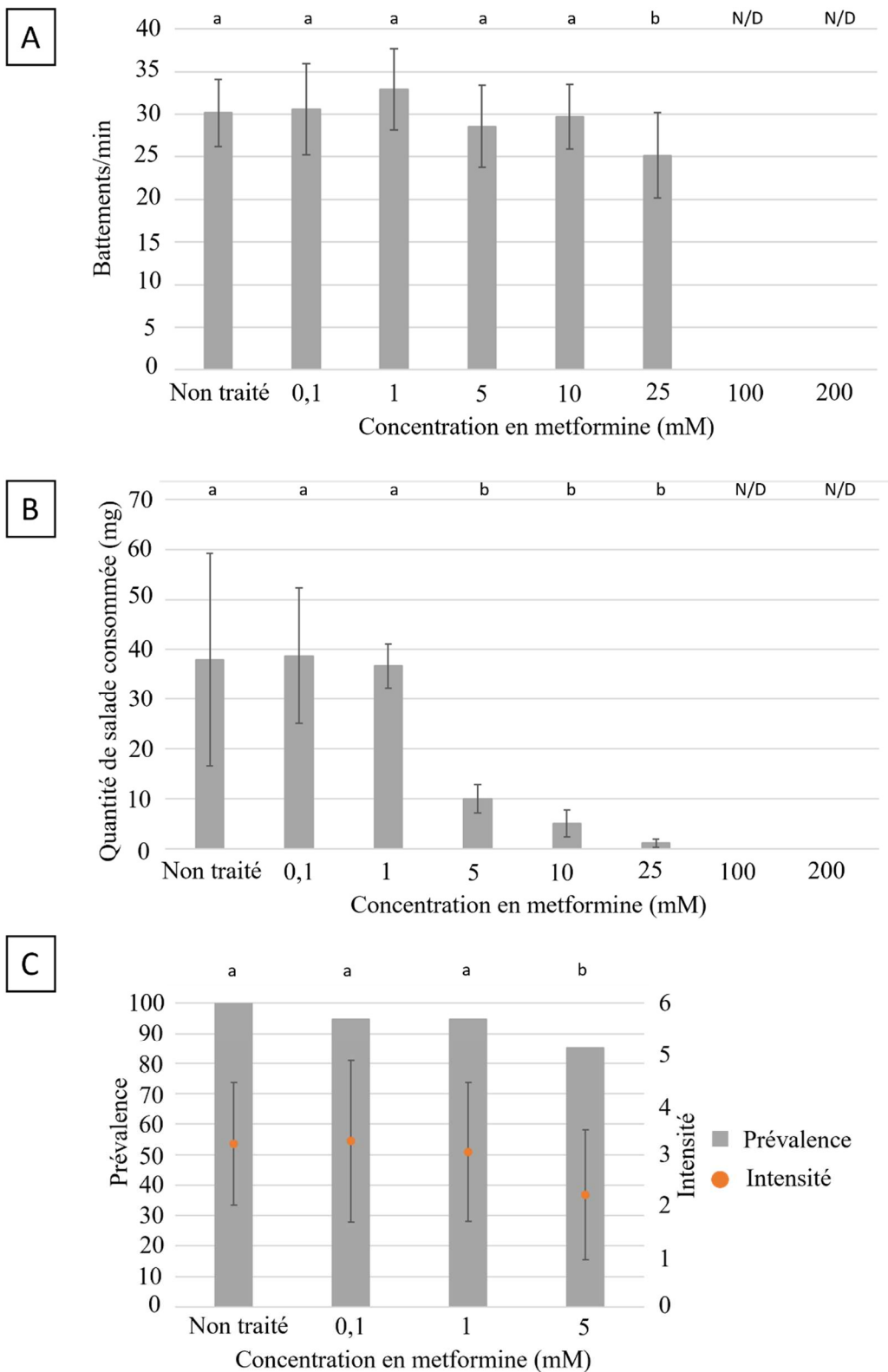


Figure 30: Représentation graphique des données de trait de vie des mollusques et parasites soumis à différentes concentrations de metformine. A : Mesure de la fréquence cardiaque en battements de cœur par minute de *B. glabrata* exposé ou non à différentes concentrations de metformine. Tests statistiques: Kruskal-Wallis ( $KW = 26.898$ ;  $DF = 5$ ,  $P\text{-value} = 0.00006$ ), test post-hoc : Dunn test ajusté par Benjamini-Hochberg FDR. B : Mesure de la quantité en mg de salade consommée par *B. glabrata* exposé ou non à différentes concentrations de metformine. Tests statistiques: Kruskal-wallis ( $KW = 19.183$ ,  $DF = 5$ ,  $P\text{-value} = 0.0017$ ), test post-hoc: Dunn test ajusté par Benjamini-Hochberg FDR. C : Mesure de la prévalence et de l'intensité de l'infestation de *B. glabrata* par *S. mansoni* exposé ou non à différentes concentrations de metformine. Test statistique exact de Fisher  $P\text{-value} < 0.05$  Les lettres différentes entre échantillons correspondent à des différences significatives, une même lettre signifie qu'il n'existe pas de différence significative entre les échantillons. N/D : Non déterminé.

## ***ii. Action de la metformine sur le métabolisme de B. glabrata***

Parmi la centaine de métabolites spécifiques choisis pour l'analyse globale de la réponse de *B. glabrata* à différentes concentrations de metformine, nous avons détecté 58 d'entre eux dans l'hémolymphe des escargots (Figure 31A). Grâce à ces analyses, nous pouvons voir que dès 0.1 mM de metformine, le métabolisme de *B. glabrata* est affecté. Mais ce type d'analyse ne nous permet pas avec certitude de savoir si nous avons été capables de cibler le complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries. La condition à 5 mM de metformine semble avoir un effet très différent, voire antagoniste, comparée aux autres conditions (0.1 et 1 mM) sur le métabolisme des escargots. La spermine, la xanthine ou encore la putrescine, par exemple, montrent des patterns d'accumulation dans l'hémolymphe très différents de ceux observés pour les concentrations moins élevées. Nous avons déjà démontré, avec les tests de toxicité, que l'utilisation de la metformine à cette concentration induisait des modifications significatives sur tous les traits de vie étudiés chez *B. glabrata*, ainsi, il n'est pas étonnant de voir un effet accru sur le métabolisme. Cela vient renforcer l'impossibilité d'utiliser cette drogue, à cette concentration, pour les expériences de validation fonctionnelles. En contrepartie, les mollusques traités avec une concentration à 1 mM ne semblent pas réagir phénotypiquement (traits de vie), mais réagissent au niveau métabolique, permettant de différencier les échantillons traités des naïfs (Figure 31C). Nous pouvons remarquer que l'organisme entier compense cette perturbation du métabolisme par l'induction de possibles autres voies métaboliques, comme la voie de l'urée, du cycle du TCA ou encore la voie de la créatine/créatinine (Figure 31B). Mais le plus important, est la présence, en quantité un peu plus élevée, de lactate dans les échantillons traités à la metformine, suggérant alors une induction de la voie de la glycolyse anaérobie.

Même si les voies métaboliques affectées par la metformine ne sont pas exclusivement celles que nous attendions, il est nécessaire de tester l'effet de cette drogue dans le cadre d'une validation fonctionnelle. Cette dernière permet d'induire chimiquement la glycolyse et peut, éventuellement, déclencher certains mécanismes de la MII. Deux durées (3 jours et 10 jours) de mise en contact des mollusques avec la drogue ont été choisies, afin de mesurer le temps nécessaire aux organismes de mettre en place certains mécanismes de mémoire immunitaire. Nous savons que la MII, en condition normale d'infestation, met entre 7 à 10 jours pour se mettre en place chez *B. glabrata*, et que les modifications métaboliques, suite à la primo infestation, durent 4 jours (Sire *et al.*, 1998; Pichon *et al.*, 2023). C'est pourquoi nos expériences n'ont pas dépassé les 10 jours de contact avec la drogue.

Enfin, la metformine n'a pas permis de démontrer une quelconque protection des escargots face à une infestation par *S. mansoni* (Figure 32), mais au contraire, la prévalence de l'infestation aurait tendance (non significative) à augmenter après 10 jours de traitement. Cette observation pourrait suggérer une influence plutôt positive, de la metformine, sur la susceptibilité du mollusque à l'infestation. Autrement dit, cette drogue n'aurait que pour conséquence de, soit perturber assez le mollusque pour que le parasite en tire avantage et infeste plus facilement son hôte, soit qu'elle n'a tout simplement aucun effet significatif sur le métabolisme de *B. glabrata* et sa capacité de réponse aux parasites. Mais la seule façon, de prouver ces nouvelles hypothèses, serait de refaire ces expériences avec des infestations monomiracidial avec SmBRE. La prévalence attendue de ce type d'infestation est de l'ordre de 50%, nous pourrions alors savoir si cette drogue a réellement un effet sur l'infestation.

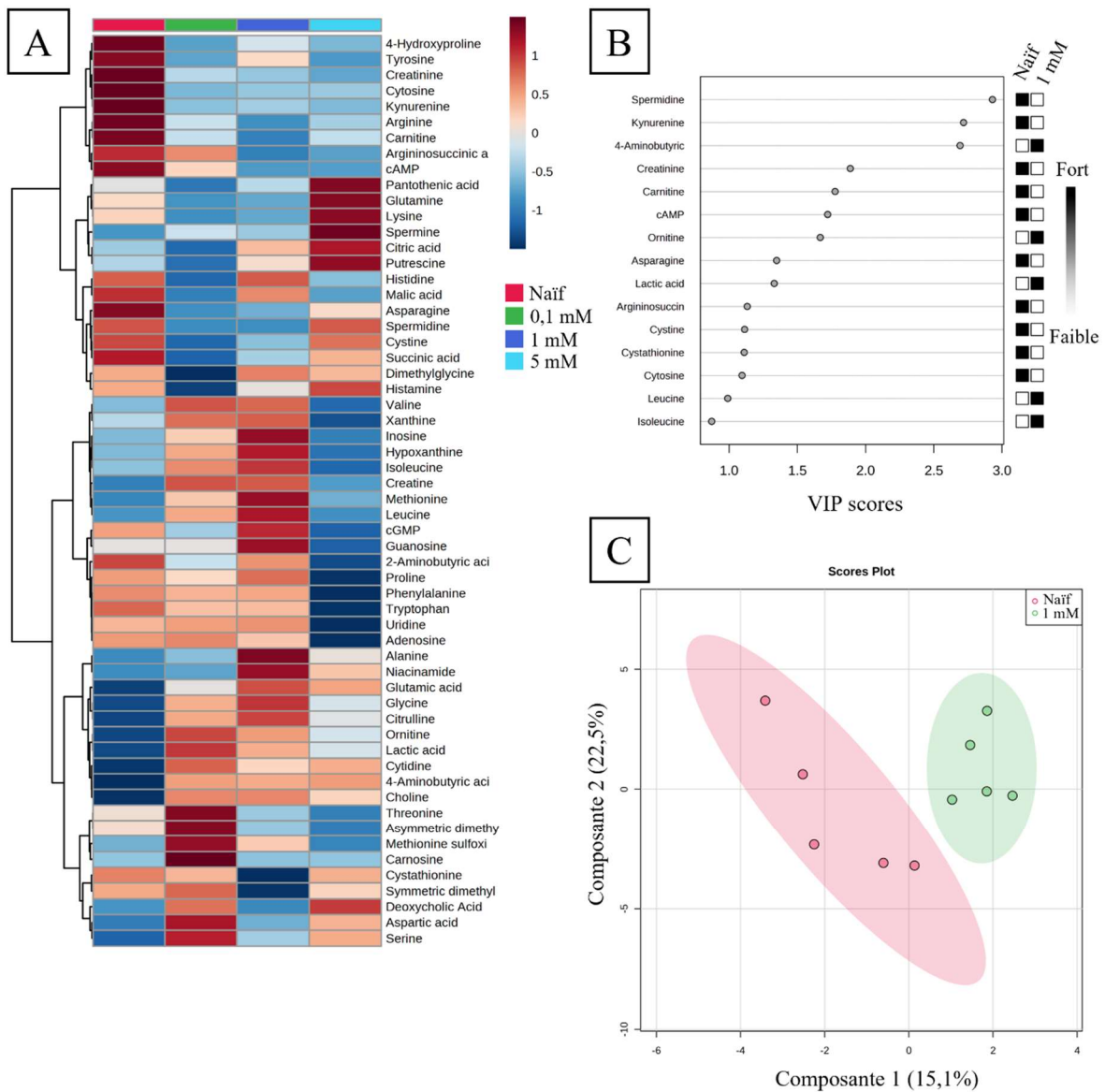


Figure 31: Analyses métabolomiques ciblant une centaine de métabolites spécifiques (58 détectés dans les échantillons testés). A : « Heatmap » représentant dans un gradient de bleu et rouge, la quantité moyenne (de tous les réplicas) de chaque métabolite en fonction de chaque condition de traitement par la metformine. B : Comparaison entre les conditions naïves (sans drogue) et à 1 mM de metformine des 15 premiers métabolites ayant le meilleur (>1) score VIP (Variable Importance in the Projection) basé sur le modèle PLS-DA. Les cases blanches et noires représentent le ratio d'abondance (élevé et faible) pour le métabolite correspondant à une condition spécifique. C : Analyse PLS-DA. Graphique de regroupement de score PLS-DA pour la comparaison des 58 métabolites provenant des conditions de traitement (vert) et contrôle (rouge), regroupant 5 réplicas par condition (points de couleur). Les cercles colorés représentent 95% d'intervalle de confiance.



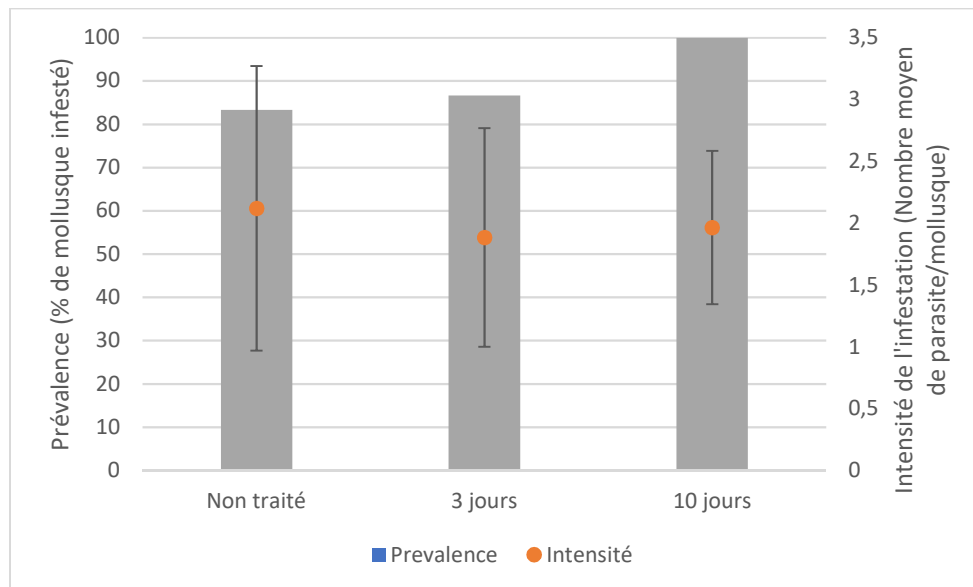


Figure 32: Diagramme en barre représentant en gris la prévalence de l'infestation et en orange (point) l'intensité de l'infestation (nombre de sporocyste I moyen par mollusque) en fonction des deux temps de mise en contact avec la drogue ainsi que le contrôle non traité.

### **iii. Action du 2-DG et de l'oxamate sur les traits de vie de *B. glabrata***

Les tests de toxicité, de l'oxamate et du 2-DG, n'ont pu être, à ce jour, réalisés que sur les mollusques (*BgBRE*). De façon surprenante, les deux traits de vie étudiés (rythme cardiaque et consommation de salade) montrent des patterns de réponse inversés entre les deux drogues utilisées. D'un côté, le 2-DG, induit une chute significative du rythme cardiaque des mollusques à partir d'une concentration en drogue à 10 mM (Figure 33A). Alors que d'un autre côté, l'impact de l'oxamate, sur les mollusques, aurait plutôt tendance à faire augmenter leur rythme cardiaque à partir de 10 mM (Figure 34A). En ce qui concerne le pourcentage de nourriture consommée, les deux drogues ont un impact négatif sur la consommation à partir de 5mM (Figure 33B et Figure 34B).

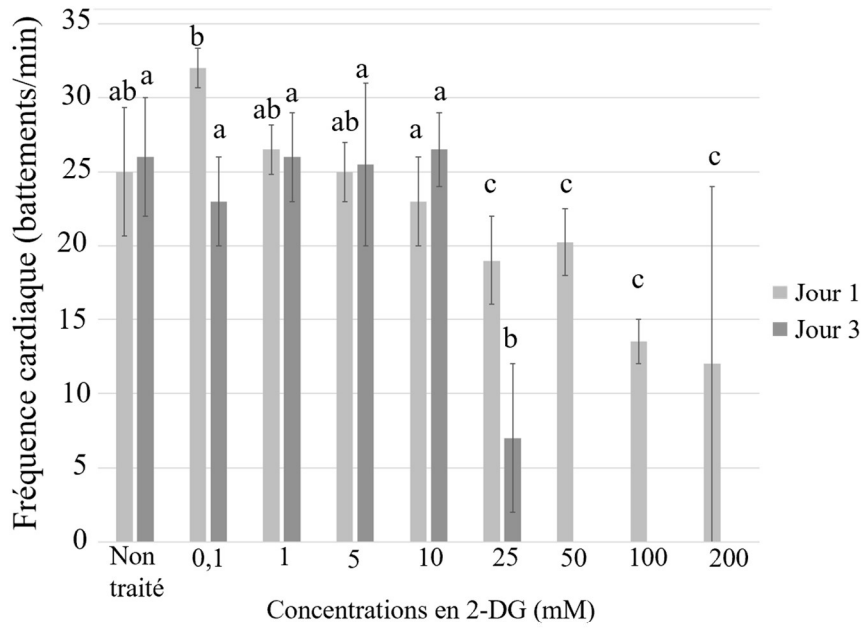
Le nombre de répliques biologiques n'est certes pas assez important pour réaliser des statistiques robustes sur la consommation de nourriture. Cependant, grâce à ces mesures, nous pouvons déterminer les seuils de concentration de drogues induisant un effet délétère sur un paramètre vital des mollusques. Mais surtout, couplés à la fréquence cardiaque, ces paramètres nous donnent les concentrations maximales de drogues que nous pourrions utiliser sur une période de 10 jours, probablement nécessaire au blocage de la MII. Ainsi, les concentrations létales de drogues sont atteintes à 50 mM pour le 2-DG et à 10 mM pour l'oxamate, chez certains mollusques, à cette concentration (Figure 34B).

Nous pouvons également constater qu'à partir de 1 mM, les mollusques du groupe 2-DG, cessent de se nourrir dès le premier jour d'exposition à la drogue, mais retrouvent une consommation de salade identique, au groupe contrôle sans drogue, au bout de 3 jours d'exposition (Figure 33B). A 5 mM d'exposition au 2-DG, la consommation de nourriture chute pendant les 3 jours d'exposition, montrant encore une fois la toxicité de cette drogue au-delà de cette concentration.

En ce qui concerne l'oxamate, cette drogue a un effet sur la consommation de nourriture des mollusques dès une concentration à 1 mM (Figure 34B). Les données restent extrêmement variables entre les réplicas expérimentaux, cependant, nous pouvons noter une tendance à la baisse de consommation de salade dès le 2<sup>ème</sup> jour d'exposition. A partir de 5 mM, nous constatons une forte diminution de la consommation de salade toujours dès le 2<sup>ème</sup> jour.

Finalement, pour ces deux drogues, nous avons pu mesurer un effet délétère sur les mollusques lorsque nous utilisons une concentration supérieure ou égale à 5 mM. Cependant, cette concentration n'entraîne pas la mort des mollusques, et ces derniers peuvent survivre plusieurs jours dans la drogue. Ainsi, la concentration optimale de chacune de ces drogues pourrait être de 1 mM. Seul l'oxamate nécessiterait de refaire l'expérience, car les différences entre les replicas, pour la consommation de nourriture, sont bien trop importantes pour déterminer avec certitude un effet délétère de cette drogue à 1 mM, étant donné qu'il n'y a pas de différences de fréquence cardiaque pour cette même concentration.

A



B

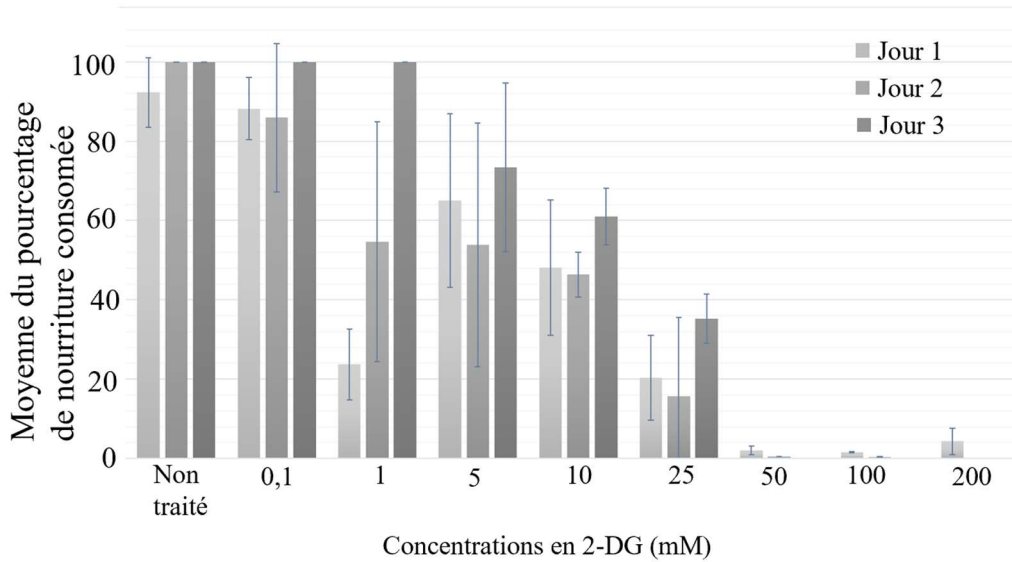


Figure 33: Résultats des mesures de traits de vie. A : Mesure du rythme cardiaque des mollusques traités à différentes concentrations de 2-DG. B : Mesure du pourcentage moyen de salade consommée par les mollusques traités à différentes concentrations de 2-DG. Les lettres différentes entre échantillons correspondent à des différences significatives, une même lettre signifie qu'il n'existe pas de différence significative entre les échantillons. Tests statistiques : Kruskal-Wallis ( $P$ -value < 0.05, test post-hoc : Dunn test ajusté par Benjamini-Hochberg FDR).

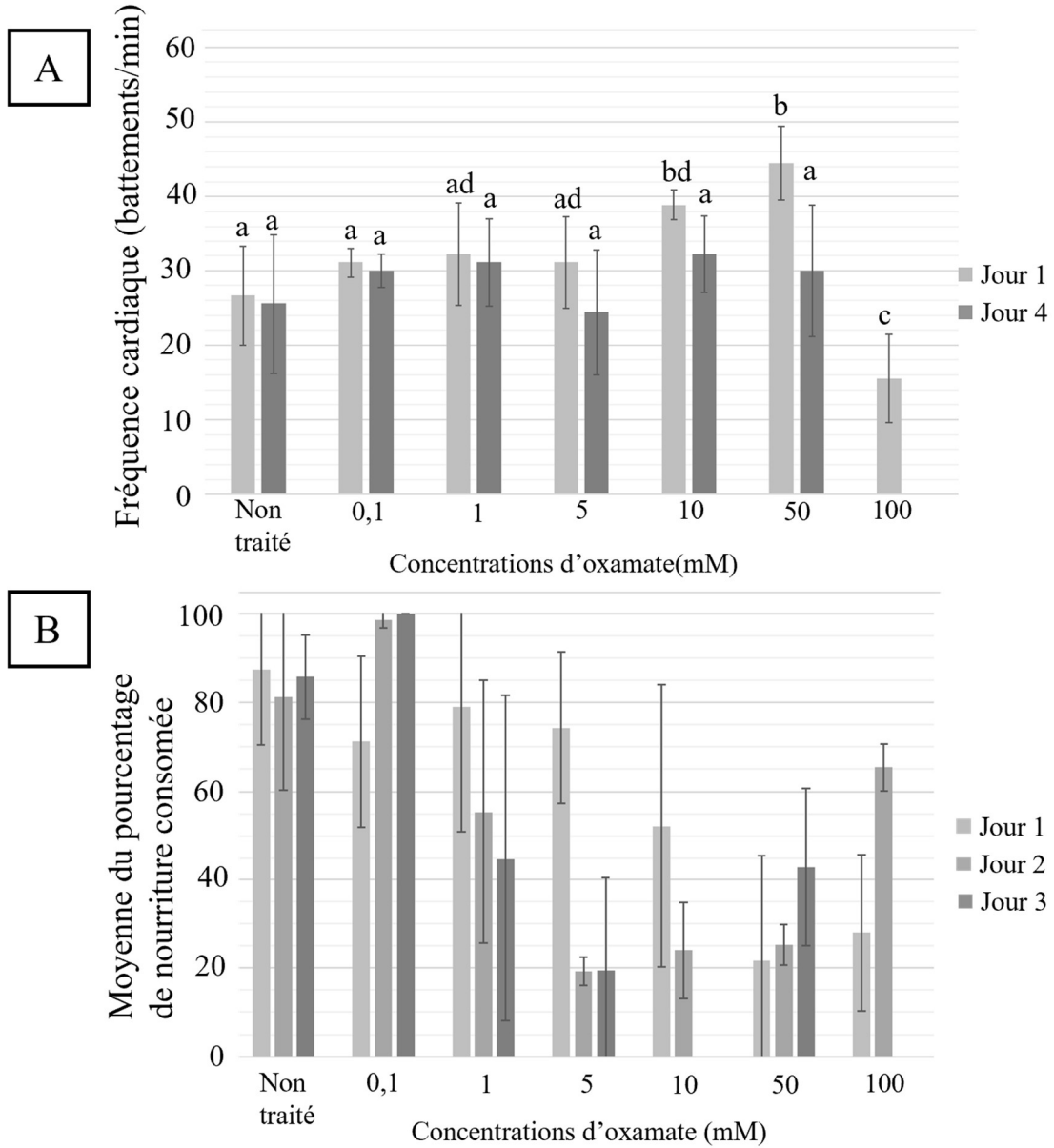


Figure 34: Résultats des mesures de traits de vie. A : Mesure du rythme cardiaque des mollusques traités à différentes concentrations d'oxamate. B : Mesure du pourcentage moyen de salade consommée par les mollusques traités à différentes concentrations d'oxamate. Les lettres différentes entre échantillons correspondent à des différences significatives, une même lettre signifie qu'il n'existe pas de différence significative entre les échantillons. Tests statistiques : Kruskal-Wallis ( $P$ -value < 0.05, test post-hoc : Dunn test ajusté par Benjamini-Hochberg FDR).

#### ***iv. Action de l'oxamate et du 2-DG sur le métabolisme de B. glabrata***

La concentration de travail (1 mM) étant choisie pour les deux drogues, il nous est, maintenant, indispensable de savoir si cette concentration est suffisante pour induire les changements métaboliques que nous souhaitons. Le choix s'est donc porté sur la mesure de l'impact des concentrations à 1 mM et à 5 mM sur le métabolisme général (analyse « globale » des métabolites) des mollusques BgBRE.

Parmi les 102 métabolites spécifiques ciblés, pour l'analyse globale de la réponse de *B. glabrata* à différentes concentrations de 2-DG et d'oxamate (1 mM et 5 mM), 43 ont pu être détectés et quantifiés dans l'hémolymphe de BgBRE (Figure 35A et Figure 36A). L'analyse de score PLS-DA, sur les deux premières composantes, montre que ces drogues peuvent modifier l'état métabolique général des escargots. Pour le 2-DG, nous avons une séparation pour chacun des groupes (contrôle et traités avec la drogue) (Figure 35B). Pour l'oxamate, le métabolisme des mollusques traités avec 1 mM de drogue semble très proche de celui des mollusques contrôles, alors que la condition à 5 mM se démarque des deux autres groupes (Figure 36B).

Concernant le 2-DG, les principaux métabolites touchés par cette drogue (Figure 35C) sont des acides aminés en lien probable avec la néoglucogénèse (acide aspartique), avec la voie du glutamate et du pyruvate (alanine) ou une partie du cycle du TCA (aspartate). D'autres métabolismes sont possiblement touchés (non significatif), comme le métabolisme du glucose en général, par l'accumulation de carnitine et de ses dérivés (acétyl-carnitine, méthionine) ou encore avec le cycle de l'urée (citrulline, ornithine, acide orotique, putrescine). Tous ces métabolites se retrouvent plutôt augmentés chez les individus traités avec 1 mM de 2-DG et très fortement représentés dans le groupe traité à 5 mM. Les métabolites, que nous retrouvons sous accumulés dans les deux groupes traités, sont plutôt associés au cycle du TCA, montrant une réduction ou un arrêt du cycle de TCA, ce qui a été démontré dans des cellules de vertébrés (Wang *et al.*, 2015).

Concernant l'oxamate (Figure 36A), à 5 mM, la majorité des métabolites détectés se retrouvent en plus faible quantité par rapport au groupe contrôle (Figure 36A et C). Le métabolisme de l'urée semble aussi être perturbé par cette drogue, avec l'augmentation de métabolites spécifiques à cette voie (putrescine, ornithine, citrulline), comme pour le groupe traité avec le 2-DG. Pour le groupe d'escargots traités à 1 mM d'oxamate, nous trouvons un pattern de concentrations des métabolites inversé par rapport au groupe traité à 5 mM. Les métabolites en lien avec le cycle du TCA ont une concentration élevée, alors que les métabolites

en lien avec le cycle de l'urée sont, eux, en plus basse concentration (toujours comparée avec la condition traitée à 5 mM de drogue). Ce type de réponse a déjà été vu dans des modèles vertébrés, où le blocage de transformation du pyruvate en lactate provoque une accumulation de pyruvate alimentant ainsi le cycle du TCA (Lu *et al.*, 2015). Cependant, bien que l'effet de cette drogue ait un impact fort sur les traits de vie des mollusques, peu de métabolites se retrouvent statistiquement différents dans les conditions traitées comparées à la condition non traitée. Seules les voies des acides gras (carnitine), du glutamate et pyruvate (alanine) semblent significativement touchées par cette drogue à 1mM (Figure 36C).

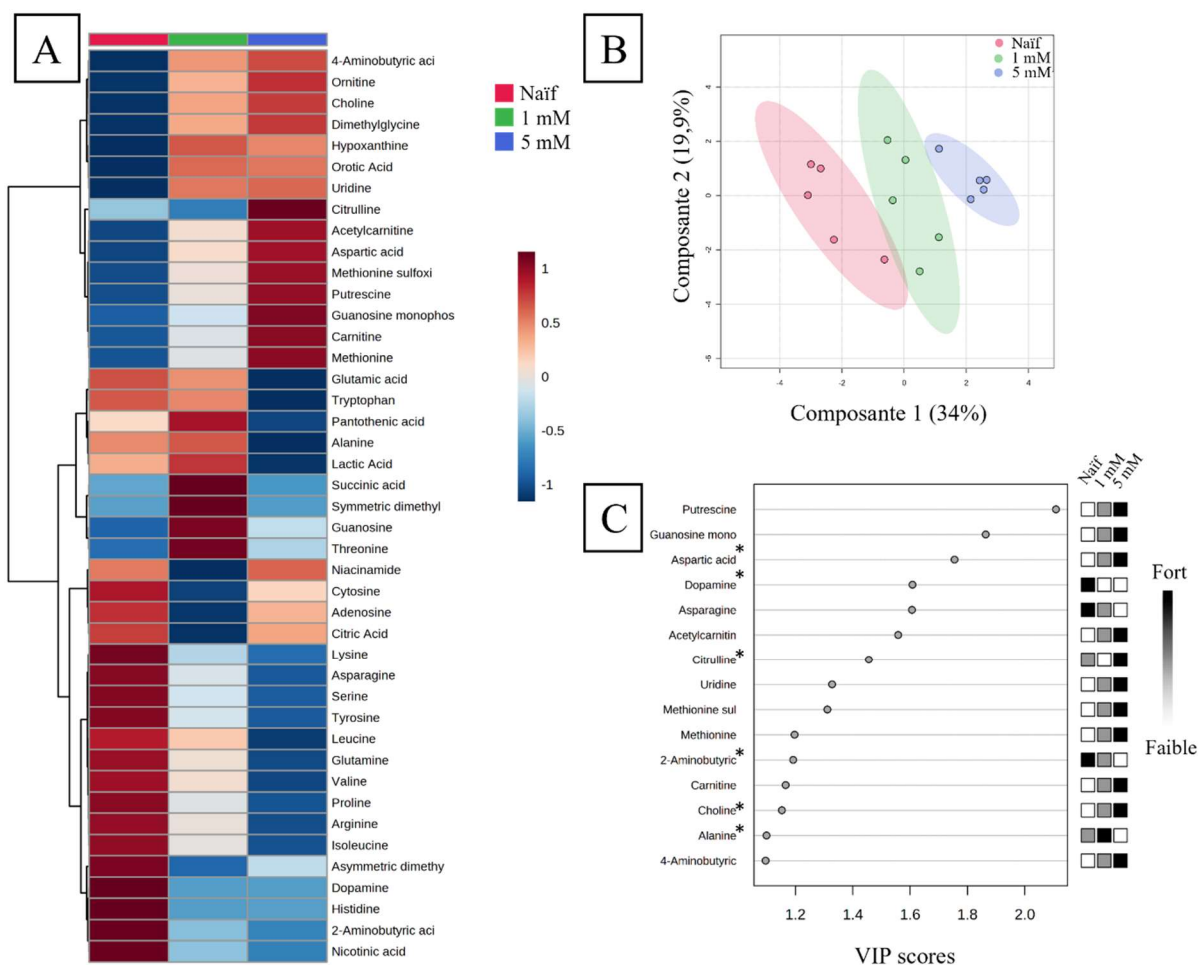


Figure 35: Analyses métabolomiques ciblant une centaine de métabolites spécifiques (43 détectés dans les échantillons testés). A : Heatmap représentant dans un gradient de bleu et rouge, la quantité moyenne (de tous les réplicas) de chaque métabolite en fonction de chaque condition de traitement par le 2-DG. B : Analyse PLS-DA. Graphique de regroupement de score PLS-DA pour la comparaison des 43 métabolites provenant de chaque condition de traitement (vert et bleu) et de la condition non traitées (rouge), regroupant 5 réplicas par condition (points de couleur). Les cercles colorés représentent 95% d'intervalle de confiance. C : Comparaison entre les conditions non traitées et traitées au 2-DG des 15 premiers métabolites ayant le meilleur (>1) score VIP (Variable Importance in the Projection) basé sur le modèle PLS-DA. Les cases blanches et noires représentent le ratio d'abondance (élevé et faible) pour le métabolite correspondant dans une condition spécifique. \* : métabolite significativement différent pour les conditions 1mM et 5mM comparées à la condition non traitée (Naïf) par un test ANOVA ( $FDR < 0.05$ ) et un test post hoc de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher ( $P$ -value  $< 0.05$ ).

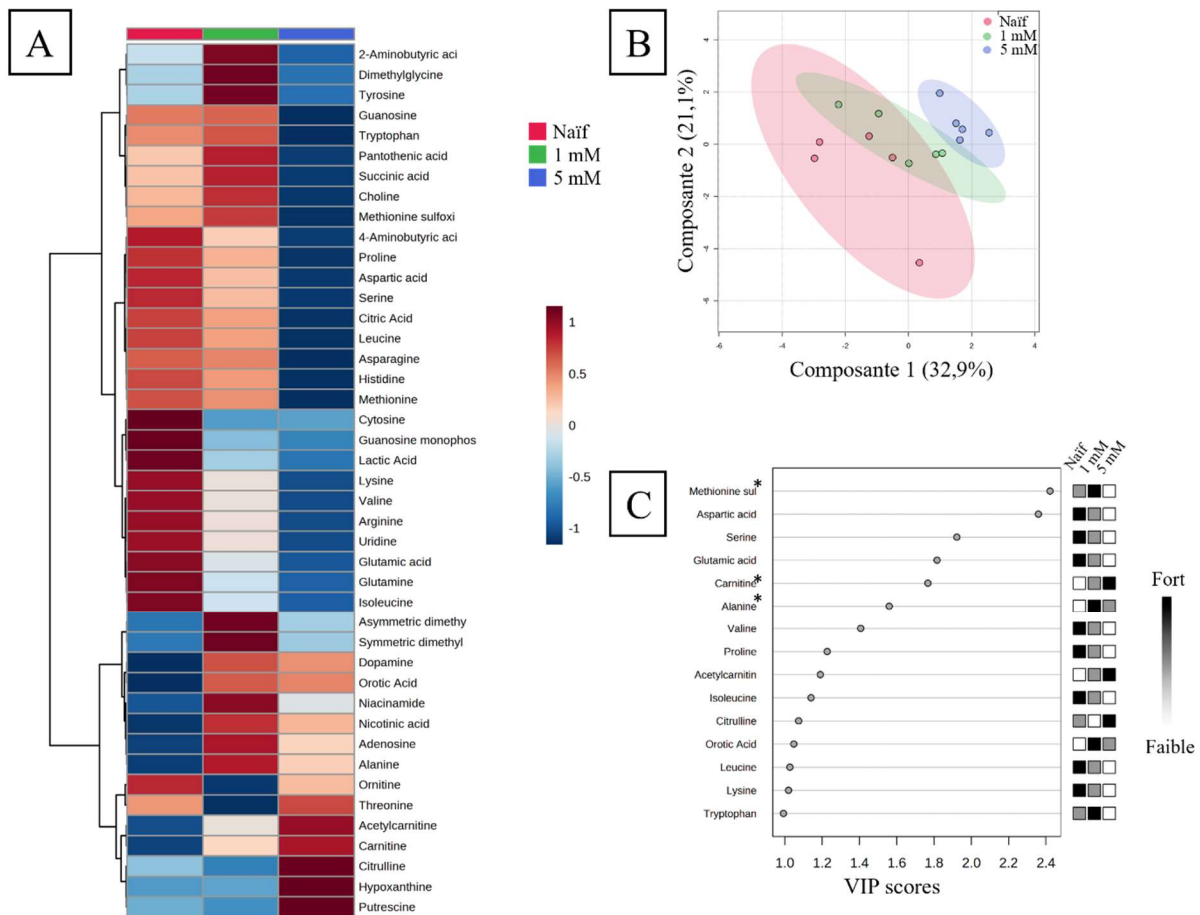


Figure 36: Analyses métabolomiques ciblant une centaine de métabolites spécifiques (43 détectés dans les échantillons testés). A : Heatmap représentant dans un gradient de bleu et rouge, la quantité moyenne (de tous les réplicas) de chaque métabolite en fonction de chaque condition de traitement par l'oxamate. B : Analyse PLS-DA. Graphique de regroupement de score PLS-DA pour la comparaison des 43 métabolites provenant des deux conditions de traitement (vert et bleu) et de la condition non traitées (rouge), regroupant 5 réplicas par condition (points de couleur). Les cercles colorés représentent 95% d'intervalle de confiance. C : Comparaison entre les conditions non traitées et traitées à l'oxamate (D) des 15 premiers métabolites ayant le meilleur ( $>1$ ) score VIP (Variable Importance in the Projection) basé sur le modèle PLS-DA. Les cases blanches et noires représentent le ratio d'abondance (élevé et faible) pour le métabolite correspondant dans une condition spécifique. \* : métabolite significativement différent pour les conditions 1mM et 5mM comparées à la condition non traitée (Naïf) par un test ANOVA ( $FDR < 0.05$ ) et un test post hoc de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher ( $P\text{-value} < 0.05$ ).

#### 4. Conclusion et perspectives

Grâce à ces différentes expériences, nous avons pu montrer, dans un premier temps, qu'il est possible d'utiliser des drogues ciblant des voies métaboliques sur *B. glabrata* et d'en déterminer les seuils de toxicité pour chacune d'entre elles. Et dans un deuxième temps, grâce aux analyses de métabolomiques ciblées, nous avons défini les modifications générales du métabolisme induit par chacune de ces drogues.

L'utilisation de certaines drogues, comme la metformine pour induire chimiquement une meilleure résistance au parasite *S. mansoni*, semble trop complexe à mettre en place. Cette drogue est, apparemment, impliquée dans la production de lactate dans l'organisme, et elle favoriserait la voie de la glycolyse en agissant comme un inhibiteur de la voie de l'OxPhos. Le

fait d'intervenir chimiquement sur ces voies, avec cette drogue, semble perturber plus profondément le métabolisme énergétique des escargots et, à l'inverse du phénotype attendu, semble n'avoir aucun effet, voire même favoriserait l'infestation par le parasite.

Concernant les drogues ciblant la voie de la glycolyse, l'utilisation de ces drogues s'est révélée concluante. Avec le 2-DG ou l'oxamate, nous sommes capables de perturber le métabolisme de *B. glabrata*, sans induire chez l'escargot d'effets toxiques délétères. Les mollusques, à la suite des concentrations de drogues utilisées, continuent de se nourrir normalement et de garder un rythme cardiaque « normal ». L'acide lactique, considéré comme un marqueur clé de l'activation de la glycolyse anaérobie et de la mise en place de l'effet Warburg durant la MII, a une tendance à la baisse chez les groupes de mollusques traités avec les deux concentrations d'oxamate. Ce résultat est attendu, du fait de l'action de cette drogue sur la lactate déshydrogénase et par conséquent sur le blocage de la transformation du pyruvate en lactate. Les escargots semblent préférentiellement activer la voie des acides gras (accumulation significative de carnitine) pour compenser cette perte de production d'énergie. En revanche, aucune modification du lactate n'est détectée pour le groupe 2-DG. Cependant, le cycle du TCA est potentiellement touché par l'action de cette drogue, ce qui empêcherait l'accumulation des métabolites nécessaires aux changements épigénétiques de la MII.

Finalement, toutes ces expériences utilisant les drogues du métabolisme sont faites sur les mollusques entiers. Nous avons une certaine difficulté à tirer des conclusions précises sur l'action de ces drogues, étant donné qu'on touche l'intégralité de l'organisme. Il faut avoir en tête que tous les organes pourraient ne pas réagir de la même manière à chacune de ces drogues. Nous arrivons tout de même à toucher les voies ciblées, ce qui nous permet, par la suite, de réaliser les expériences de validation fonctionnelle par l'utilisation de ces drogues au cours d'une expérience d'acquisition de la MII chez *B. glabrata* en réponse à *S. mansoni*. Si nous souhaitons évaluer cette acquisition de la MII dans les hémocytes, et donc valider précisément dans ces cellules le rôle du métabolisme, il nous faut, soit utiliser ces drogues directement sur des hémocytes en culture, soit les récupérer pour les analyser en métabolomique.





## Discussion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse auront permis de montrer, une nouvelle fois, la grande complexité du système immunitaire inné des invertébrés, et surtout les probables liens évolutifs qui unissent ce système avec celui décrit chez les vertébrés. Cela remet en partie en cause cette dichotomie artificielle qui consiste à séparer l'immunité de vertébrés de celle de non-vertébrés. L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse a été compilé dans la figure 37, afin d'avoir une vision intégrée et complète des processus moléculaires et cellulaires que nous considérons comme essentiels à l'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez le gastéropode *Biomphalaria glabrata*.

La MII, ou le « priming » immunitaire inné, chez *B. glabrata* avait été démontré, jusqu'à encore récemment, exclusivement par des approches de démonstrations expérimentales phénoménologiques. Les premiers travaux réalisés par Sire et ses collaborateurs (Sire *et al.*, 1998) avaient décrit ce phénomène d'acquisition de la mémoire immunologique, chez *B. glabrata*, comme une acquisition progressive (7 à 10 jours) suite à une primo infestation par le parasite *S. mansoni*. Cette résistance se caractérise par une impossibilité, pour des souches de parasites proches de celles utilisées en primo infestation, de ré-infester le mollusque (Portela *et al.*, 2013). Les études des mécanismes d'acquisition de la mémoire immunologique ont montré que le basculement d'une immunité cellulaire portée par les hémocytes (à la suite de la primo infestation) à une immunité humorale portée par des compartiments cellulaires encore inconnus (à la suite du challenge), était aussi soutenu par de profonds changements de l'expression des gènes (Pinaud *et al.*, 2016). Le « shift » immunitaire porté par un « shift » transcriptomique, caractérisant la réponse du mollusque après un challenge, est la marque de la réponse mémoire du système immunitaire inné chez *B. glabrata* en réponse à *S. mansoni* (Coustau *et al.*, 2016; Pinaud *et al.*, 2016).

### **A. La réponse moléculaire globale des hémocytes de *B. glabrata***

Ces travaux de thèse se sont focalisés, dans un premier temps, sur la recherche du compartiment cellulaire capable de porter la MII chez *B. glabrata*. Les cellules immunitaires du mollusque, les hémocytes, sont bien sûr, du fait de leur implication lors de la réponse de primo infestation et de leur rôle majeur dans la réponse immunitaire générale chez le mollusque, les candidats tout trouvés pour l'étude de la MII chez *B. glabrata*. De plus, nous avons pu montrer que le nombre de ces cellules augmente, à la fois en réponse à la primo infestation,

mais aussi en réponse au challenge, malgré une réponse exclusivement humorale à ces temps de la cinétique (Pichon *et al.*, 2023). Nous nous sommes donc focalisés sur ce compartiment cellulaire particulier, et grâce à des approches de transcriptomique massive, nous avons démontré que ces hémocytes étaient capables de porter une mémoire immunologique, principalement en exprimant l' « immune shift » porté par une reprogrammation transcriptionnelle qui est caractéristique de ce mollusque (Pichon *et al.*, 2023). Ce « shift » transcriptomique définit majoritairement la réponse après challenge dans les hémocytes. Nous avons aussi pu montrer qu'un autre pattern de réponse immunitaire se faisait en même temps que la réponse des hémocytes (Cf. Introduction §B.6.), comme la réponse maintenue (« sustained »), composée de gènes principalement exprimés tardivement à la suite de la primo infestation mais qui perdurent après le challenge. Le caractère massif de la réponse des hémocytes montre indéniablement que ces cellules immunitaires jouent un rôle majeur dans la réponse de MII après challenge. Les gènes exprimés par ces hémocytes, lors de la MII, permettent de mieux comprendre l'origine probable des composés humoraux qui ont été caractérisés dans l'hémolymphe des escargots, suite au challenge (Sire *et al.*, 1998; Pinaud *et al.*, 2016). Nous retrouvons, exprimés par les hémocytes après challenge, les gènes codants pour des protéines, maintenant bien connues dans la réponse immunitaire contre *S. mansoni*, comme diverses molécules de reconnaissance (FREPs, TEPs etc.) (Portet *et al.*, 2017; Duval *et al.*, 2020) ou encore des effecteurs cytotoxiques comme la biomphalysine, possédant une grande toxicité contre les sporocystes (Galinier *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2021). Si les gènes clés de la réponse ont pu être caractérisés, qu'en est-il des mécanismes d'acquisition de cette MII ?

### ***B. Les mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée***

Ainsi, dans un deuxième temps, nous avons cherché à définir et caractériser les mécanismes qui permettent aux hémocytes d'enregistrer, de stocker et d'activer à bon escient la MII lors de rencontres successives du parasite *S. mansoni*. L'acquisition progressive de cette réponse immunitaire mémoire (7 à 10 jours), le changement drastique des mécanismes de réponse immunitaire (cellulaire à humorale), ainsi que la rapidité de réponse après challenge (moins de 24h), induisant des milliers de gènes spécifiquement à ce moment-là (« shift » transcriptomique), montrent que des changements moléculaires profonds se sont produits chez les hémocytes. Ces changements doivent alors avoir lieu avant la seconde rencontre avec le parasite, afin de préparer l'animal à répondre de façon efficace à une nouvelle rencontre avec

le pathogène. Ainsi, avec une séquence d'ADN et une stimulation identique (infestation par *S. mansoni*), les hémocytes de *B. glabrata* sont capables d'avoir un comportement de réponse différent, en fonction d'une primo infestation ou d'un challenge. Un des mécanismes qui serait alors capable de permettre ce phénomène dans ces cellules, pourrait être basé sur des changements épigénétiques. Cette piste épigénétique a déjà été explorée, notamment chez certaines autres espèces d'invertébrés comme chez *Tribolium castaneum* et *Galleria mellonella*, dans un contexte de transmission du priming immunitaire intergénérationnel (Vilcinskas, 2016; Tetreau et al., 2019). Mais plus particulièrement, un grand nombre de travaux ont été menés sur les organismes vertébrés, où une mémoire immunitaire proche de celle que l'on retrouve chez les invertébrés a été récemment caractérisée, la « trained immunity » ou immunité entraînée (Netea & van der Meer, 2017). Et le plus important, c'est que dans ces modèles vertébrés, les modifications épigénétiques jouent un rôle primordial dans l'acquisition de l'immunité entraînée. Chez les cellules dendritiques, les monocytes, ou encore les macrophages par exemple, nous constatons une augmentation de la méthylation et de l'acétylation des histones, dans des régions contenant des promoteurs de gènes immunitaires, permettant à ces cellules de répondre plus efficacement à une seconde rencontre avec des pathogènes (Chen *et al.*, 2020; Domínguez-Andrés *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2022). De plus, toujours dans les modèles vertébrés, il a été montré que ces changements épigénétiques étaient associés à des changements métaboliques particuliers. Les cellules, à la suite d'une première rencontre avec le pathogène, voient leur production d'énergie basculer de la voie de l'oxydation phosphorylative vers la voie de la glycolyse. Ce basculement métabolique est montré comme primordial, dans un premier temps, afin de fournir rapidement l'énergie nécessaire aux cellules pour répondre plus rapidement et plus fortement à une rencontre avec des pathogènes. Mais dans un deuxième temps, ce basculement vers la glycolyse permet l'accumulation de métabolites clés, notamment du cycle du TCA. Certains de ces métabolites sont connus et définis comme ayant un rôle de cofacteur de certaines enzymes impliquées dans les changements épigénétiques que nous avons cités plus haut, et donc le métabolisme fait partie des mécanismes d'acquisition d'une mémoire immunologique et de la « trained immunity » chez les vertébrés (Cheng *et al.*, 2014; Arts, Carvalho, *et al.*, 2016; Arts, Joosten, *et al.*, 2016; Riksen & Netea, 2020).

Mais finalement, ce type de mémoire immunitaire n'est pas identique à la réponse immunitaire mémoire ou « immune priming » que nous avons décelée chez *B. glabrata*. En effet, la mémoire entraînée, d'un point de vue phénotypique, produit une réponse immunitaire mémoire non spécifique. La spécificité vient plus tard avec la mise en place de l'immunité

adaptative médiée par les anticorps. Alors que pour *B. glabrata*, la réponse de mémoire immunitaire innée est très spécifique, et permet même de différencier jusqu'à la souche de parasite utilisée lors de la primo stimulation, voire même le stade parasitaire (Portela *et al.*, 2013). De plus, la majorité de la réponse transcriptomique des hémocytes se produit après le challenge, du fait de l'immunosuppression induite par le parasite. On n'observe finalement que peu de gènes capables de s'induire en réponse à la primo-infestation (Pinaud *et al.*, 2019). Il est intéressant de noter que certains mécanismes moléculaires, et en particulier les modifications épigénétiques, pourraient aussi être à la base de l'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata*.

### ***C. L'épigénétique et le métabolisme dans l'acquisition de la MII par les hémocytes***

Nous avons donc analysé les résultats produits par deux approches d'analyses de marque épigénétiques sur les hémocytes de *B. glabrata*. La première technique, WGBS (Whole Genome Bisulfite Sequencing) est basée sur des différentiels de méthylation globale des séquences d'ADN des hémocytes de *B. glabrata*, avant et après une primo infestation. Alors que la deuxième technique, ATAC seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high throughput sequencing) est basée sur l'étude des modifications de l'état chromatinien de l'ADN des hémocytes, et mesure des changements d'accessibilité chromatinienne avant et après une primo stimulation, mais aussi après un challenge (Cf. Chapitre I). De façon générale, ce qui ressort de ces analyses c'est, là encore comme chez les vertébrés, la détection de profonds changements épigénétiques, en réponse aux différents statuts d'infestation par *S. mansoni*. Il semblerait que les modifications épigénétiques, et notamment celles de l'état chromatinien, surviennent de façon ciblée au niveau des gènes, et en particulier de leur TSS (« Transcription start site »). En outre, la quasi-totalité des changements épigénétiques observés survient seulement à la suite de la primo infestation, et pas après le challenge. Nous pouvons alors imaginer que dans le modèle *B. glabrata*, la mémoire immunitaire innée pourrait aussi être portée par une reprogrammation épigénétique induite lors de la première rencontre avec le pathogène. Une certaine proportion, (21.6% pour les gènes avec un pattern de “shift” et 35.6% pour les gènes avec un pattern de “sustain”) (Pichon *et al.*, 2023) des gènes qui se trouvent dans des régions où la chromatine est significativement modifiée (ouverte et fermée), est retrouvée en RNA seq et différentiellement régulée après le challenge. Ce résultat montre bien qu'une partie de la réponse, très spécifique après challenge, peut être expliquée par des changements épigénétiques avant ce challenge.

Sur la base des mécanismes de la trained immunity des vertébrés, et soutenus par les résultats de RNA seq, d'ATAC seq et de WGBS, nous avons fait le choix de pousser plus en avant nos recherches sur les aspects métaboliques de cette réponse de mémoire immunitaire innée, puisque dans la trained immunity, les changements métaboliques sont un prérequis indispensable aux changements épigénétiques. Grâce aux approches de métabolomique ciblées, nous avons montré un basculement métabolique similaire à celui observé pour les cellules de l'immunité innée chez les vertébrés (Cheng *et al.*, 2014). Appelé « effet Warburg » pour les cellules cancéreuses (Warburg, 1956), ce même type de basculement de la production d'énergie vers la voie de la glycolyse semble s'opérer dans les hémocytes de *B. glabrata*, en réponse à la primo infestation par *S. mansoni* (Cf. Chapitre I).

#### ***D. Perspective de caractérisation des mécanismes moléculaires de la MII***

Nous avons vu que la reprogrammation épigénétique était très importante dans la mise en place de la mémoire entraînée chez les vertébrés. Cependant, même s'il existe une corrélation très forte entre les infestations par *S. mansoni* et les changements épigénétiques, aucune validation fonctionnelle n'a pu être effectuée pour confirmer le rôle de ces changements dans la MII. De plus, même si nous avons réussi à obtenir de forts taux de correspondance entre les gènes présents dans des régions où des modifications épigénétiques ont lieu à la suite de la primo infestation, et les gènes différentiellement exprimés après challenge, nous n'avons peut-être pas été capables de cibler toutes les marques épigénétiques spécifiques de cellules activées (« primed »). Il serait alors indispensable, pour compléter la caractérisation des mécanismes épigénétiques impliqués dans la MII chez *B. glabrata*, de valider :

1). Le rôle des changements épigénétiques que nous avons déjà caractérisés par l'utilisation de drogues ciblant certaines de ces marques. L'utilisation de telles molécules reste complexe à mettre en œuvre dans un modèle d'étude invertébré, cependant, de premières expériences ont permis de montrer l'activité d'un inhibiteur d'ADN méthyltransferase, la flavavone 1 (Luviano *et al.*, 2021). Cette molécule a montré être capable de réduire la méthylation en 5 méthyl cytosine chez *B. glabrata*, et pourrait donc être utilisée, notamment à la suite d'une primo infestation par *S. mansoni*, afin de perturber les modifications épigénétiques naturelles induites par l'infestation.

2). La poursuite de ces analyses de WGBS et d'ATAC seq, en ajoutant un plus grand nombre de points au cours de la cinétique d'acquisition de la MII. Des temps plus proches de

chaque infestation permettraient de confirmer la cinétique, et la temporalité des modifications épigénétiques. Des temps après challenge permettraient de savoir s'il n'existe pas des modifications, notamment de méthylation de l'ADN, immédiatement en réponse à la seconde infestation, permettant d'expliquer plus précisément la réponse spécifique de ces temps-là.

3). L'implication d'autres marques épigénétiques. En plus des analyses citées précédemment, il serait aussi intéressant de se focaliser plus précisément sur certaines marques épigénétiques, comme la méthylation et l'acétylation des histones (Chip seq), que nous avons vu être des marqueurs fondamentaux des cellules entraînées des vertébrés.

4). Enfin, pour finir, le développement plus poussé des technologies de RNAi (Jiang *et al.*, 2006), de crispr-cas 9 (Du *et al.*, 2021) et de transgénése (Cf. Chapitre III.A.), qui pourraient permettre de cibler précisément certains gènes, et d'invalider des fonctions précises permettant de valider les mécanismes moléculaires sous-jacents de la MII.

De façon similaire, nous pourrions aussi utiliser des drogues capables de cibler certaines voies métaboliques spécifiques chez *B. glabrata*. Nous savons, par les études menées sur les vertébrés, que les modifications épigénétiques vont de pair avec les changements métaboliques dans la réponse immunitaire mémoire entraînée et, plus précisément, le basculement de la production énergétique depuis la voie de l'OxPhos vers la voie de la glycolyse. Ainsi, l'utilisation de drogues du métabolisme permettrait de valider d'une part, l'importance du métabolisme dans la réponse de MII chez *B. glabrata* et, d'autre part, de confirmer le probable lien avec la mise en place de changements épigénétiques aussi dans ce modèle invertébré. Il existe des drogues capables de cibler ces deux voies (O'Neill *et al.*, 2016). Cependant, aucune n'avait été testée sur *B. glabrata*, et encore moins sur les hémocytes. Dans le chapitre III de cette thèse, nous avons axé notre stratégie de recherche exploratoire de modification du métabolisme par l'utilisation de trois drogues particulières, aux effets espérés contraires. Ainsi, l'utilisation de la metformine, dans le but de bloquer la voie de la phosphorylation oxydative et, par effet collatéral, induire une suractivation de la glycolyse, n'a pas fonctionné. C'est pourquoi nous avons, par la suite, changé de stratégie en essayant plutôt de réprimer la voie de la glycolyse, à la suite d'une infestation par *S. mansoni*, qui est supposée avoir activé « naturellement » cette voie. Les deux drogues utilisées, oxamate et 2-DG, ont toutes les deux l'impact recherché sur le métabolisme énergétique des mollusques, et peuvent être actives chez le mollusque, par balnéation, afin de bloquer la voie de la glycolyse des cellules hémocytaires (Cf. Chapitre I.C.). Nous pouvons alors utiliser ces deux drogues pour :

1). Réaliser une validation fonctionnelle du rôle de ce basculement énergétique vers la voie de la glycolyse, dans l'acquisition de la MII, d'un point de vue de l'organisme entier contre le parasite, et ce par des approches d'infestation et de mise en contact des mollusques avec les différentes drogues, afin de bloquer la mise en place de la reprogrammation métabolique (Cf. Chapitre III.B.) en ne ciblant qu'une voie spécifique, ici la glycolyse. De plus, l'utilisation de la technologie SeaHorse reste aussi une option permettant d'enregistrer les changements métaboliques des hémocytes, au cours de cette cinétique d'acquisition de la MII. L'utilisation de cet outil, simplement pour confirmer l'action des drogues sur les hémocytes au cours de cette validation fonctionnelle serait, cette fois-ci, plus simple, étant donné que pour ce genre d'analyses, nous n'avons besoin que d'une série de mesures, sans ajout de différentes drogues qui pourraient décoller les cellules (Cf. Chapitre I.C.).

2). Réaliser des tests de validation fonctionnelle du rôle du métabolisme pour les modifications épigénétiques induites par les différentes infestations par *S. mansoni*. En effet, ces drogues, si elles s'avèrent actives sur le phénotype général d'acquisition de la MII, pourront être utilisées de la même manière, mais dans le but de récupérer les hémocytes de ces individus traités. Et par de nouvelles approches d'ATAC seq ou de Chip seq, nous pourrions suivre les changements épigénétiques au cours de la cinétique d'acquisition de la MII, et ainsi caractériser l'impact de la glycolyse et sa perturbation dans la mise en place et le maintien de ces changements épigénétiques.

Enfin, caractériser précisément les modifications épigénétiques et métaboliques qui surviennent chez *B. glabrata* à la suite d'une primo infestation par *S. mansoni*, ce qui est indispensable à la compréhension des mécanismes d'acquisition de la MII et qui permettra d'élucider les mécanismes nécessaires à ce « shift » transcriptomique et morphologique observé après une seconde infestation. Cependant, ces mécanismes moléculaires ne sont qu'une partie de l'histoire de cette MII chez *B. glabrata*. Nous nous sommes focalisés jusqu'à présent sur les cellules de l'immunité, les hémocytes, de façon globale, sans distinction des différentes populations qui pourraient exister chez ce mollusque. Nous avons pu montrer que le nombre d'hémocytes augmentait dès le premier jour suivant la primo infestation, et continuait d'augmenter après une seconde infestation, sans pour autant détecter une augmentation ou une diminution des différentes populations hémocytaires morphologiques connues à ce jour (Cf. Chapitre I.A.).

Nous savons, par la littérature existante et en se basant sur des caractères morphologiques, qu'au moins 3 populations hémocytaires sont présentes chez *B. glabrata* : Les



granulocytes, les hyalinocytes et les blast-like cells. Cependant, nos observations par microscopie et coloration MCDh, font état de quatre populations distinctes, avec une nouvelle population aux effectifs faibles, les hyalinocytes granuleux. Ainsi donc, ce nombre de trois populations fait encore aujourd'hui débat au sein de la communauté scientifique, et chaque étude trouve un nombre de population qui, finalement, est plus dépendant des outils et matériels utilisés pour définir les populations, que de la réelle diversité des hémocytes (Cf. Chapitre II introduction). Nous avons donc cherché un outil fiable, capable de nous donner un aperçu, sans *a priori*, de l'ensemble des populations d'hémocytes (au niveau transcriptionnel) présentes chez *B. glabrata*, afin de savoir si l'une d'entre elles porterait plus précisément la MII chez ce mollusque. C'est pourquoi, nous nous sommes tournés vers les technologies de séquençage sur cellules uniques, afin de séparer les hémocytes par l'intermédiaire de nano-gouttelettes (chromium) couplées à du séquençage massif des transcrits de chacune de ces cellules.

Dans le chapitre II de cette thèse, nous nous sommes donc efforcés de mieux comprendre ces cellules immunitaires. Dans un premier temps, en ne regardant que des individus naïfs, qui n'ont donc pas rencontré le parasite *S. mansoni*. Et dans un deuxième temps, en utilisant cette technologie dans l'analyse des hémocytes au cours d'une cinétique d'acquisition de la MII. La première étude sur les individus naïfs a permis de mettre en évidence une plus grande diversité de sous population hémocytaire que ce que nous aurions pu imaginer, seulement par des caractères morphologiques. Les populations hémocytaires de *B. glabrata* seraient donc composées d'au moins 7 sous populations transcriptomiques. Chacune de ces populations semble être reliée aux autres par un lignage cellulaire défini par l'expression de leurs gènes marqueurs, démontrant une probable grande plasticité de chacune de ces populations. Tous les outils utilisés jusqu'alors, comme la description par microscopie et coloration, ou encore la cytométrie en flux couplée à des analyses protéomiques, ne nous ont pas permis de définir des marqueurs ou caractères spécifiques de chacune de ces populations. Malgré l'utilisation de ces nouvelles technologies de séquençage sur cellules uniques, nous n'avons pas non plus été capables de relier les 3 ou 4 différentes populations morphologiques avec les 7 sous populations transcriptomiques. Cependant, cela nous a permis d'identifier, pour la première fois, une liste de gènes marqueurs pour l'ensemble de ces sous populations transcriptomiques. Ces gènes marqueurs seront indispensables dans la caractérisation et le suivi des différentes populations hémocytaires, et nous ont de plus permis de caractériser à nouveau l'ensemble des sous populations transcriptomiques hémocytaires, mais cette fois dans un contexte d'acquisition de la MII. En effet, nous avons mené les mêmes analyses scRNA seq,

mais en regroupant les hémocytes de quatre points de cinétique d'infestation et de réinfestation (Cf. Chapitre II.C.). La puissance d'analyse apportée par les 12 000 cellules, nous a permis d'affiner une nouvelle fois les probables lignages cellulaires qui peuvent exister entre nos différentes populations transcriptomiques. Ces analyses ont aussi permis de retrouver l'ensemble des cellules transcriptomiques définies chez des individus naïfs, mais aussi de caractériser une probable sous population d'hémocytes additionnelle, se développant fortement 15 jours après la primo infestation, et exprimant majoritairement les gènes définis comme « sustained » (Cf. Chapitre I.A.), dans les analyses de RNAseq global. Cependant, par cette approche, nous n'avons pu relier les patterns d'expression transcriptomiques d'un de ces clusters, avec le pattern de réponse spécifique de l'« immune shift », caractéristique de la réponse de MII chez *B. glabrata*. Le design expérimental est primordial dans l'élaboration de telles techniques de scRNAseq, et il semblerait donc que nous ayons choisi un temps trop tardif post-challenge (24h) pouvant nous permettre de détecter les cellules qui expriment ce pattern très particulier de la réponse immunitaire mémoire. Comme nous avons pu le voir en transcriptomique sur les hémocytes totaux, la réponse immunitaire revient à un état basal dès 24h post challenge, alors qu'elle « explose » entre 6h et 12h post challenge, en exprimant une très forte activité transcriptionnelle. Il serait donc indispensable d'affiner ces analyses par l'ajout de temps de cinétiques avant 24h post challenge, et d'intégrer ces résultats à l'ensemble des données déjà traitées en scRNAseq.

Grâce à ces analyses de scRNA seq, nous avons maintenant en notre possession des gènes marqueurs de chacune des populations transcriptomiques hémocytaires chez *B. glabrata*. De plus, les avancées technologiques dans le domaine de la cytométrie en flux, rendant la séparation des cellules plus précise, pourraient être utilisées afin de séparer physiquement certains types d'hémocytes sur des caractères morphologiques. Et grâce aux gènes marqueurs déterminés par scRNA seq, il sera alors possible de corréliser ces types d'hémocytes avec leurs marqueurs transcriptionnels, notamment par de l'analyse par PCR quantitative ou même encore des analyses scRNAseq sur chacune des fractions (Cf. Chapitre II). Enfin, ces gènes marqueurs pourraient également être utilisés afin d'identifier, directement sur lame, les différentes populations hémocytaires, par des approches d'hybridation *in situ*, notamment par des approches de RNAscope en cours de développement au laboratoire (Cf. Chapitre II).

Le but final, que ces expériences ont rendu possible, sera de définir les populations hémocytaires pouvant répondre aux diverses infestations, et notamment à la seconde infestation révélatrice de l'immunité mémoire chez *B. glabrata*. Définir et récupérer physiquement ces

populations hémocytaires va permettre de réaliser les premières expériences de transplantation d'hémocytes provenant de mollusques « primés » vers des mollusques naïfs. Ces transplantations sélectives de certaines populations hémocytaires, de toutes les populations en même temps, ou encore de la transplantation de l'organe hématopoïétique, devraient permettre de valider *in vivo* le rôle des hémocytes, et de l'organe produisant les hémocytes, dans la MII. Mais avant de pouvoir mener ces approches, il est nécessaire de développer des outils fiables nous permettant d'identifier et d'étudier le devenir des organes et/ou cellules transplantés chez les organismes receveurs. Pour ce faire, nous envisageons de pouvoir éditer et modifier le génome de *Biomphalaria* afin d'y intégrer un élément rapporteur fluorescent (Green Fluorescent protein, GFP), permettant de suivre ensuite n'importe quelle cellule (un hémocyte par exemple) issue d'un individu ainsi modifié, chez un individu receveur non génétiquement modifié. C'est en partie dans cette optique, que nous avons décidé de développer de nouvelles approches d'édition du génome de *B. glabrata* par l'utilisation de technologies de transposition (Cf. Chapitre III.A.). L'élément transposable de classe II Minos (Franz & Savakis, 1991), initialement découvert chez les insectes, a montré son efficacité chez d'autres organismes, comme chez le crustacé *Parhyale hawaiensis* (Pavlopoulos & Averof, 2005), et pourrait donc être fonctionnel dans le système mollusque *B. glabrata*. Outre cet aspect transplantation, il semble naturel que, si nous sommes capables d'insérer dans le génome des mollusques de quoi produire une protéine fluorescente comme la GFP, nous pourrions insérer n'importe quel gène. Cet outil de transgénèse serait alors l'outil idéal pour faire produire à ces organismes les molécules immunitaires, caractérisées jusqu'à présent dans l'interaction avec *S. mansoni*, et donc valider leurs rôles plus précisément en réponse au parasite. Les premières étapes de recherche de promoteurs fonctionnels chez *B. glabrata*, de création des plasmides donneurs contenant les sites de transposition Minos et les premiers tests de transfection sur un modèle cellulaire (cellules Bge) ont été couronnées de succès (Cf. Chapitre III.A.).

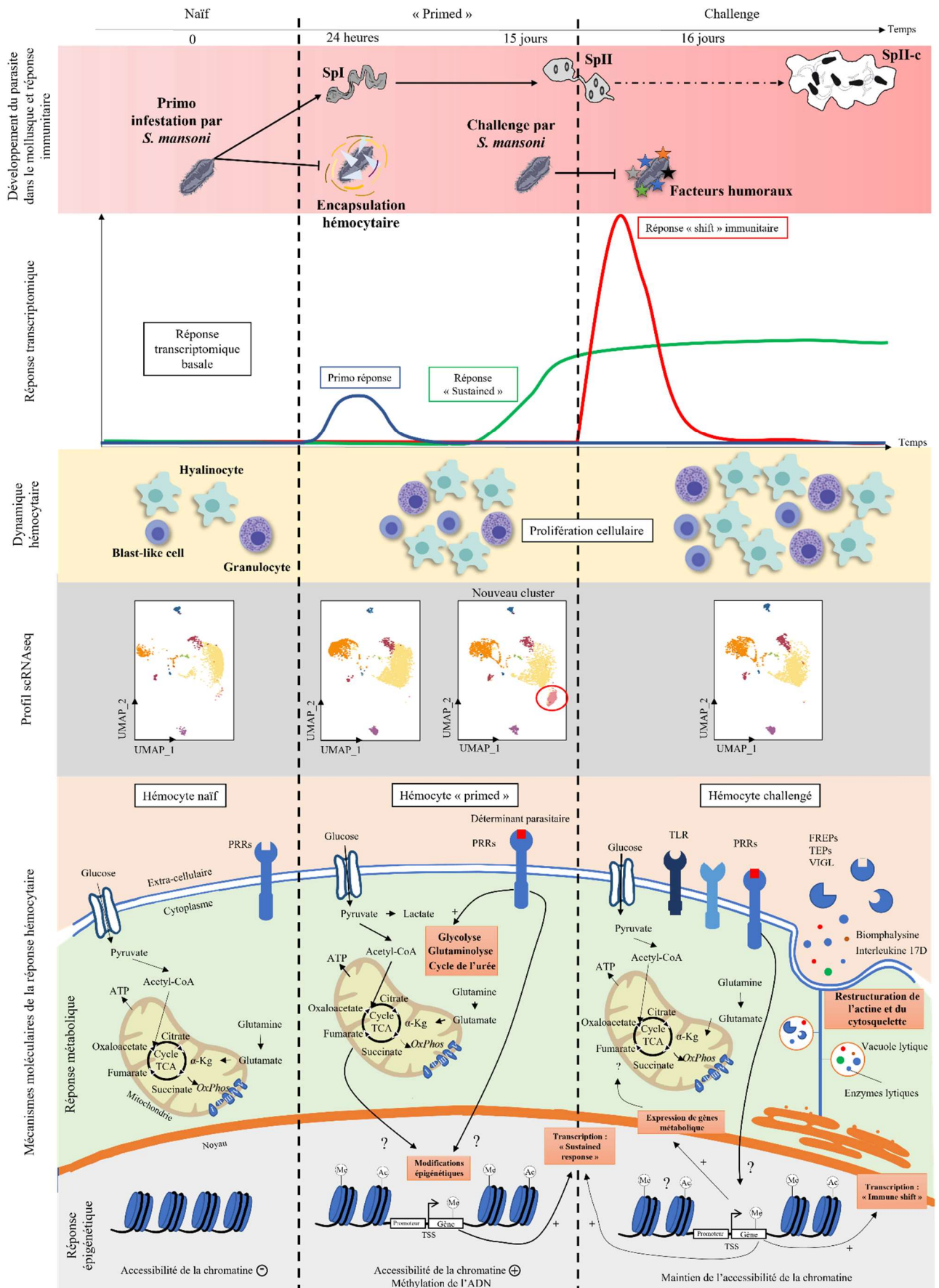


Figure 37: Représentation schématique de l'ensemble des mécanismes moléculaires, cellulaires et phénotypiques, décrits dans cette thèse, de l'acquisition de la MII chez *B. glabrata* en réponse à *S. mansoni*. SpII-c : Sporocyste cercariogène.

### ***E. La mémoire immunitaire innée, un mécanisme porté par le mollusque mais manipulé par le parasite ?***

Chez *B. glabrata*, l'existence d'un « priming » immunitaire ou mémoire immunitaire innée, a donc été caractérisée phénoménologiquement (Sire *et al.*, 1998; Portela *et al.*, 2013) et transcriptionnellement (Pinaud *et al.*, 2016), démontrant le rôle primordial du système immunitaire du mollusque face au parasite. Cette réponse immunitaire se caractérise alors par une forte spécificité, au niveau de la souche de parasite utilisée, rendant les ré-infestations dites homologues impossibles. Au niveau de l'expression des gènes, la réponse du système immunitaire de *B. glabrata* a aussi démontré son rôle, d'abord à la suite de la primo infestation, où cette interaction se caractérise par une forte immunosuppression de la réponse de l'hôte par le parasite, mais surtout par une réponse majoritairement cellulaire contre certains individus (Portet *et al.*, 2019), puis à la suite d'un challenge, où le « shift » phénotypique (réponse exclusivement humorale) et transcriptomique a été caractérisé (Pinaud *et al.*, 2016). Enfin, grâce à cette thèse, nous avons montré que les cellules de l'immunité du mollusque, les hémocytes, étaient au cœur de cette réponse de MII chez *B. glabrata*.

Cependant, les expériences que nous avons menées au cours de cette thèse ont toutes un point commun : la présence d'un parasite en développement dans le mollusque. En effet, toutes les expériences d'acquisition de la mémoire immunitaire innée par *S. mansoni* chez *B. glabrata* ont nécessité, au cours de cette thèse, que le parasite s'installe à la suite d'une primo infestation. Ainsi, les esprits les plus sceptiques pourraient opposer, à l'acquisition d'une mémoire immunitaire innée, l'hypothèse de la mise en place d'une compétition larvaire. Mais cette hypothèse a été invalidée par de précédentes études menées au laboratoire IHPE, au cours desquelles des expériences de vaccination des mollusques avec des extraits de sporocyste primaires ont permis d'induire une réponse immunitaire mémoire contre une infestation par *S. mansoni* sans qu'il y ait nécessité qu'un parasite ne se développe dans les tissus du mollusque (Portela *et al.*, 2013; Pinaud *et al.*, 2019). Ces expériences ont donc permis d'invalider, en partie, cette hypothèse de compétition parasitaire (Sire *et al.*, 1998), étant donné qu' aucune molécule produite par le parasite n'a pu être retrouvée circulant dans le plasma de mollusques « primés » (Portela *et al.*, 2013), et pouvant assurer un rôle dans cette compétition entre parasites. Ces expériences ont cependant montré, par le fait que la vaccination n'induit pas une réponse immunitaire mémoire complète, la probable importance du développement du parasite dans l'hôte pour stimuler complètement le système immunitaire. Ainsi, même si le mollusque

semble posséder toutes les armes pour se défendre contre le parasite (Cf. introduction), ce dernier semble toujours jouer un rôle dans l'établissement de la MII chez *B. glabrata*.

Comment expliquer que le parasite ne soit plus reconnu par les défenses de l'hôte, une fois qu'il réussit à s'implanter, alors que le système immunitaire du mollusque devient encore plus performant au point d'empêcher tout développement de nouveaux parasites similaires ?

#### ***F. Le rôle du parasite dans le phénomène d'acquisition de la MII chez B. glabrata***

Cette capacité des hôtes à développer une réponse immunitaire contre certains stades de développement du parasite (stades larvaire), alors qu'ils sont incapables, dans le même temps, de développer une défense contre les stades adultes résidant, a été définie comme étant de l'immunité concomitante (Salim & Abdel-Rahman, 2013). Cette immunité concomitante, caractérisée uniquement dans les modèles vertébrés, se définit par la mise en place d'une réponse immunitaire innée, puis adaptative, efficace contre de nouvelles infestations répétées de parasites. Cette réponse immunitaire, chez le vertébré, est très spécifique, et passe donc principalement par une réponse spécifique des anticorps provoquée par le parasite adulte déjà implanté dans l'hôte qui, par des produits d'excrétion/sécrétion, est capable de stimuler le système immunitaire de son hôte (Smithers & Terry, 1976). Pour le parasite, manipuler son hôte de cette façon favoriserait le brassage génétique pour la reproduction sexuée, car seuls des parasites génétiquement distants de ceux implantés pourraient alors se développer dans l'hôte, et de plus, avoir un génotype différent est un facteur primordial dans la création des couples de schistosome (Beltran *et al.*, 2011).

Ce qui est tout à fait étonnant dans le modèle invertébré *B. glabrata*, c'est qu'il n'existe pas d'immunité adaptative. Cependant, tous les travaux énumérés dans cette thèse montrent une capacité de mémoire très spécifique du système immunitaire inné. De plus, et de façon similaire aux vertébrés, le parasite, lors de la première infestation, est capable de déjouer les défenses de l'hôte et de continuer son développement en étant pratiquement invisible du système immunitaire de l'hôte. Là encore, de façon concomitante, une mémoire immunitaire innée est mise en place par le mollusque, empêchant de façon extrêmement spécifique, l'entrée de nouveaux parasites génétiquement proches de ceux déjà implantés dans le mollusque (Portela *et al.*, 2013). C'est ce caractère spécifique qui est tout à fait intrigant, et pousse à se demander si l'immunité concomitante caractérisée dans l'interaction vertébré/parasite ne pourrait pas aussi se retrouver dans l'interaction invertébré/parasite ? En effet, ce même parasite ayant choisi

une stratégie comme l'immunité concomitante chez le vertébré pour augmenter le brassage génétique de sa descendance, ne pourrait-il pas utiliser la même stratégie chez le mollusque afin de forcer, encore une fois, une diversité génétique mais, cette fois-ci, au niveau populationnel ? Le parasite, de par sa présence ou son action, favoriserait l'entrée d'autres parasites génétiquement plus éloignés, permettant ainsi de produire, à partir d'un même mollusque, une diversité plus grande de parasites. Ces derniers auront alors plus de chance de trouver un même hôte définitif, et de produire des adultes génétiquement différents, augmentant encore le brassage génétique dans l'hôte vertébré. Si nous admettons cette stratégie du parasite aussi dans le mollusque, comment ferait-il pour manipuler le système immunitaire de son hôte, alors que nous n'avons retrouvé aucunes protéines ou effecteurs du parasite dans l'hémolymphe de l'escargot (Portela *et al.*, 2013) ?

Ce n'est que récemment, qu'une piste permettant de répondre à cette question a été apportée à la communauté scientifique. En effet, certaines études montrent que le parasite dans le mollusque est capable de produire et sécréter dans le plasma de l'hôte, des micro-ARN (Queiroz *et al.*, 2017). Ces micro-ARN, différentiellement régulés par le parasite, pourraient être capables de cibler des gènes immunitaires de l'hôte lors d'une interaction sympatrique, et donc d'être responsables de la forte immunosuppression, lors de la primo infestation, permettant l'installation du parasite (Portet *et al.*, 2019). Nous pouvons aussi retrouver ce type de mécanisme d'interférence de la réponse immunitaire par la sécrétion de micro-ARN, dans l'interaction entre le parasite *S. mansoni* et son hôte définitif vertébré (Zhu *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2017; Samoïl *et al.*, 2018). Mais nous pourrions aussi imaginer que ces micro-ARN soient utilisés par le parasite afin de manipuler plus longuement son hôte, et de déclencher la MII contre de nouveaux parasites similaires voulant s'implanter par la suite. Ces hypothèses ne remettent absolument pas en cause les capacités de mémoire immunitaire innée du mollusque, mais soulèvent une fois de plus un rôle probablement plus important du parasite dans l'acquisition de cette MII.

### ***G. Le rôle de la MII en milieu naturel sur la transmission du parasite et l'épidémiologie de la maladie***

Nous savons que pour qu'il y ait infestation, le parasite doit être capable de rentrer en contact avec son hôte, donc que le filtre de rencontre soit ouvert. Puis, le parasite doit être capable de se développer dans son hôte, donc que le filtre de compatibilité soit ouvert (Combes *et al.*, 2018). Jusqu'à présent, nous pensions que le filtre de rencontre était plutôt fermé, et la

rencontre entre le parasite et son hôte rare, étant donné la faible prévalence des mollusques dans certains milieux naturels (Santos *et al.*, 2020). Ainsi, même s'il existe une grande diversité de parasites, en termes de diversité génétique, et donc un filtre de compatibilité ouvert, les parasites trouvent rarement un mollusque après leur éclosion, ce qui pourrait expliquer des prévalences aussi faibles. Mais de nouvelles études viennent rebattre les cartes et révèlent le contraire. En effet, le mollusque rencontre bien plus fréquemment des parasites comme *Schistosoma* au cours de sa vie en milieu naturel, démontrant que le filtre de rencontre est en fait ouvert (Allan *et al.*, 2013). Dans cette étude de Allan et collaborateur, il a pu être démontré que si, dans le milieu naturel, le nombre de mollusques capables d'émettre des cercaires est très faible (autour de 4%), par contre, le nombre de mollusques qui semblent avoir été en contact avec le parasite (mollusques positifs par diagnostic PCR) est très important et peut atteindre 100%. L'utilisation de mollusques sentinelles, dans le même milieu naturel pendant 72h, confirme le fort taux de rencontres des parasites avec le mollusque (jusqu'à 24% de rencontre). Certes, ces expériences sont menées sur des bulins (*Bulinus globosus* et *Bulinus nasutus*) et leur parasite naturel *Schistosoma haematobium*, l'agent responsable de la bilharziose urogénitale chez l'Homme. Cependant, nous pouvons imaginer que le même type de rencontre peut avoir lieu entre *B. glabrata* et *S. mansoni* en milieu naturel. En effet, comme le montrent des études (Santos *et al.*, 2020) dans certaines zones géographiques, la prévalence de la maladie est importante chez l'Homme (30.5%), en comparaison du nombre de mollusques retrouvés, capables d'émettre des cercaires (ici aucun), ce qui pourrait suggérer que le filtre de compatibilité est fermé mais le filtre de rencontre non. Et surtout, ces résultats soulèvent des questions fondamentales, notamment sur le rôle que pourrait jouer le « priming » immunitaire des mollusques dans la capacité de propagation du parasite en milieu naturel. Est-ce que la faible prévalence parasitaire des mollusques ne pourrait pas être en partie expliquée par l'acquisition d'une MII chez les mollusques, en réponse à des infestations incompatibles, répétées ?

Ainsi, la rencontre répétée du mollusque avec le parasite serait peut-être capable d'induire une réponse de MII, et serait donc bien une stratégie du mollusque contre le parasite. Pour tester cette hypothèse, nous avons souhaité reproduire ce mécanisme en laboratoire. Nous avons entrepris des expériences, en utilisant comme stimulation immunitaire, un parasite très peu compatible *S. mansoni*, d'origine guadeloupéenne (SmGH2). Nous avons donc réalisé des infestations répétées (une par jour pendant 8 jours) de mollusques BgBRE avec 10 miracidia SmGH2. Nous avons ensuite réinfesté les mollusques, dans lesquels aucun parasite n'a réussi à s'installer, par SmBRE (10 miracidia). Les résultats de cette expérience montrent une différence



significative d'intensité de l'infestation avec 2.5 miracidia capables de s'implanter contre 3.7 pour la condition contrôle (P-value < 0.05, U-value = 757.5), alors que la prévalence de l'infestation reste, elle, inchangée. Ces résultats préliminaires suggèrent que, même des infestations répétées avec des parasites peu compatibles, sont capables d'induire une réponse immunitaire à long terme chez le mollusque, bien que cela reste extrêmement moins efficace, et donc probablement une réponse différente de la réponse de MII. Cependant, la réponse immunitaire générée par SmGUA n'est pas suffisante pour rendre le mollusque complètement résistant à une infestation par SmBRE, ce qui montre que la réponse immunitaire déclenchée par SmGUA n'est peut-être spécifique que de ce parasite, et il serait impossible d'immuniser complètement avec ce parasite. Il faudrait utiliser des souches de parasites différentes, comme des souches compatibles (allopatriques ou sympatriques), pour déclencher la MII (Theron *et al.*, 2014). Nous savons qu'en fonction de la provenance du parasite que nous utilisons pour infester la souche BgBRE (interaction sympatrique ou allopatrique), la réponse immunitaire de première infestation est très différente (Portet *et al.*, 2019). Une souche de parasite sympatrique (*S. mansoni* origine brésilienne, SmBRE) induira une forte immunosuppression chez le mollusque, avec une réaction immunitaire très limitée de celui-ci. En revanche, une souche de parasite allopatrique aussi fortement compatible (*S. mansoni* origine vénézuélienne (SmVEN), n'induit pas d'immunosuppression, mais une réponse immunitaire du mollusque très différente et plus massive, et aussi inefficace, puisque le parasite parvient également à s'implanter, avec une prévalence et une intensité comparables au parasite sympatrique. Le système immunitaire du mollusque pourrait aussi avoir besoin d'être en contact avec une grande diversité de parasites incompatibles pour être en mesure de déclencher la MII. Ou finalement, les hypothèses citées d'une manipulation de l'hôte par le parasite en développement sont indispensables à la mise en place de la MII chez *B. glabrata* contre *S. mansoni*.

## ***H. Conclusion***

La présence d'une mémoire immunitaire innée chez *B. glabrata* n'est, aujourd'hui, plus à démontrer. Nous savons que cet escargot, en réponse au parasite *S. mansoni*, est capable de développer une réponse immunitaire extrêmement spécifique, caractérisée par un « shift », un basculement, à la fois phénotypique (réponse cellulaire à humorale) et transcriptomique par l'activation, lors des infestations secondaires de gènes spécifiques à ces infestations. Nous avons bien sûr émis l'hypothèse que le parasite pouvait être, finalement, le marionnettiste capable de contrôler directement ou indirectement le système immunitaire du mollusque. Mais

une chose est encore certaine, c'est que *B. glabrata* possède bien toutes les défenses nécessaires à l'élimination du parasite, seulement, ces défenses ne sont pas activées au bon moment pour empêcher la première infestation. Pourquoi ? Seule l'étude des mécanismes d'acquisition de la mémoire immunitaire innée chez cet escargot permettrait de le comprendre.

Ce fût l'objectif de mon travail de recherche durant cette thèse. Nous avons cherché à caractériser les cellules capables de supporter la MII, pour enfin nous permettre de décrire précisément les mécanismes moléculaires qui soutiennent cette mémoire immunitaire. Grâce à diverses approches « omiques », nous avons été capables de définir les hémocytes comme l'un des compartiments immunitaires du mollusque capable d'exprimer l'« immune shift » caractéristique de la MII chez *B. glabrata*. Les approches de caractérisation des changements épigénétiques, métaboliques, mais aussi transcriptomiques dans ces hémocytes nous ont permis de tracer un probable lien évolutif avec l'immunité entraînée décrite chez les organismes vertébrés, et plus précisément dans les cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules NK, etc.) de ces organismes.

A la différence des vertébrés, cependant, nous ne connaissons que peu, voire pas du tout, les hémocytes de *B. glabrata*. Ainsi, grâce à la technologie de « single cell RNA sequencing » nous avons été capables, pour la première fois, de déterminer, sans *a priori*, précisément et de façon reproductible, l'ensemble des populations transcriptomiques hémocytaires présentes chez *B. glabrata*. Ces approches ont montré la probable plasticité de ces hémocytes, et le rôle de chacune de ces populations transcriptomiques dans la réponse à *S. mansoni*. Bien que la corrélation avec les différentes populations morphologiques, décrites dans la littérature, reste un point à développer dans le futur proche, nos recherches permettront de développer le premier atlas hémocytaire chez *B. glabrata*.

Ces approches restent néanmoins globales, et les outils de validation fonctionnelle que j'ai pu commencer à développer au laboratoire (transgénèse, utilisation de drogues du métabolisme, infestations répétées, etc.) permettront de valider *in vivo*, l'ensemble des mécanismes que nous avons pu mettre en avant au cours de cette thèse. Nous avons quand même apporté des réponses supplémentaires, quant aux divers mécanismes régissant la MII chez *B. glabrata*, rapprochant les mécanismes de cette réponse immunitaire à celle des vertébrés et de la « trained immunity ».

Finalement, la mémoire immunitaire innée des invertébrés ne serait-elle pas le caractère ancestral de la mémoire entraînée des vertébrés, longtemps cachée par les mécanismes d'immunité adaptative portés par les anticorps ?



## Bibliographie

- ABE, M. & KURODA, R. (2019) The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdial* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling. *Development*, 146, dev175976. The Company of Biologists Ltd.
- ADEMA, C.M., BAYNE, C.J., BRIDGER, J.M., KNIGHT, M., LOKER, E.S., YOSHINO, T.P. & ZHANG, S.-M. (2012) Will all scientists working on snails and the diseases they transmit please stand up? *PLoS neglected tropical diseases*, 6, e1835. Public Library of Science San Francisco, USA.
- ADEMA, C.M., HERTEL, L.A., MILLER, R.D. & LOKER, E.S. (1997) A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 8691–8696. National Acad Sciences.
- ADEMA, C.M., HILLIER, L.W., JONES, C.S., LOKER, E.S., KNIGHT, M., MINX, P., ET AL. (2017) Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nature communications*, 8, 15451. Nature Publishing Group UK London.
- ALI, A. & ABD EL HALIM, H.M. (2020) Re-thinking adaptive immunity in the beetles: Evolutionary and functional trajectories of lncRNAs. *Genomics*, 112, 1425–1436. Elsevier.
- ALLAN, F., DUNN, A.M., EMERY, A.M., STOTHARD, J.R., JOHNSTON, D.A., KANE, R.A., ET AL. (2013) Use of sentinel snails for the detection of *Schistosoma haematobium* transmission on Zanzibar and observations on transmission patterns. *Acta Tropica*, 128, 234–240. Elsevier.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215, 403–410. Elsevier.
- ANAYA, J.-M., SHOENFELD, Y., ROJAS-VILLARRAGA, A., LEVY, R.A. & CERVERA, R. (2013) Autoimmunity: from bench to bedside. El Rosario University Press, Bogota (colombia).
- ARTS, R.J., CARVALHO, A., LA ROCCA, C., PALMA, C., RODRIGUES, F., SILVESTRE, R., ET AL. (2016) Immunometabolic pathways in BCG-induced trained immunity. *Cell reports*, 17, 2562–2571. Elsevier.
- ARTS, R.J., JOOSTEN, L.A. & NETEA, M.G. (2016) Immunometabolic circuits in trained immunity. In *Seminars in immunology* pp. 425–430. Elsevier.
- ARTS, R.J., NOVAKOVIC, B., TER HORST, R., CARVALHO, A., BEKKERING, S., LACHMANDAS, E., ET AL. (2016) Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity. *Cell metabolism*, 24, 807–819. Elsevier.
- ASHIDA, H., MIMURO, H., OGAWA, M., KOBAYASHI, T., SANADA, T., KIM, M. & SASAKAWA, C. (2011) Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *Journal of Cell Biology*, 195, 931–942. The Rockefeller University Press.
- ATIGHI, M.R., VERSTRAETEN, B., DE MEYER, T. & KYNDT, T. (2020) Genome-wide DNA hypomethylation shapes nematode pattern-triggered immunity in plants. *New Phytologist*, 227, 545–558. Wiley Online Library.
- AWASTHI, D., NAGARKOTI, S., SADAF, S., CHANDRA, T., KUMAR, S. & DIKSHIT, M. (2019) Glycolysis dependent lactate formation in neutrophils: A metabolic link between NOX-dependent and independent NETosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865, 165542. Elsevier.
- BAEZA GARCIA, A., PIERCE, R.J., GOURBAL, B., WERKMEISTER, E., COLINET, D., REICHHART, J.-M., ET AL. (2010) Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS pathogens*, 6, e1001115. Public Library of Science San Francisco, USA.

- BARBOSA, L., CALDEIRA, R.L., CARVALHO, O. DOS S., VIDIGAL, T.H.D.A., JANNOTTI-PASSOS, L.K. & COELHO, P.M.Z. (2006) Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO Biomphalaria tenagophila. *Parasite Immunology*, 28, 209–212. Wiley Online Library.
- BAUER, G. (1992) Variation in the life span and size of the freshwater pearl mussel. *Journal of animal ecology*, 425–436. JSTOR.
- BAYNE, C.J., BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. (1980a) *Schistosoma mansoni*: cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 50, 409–416. Elsevier.
- BAYNE, C.J., BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. (1980b) Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. *The Journal of parasitology*, 413–419. JSTOR.
- BAYNE, C.J., HAHN, U.K. & BENDER, R.C. (2001) Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology*, 123, 159–167. Cambridge University Press.
- BEKKERING, S., ARTS, R.J., NOVAKOVIC, B., KOURTZELIS, I., VAN DER HEIJDEN, C.D., LI, Y., ET AL. (2018) Metabolic induction of trained immunity through the mevalonate pathway. *Cell*, 172, 135–146. e9.
- BEKKERING, S., BLOK, B.A., JOOSTEN, L.A., RIKSEN, N.P., VAN CREVEL, R. & NETEA, M.G. (2016) In vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23, 926–933. Am Soc Microbiol.
- BEKKERING, S., DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J., JOOSTEN, L.A., RIKSEN, N.P. & NETEA, M.G. (2021) Trained immunity: reprogramming innate immunity in health and disease. *Annual review of immunology*, 39, 667–693. Annual Reviews.
- BELTRAN, S., GOURBAL, B., BOISSIER, J., DUVAL, D., KIEFFER-JAQUINOD, S., PIERCE, R.J., ET AL. (2011) Vertebrate host protective immunity drives genetic diversity and antigenic polymorphism in *Schistosoma mansoni*. *Journal of evolutionary biology*, 24, 554–572. Wiley Online Library.
- VAN DEN BERG, R.A., HOEFSLOOT, H.C., WESTERHUIS, J.A., SMILDE, A.K. & VAN DER WERF, M.J. (2006) Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics*, 7, 1–15. Springer.
- BEUTLER, B. (2009) Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunological reviews*, 227, 248–263. Wiley Online Library.
- BEZERRA, F. DE M., NOGUEIRA-MACHADO, J.A., CHAVES, M.M., MARTINS, R.L. & COELHO, P.M.Z. (1997) Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39, 197–202. SciELO Brasil.
- BIELEFELD, U. & BECKER, W. (2002) Embryonic development of the shell in *Biomphalaria glabrata* (Say). *International Journal of Developmental Biology*, 35, 121–131. UPV/EHU Press.
- BISTONI, F., VECCHIARELLI, A., CENCI, E., PUCETTI, P., MARCONI, P. & CASSONE, A. (1986) Evidence for macrophage-mediated protection against lethal *Candida albicans* infection. *Infection and Immunity*, 51, 668–674. Am Soc Microbiol.
- BLANDIN, S. & LEVASHINA, E.A. (2004) Thioester-containing proteins and insect immunity. *Molecular immunology*, 40, 903–908. Elsevier.
- BLOK, B.A., ARTS, R.J., VAN CREVEL, R., BENN, C.S. & NETEA, M.G. (2015) Trained innate immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines. *Journal of leukocyte biology*, 98, 347–356. Wiley Online Library.

- BOUTROS, M., AGAÏSSE, H. & PERRIMON, N. (2002) Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental cell*, 3, 711–722. Elsevier.
- BOWDEN, L., DHEILLY, N.M., RAFTOS, D.A. & NAIR, S.V. (2007) New immune systems: pathogen-specific host defence, life history strategies and hypervariable immune-response genes of invertebrates. *Invertebrate Survival Journal*, 4, 127–136.
- BREHÉLIN, M. & ROCH, P. (2008) Specificity, learning and memory in the innate immune response. *Invertebrate Survival Journal*, 5, 103–109.
- BRENNAN, J.P., SOUTHWORTH, R., MEDINA, R.A., DAVIDSON, S.M., DUCHEN, M.R. & SHATTOCK, M.J. (2006) Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation. *Cardiovascular research*, 72, 313–321. Elsevier Science.
- BRITES, D., MCTAGGART, S., MORRIS, K., ANDERSON, J., THOMAS, K., COLSON, I., ET AL. (2008) The Dscam homologue of the crustacean *Daphnia* is diversified by alternative splicing like in insects. *Molecular biology and evolution*, 25, 1429–1439. Oxford University Press.
- BUENROSTRO, J.D., WU, B., CHANG, H.Y. & GREENLEAF, W.J. (2015) ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide. *Current protocols in molecular biology*, 109, 21.29. 1-21.29. 9. Wiley Online Library.
- BURNET, M. (1969) Self and Not-Self: Cellular Immunology Book One. Melbourne University Press, Melbourne, VIII, 318 S pp.
- BURTON, N.O. & GREER, E.L. (2022) Multigenerational epigenetic inheritance: Transmitting information across generations. In *Seminars in cell & developmental biology* pp. 121–132. Elsevier.
- CANNON, J.P., HAIRE, R.N. & LITMAN, G.W. (2002) Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. *Nature immunology*, 3, 1200–1207. Nature Publishing Group.
- CAO, J., SPIELMANN, M., QIU, X., HUANG, X., IBRAHIM, D.M., HILL, A.J., ET AL. (2019) The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*, 566, 496–502. Nature Publishing Group.
- CASTILLO, M.G., HUMPHRIES, J.E., MOURÃO, M.M., MARQUEZ, J., GONZALEZ, A. & MONTELONGO, C.E. (2020) *Biomphalaria glabrata* immunity: Post-genome advances. *Developmental & Comparative Immunology*, 104, 103557. Elsevier.
- CATTERUCCIA, F., NOLAN, T., BLASS, C., MÜLLER, H.-M., CRISANTI, A., KAFATOS, F.C. & LOUKERIS, T.G. (2000) Toward Anopheles transformation: Minos element activity in anopheline cells and embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 2157–2162. National Acad Sciences.
- CAVALCANTI, M.G.S., MENDONÇA, A.M.B., DUARTE, G.R., BARBOSA, C., DE CASTRO, C., ALVES, L.C. & BRAYNER, F.A. (2012) Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Micron*, 43, 285–291.
- CERENIUS, L. & SÖDERHÄLL, K. (2013) Variable immune molecules in invertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 216, 4313–4319. Company of Biologists.
- CHANG, Y.-H., KUMAR, R., NG, T.H. & WANG, H.-C. (2018) What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 53–66. Elsevier.
- CHARRON, D. (1992) Le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. In *Annales de Recherches Vétérinaires* pp. 251–256.
- CHEEVER, A.W., MACEDONIA, J.G., MOSIMANN, J.E. & CHEEVER, E.A. (1994) Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice

- infected with a single pair of worms. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 50, 281–295. ASTMH.
- CHEN, S., YANG, J., WEI, Y. & WEI, X. (2020) Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. *Cellular & molecular immunology*, 17, 36–49. Nature Publishing Group UK London.
- CHENG, S.-C., QUINTIN, J., CRAMER, R.A., SHEPARDSON, K.M., SAEED, S., KUMAR, V., ET AL. (2014) mTOR-and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345, 1250684. American Association for the Advancement of Science.
- COELHO, P.M.Z. & CALDEIRA, R.L. (2016) Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. *Infectious Diseases of Poverty*, 5, 1–6. BioMed Central.
- COMBES, C., GAVOTTE, L., MOULIA, C. & SICARD, M. (2018) Parasitisme: écologie et évolution des interactions durables. Dunod.
- CONUS, S. (2010) Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss medical weekly*, 140, w13042–w13042.
- COOPER, D. & ELEFThERIANOS, I. (2017) Memory and specificity in the insect immune system: current perspectives and future challenges. *Frontiers in immunology*, 8, 539. Frontiers Media SA.
- COOPER, E.L. (1968) Transplantation immunity in annelids I. Rejection of xenografts exchanged between *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Transplantation*, 6, 322–337. LWW.
- COOPER, E.L. (2012) Adaptive immunity from prokaryotes to eukaryotes: broader inclusions due to less exclusivity? *Recent advances in immunology to target cancer, inflammation and infections; INTECH Open Access Publisher*.
- COUSTAU, C., GOURBAL, B., DUVAL, D., YOSHINO, T.P., ADEMA, C.M. & MITTA, G. (2015) Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish & shellfish immunology*, 46, 5–16.
- COUSTAU, C., KURTZ, J. & MORET, Y. (2016) A novel mechanism of immune memory unveiled at the invertebrate–parasite interface. *Trends in parasitology*, 32, 353–355.
- DAUSSET, J. (1985) HLA: Complexe majeur d’histocompatibilité de l’homme. Flammarion médecine-sciences.
- DE LA BALLINA, N.R., MARESCA, F., CAO, A. & VILLALBA, A. (2022) Bivalve Haemocyte Subpopulations: A Review. *Frontiers in Immunology*, 13, 826255–826255.
- DE MELO, E.S., BRAYNER, F.A., JUNIOR, N.C.P., FRANÇA, I.R.S. & ALVES, L.C. (2020) Investigation of defense response and immune priming in *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*, two species with different susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Parasitology research*, 119, 189–201. Springer.
- DELEURY, E., DUBREUIL, G., ELANGO VAN, N., WAJNBERG, E., REICHHART, J.-M., GOURBAL, B., ET AL. (2012) Specific versus non-specific immune responses in an invertebrate species evidenced by a comparative de novo sequencing study. *PLoS One*, 7, e32512. Public Library of Science San Francisco, USA.
- DHEILLY, N.M., DUVAL, D., MOUAHID, G., EMANS, R., ALLIENNE, J.-F., GALINIER, R., ET AL. (2015) A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 48, 234–243.
- DHEILLY, N.M., NAIR, S.V., SMITH, L.C. & RAFTOS, D.A. (2009) Highly variable immune-response proteins (185/333) from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*:

- proteomic analysis identifies diversity within and between individuals. *The Journal of Immunology*, 182, 2203–2212. Am Assoc Immunol.
- DIAZ SORIA, C.L., LEE, J., CHONG, T., COGLAN, A., TRACEY, A., YOUNG, M.D., ET AL. (2020) Single-cell atlas of the first intra-mammalian developmental stage of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature communications*, 11, 1–16. Nature Publishing Group.
- DING, J., ADICONIS, X., SIMMONS, S.K., KOWALCZYK, M.S., HESSION, C.C., MARJANOVIC, N.D., ET AL. (2020) Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods. *Nature biotechnology*, 38, 737–746. Nature Publishing Group US New York.
- DINGUIRARD, N., CAVALCANTI, M.G., WU, X.-J., BICKHAM-WRIGHT, U., SABAT, G. & YOSHINO, T.P. (2018) Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes during in vitro encapsulation of *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Frontiers in immunology*, 9, 2773. Frontiers Media SA.
- DISHAW, L.J., GIACOMELLI, S., MELILLO, D., ZUCCHETTI, I., HAIRE, R.N., NATALE, L., ET AL. (2011) A role for variable region-containing chitin-binding proteins (VCBPs) in host gut–bacteria interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 16747–16752. National Acad Sciences.
- DISHAW, L.J., LEIGH, B., CANNON, J.P., LIBERTI, A., MUELLER, M.G., SKAPURA, D.P., ET AL. (2016) Gut immunity in a protochordate involves a secreted immunoglobulin-type mediator binding host chitin and bacteria. *Nature communications*, 7, 1–9. Nature Publishing Group.
- DISHAW, L.J., MUELLER, M.G., GWATNEY, N., CANNON, J.P., HAIRE, R.N., LITMAN, R.T., ET AL. (2008) Genomic complexity of the variable region-containing chitin-binding proteins in amphioxus. *BMC genetics*, 9, 1–16. Springer.
- DIVANGAHI, M., AABY, P., KHADER, S.A., BARREIRO, L.B., BEKKERING, S., CHAVAKIS, T., ET AL. (2021) Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nature immunology*, 22, 2–6. Nature Publishing Group.
- DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J., DOS SANTOS, J.C., BEKKERING, S., MULDER, W.J., VAN DER MEER, J.W., RIKSEN, N.P., ET AL. (2022) Trained immunity: adaptation within innate immune mechanisms. *Physiological Reviews*, 103, 313–346. American Physiological Society Rockville, MD.
- DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J., FANUCCHI, S., JOOSTEN, L.A., MHLANGA, M.M. & NETEA, M.G. (2020) Advances in understanding molecular regulation of innate immune memory. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 68–75. Elsevier.
- DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J., JOOSTEN, L.A. & NETEA, M.G. (2019) Induction of innate immune memory: The role of cellular metabolism. *Current opinion in immunology*, 56, 10–16.
- DOMINGUEZ-ANDRES, J. & NETEA, M.G. (2019) Long-term reprogramming of the innate immune system. *Journal of leukocyte biology*, 105, 329–338.
- DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J., NOVAKOVIC, B., LI, Y., SCICLUNA, B.P., GRESNIGT, M.S., ARTS, R.J., ET AL. (2019) The itaconate pathway is a central regulatory node linking innate immune tolerance and trained immunity. *Cell metabolism*, 29, 211–220. e5. Elsevier.
- DONG, Y., TAYLOR, H.E. & DIMOPOULOS, G. (2006) AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS biology*, 4, e229. Public Library of Science San Francisco, USA.
- DU PASQUIER, L. (2001) The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 129, 1–15.
- DU PASQUIER, L. (2006) Germline and somatic diversification of immune recognition elements in Metazoa. *Immunology letters*, 104, 2–17. Elsevier.



- DU, X., MCMANUS, D.P., FRENCH, J.D., JONES, M.K. & YOU, H. (2021) CRISPR/Cas9: A new tool for the study and control of helminth parasites. *BioEssays*, 43, 2000185. Wiley Online Library.
- DURBIN, B.P., HARDIN, J.S., HAWKINS, D.M. & ROCKE, D.M. (2002) A variance-stabilizing transformation for gene-expression microarray data. *Bioinformatics*, 18, S105–S110. Oxford University Press.
- DUVAL, D., PICHON, R., LASSALLE, D., LAFFITTE, M., GOURBAL, B. & GALINIER, R. (2020) A New Assessment of Thioester-Containing Proteins Diversity of the Freshwater Snail *Biomphalaria glabrata*. *Genes*, 11, 69. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- DZIUBAK, A., WÓJCICKA, G., WOJTAK, A. & BELTOWSKI, J. (2018) Metabolic effects of metformin in the failing heart. *International journal of molecular sciences*, 19, 2869. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- FALLET, M., LUQUET, E., DAVID, P. & COSSEAU, C. (2020) Epigenetic inheritance and intergenerational effects in mollusks. *Gene*, 729, 144166. Elsevier.
- FAMAKINDE, D.O. (2018) Treading the path towards genetic control of snail resistance to schistosome infection. *Tropical medicine and infectious disease*, 3, 86. MDPI.
- FANUCCHI, S., DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J., JOOSTEN, L.A., NETEA, M.G. & MHLANGA, M.M. (2021) The intersection of epigenetics and metabolism in trained immunity. *Immunity*, 54, 32–43. Elsevier.
- FANUCCHI, S. & MHLANGA, M.M. (2019) Lnc-ing trained immunity to chromatin architecture. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 2. Frontiers Media SA.
- FEI, L., CHEN, H., MA, L., WEIGAO, E., WANG, R., FANG, X., ET AL. (2022) Systematic identification of cell fate regulatory programs using a single-cell atlas of mouse development. *Nature Genetics*, 54, 1051–1061.
- FENG, S., COKUS, S.J., ZHANG, X., CHEN, P.-Y., BOSTICK, M., GOLL, M.G., ET AL. (2010) Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 8689–8694. National Acad Sciences.
- FERRICK, D.A., NEILSON, A. & BEESON, C. (2008) Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug discovery today*, 13, 268–274. Elsevier.
- FERRO, K., PEUB, R., YANG, W., ROSENSTIEL, P., SCHULENBURG, H. & KURTZ, J. (2019) Experimental evolution of immunological specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 20598–20604. National Acad Sciences.
- FOK, E.T., DAVIGNON, L., FANUCCHI, S. & MHLANGA, M.M. (2019) The lncRNA connection between cellular metabolism and epigenetics in trained immunity. *Frontiers in Immunology*, 9, 3184. Frontiers Media SA.
- FONTAINE, E. (2018) Metformin-induced mitochondrial complex I inhibition: facts, uncertainties, and consequences. *Frontiers in endocrinology*, 9, 753. Frontiers Media SA.
- FOSTER, S.L., HARGREAVES, D.C. & MEDZHITOV, R. (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 447, 972–978. Nature Publishing Group.
- FOURNIER, A. & THERON, A. (1985) Sectorisation morpho-anatomique et fonctionnelle du sporocyste-fils de *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 71, 325–336. Springer.
- FRANZ, G. & SAVAKIS, C. (1991) Minos, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the Tc1-like family of transposons. *Nucleic acids research*, 19, 6646. Oxford University Press.
- FRIED, B. (2016) An update on hemocytes in *Biomphalaria* snails. *Journal of Hematology and Oncology Research*, 2, 20. Open Access Pub.

- GALINIER, R., PORTELA, J., MONE, Y., ALLIENNE, J.F., HENRI, H., DELBECQ, S., ET AL. (2013) Biomphalysin, a new  $\beta$  pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. *PLoS pathogens*, 9, e1003216.
- GATZMANN, F. & LYKO, F. (2019) Whole-genome bisulfite sequencing for the methylation analysis of insect genomes. In *Insect Genomics* pp. 141–156. Springer.
- GEGNER, J., BAUDACH, A., MUKHERJEE, K., HALITSCHKE, R., VOGEL, H. & VILCINSKAS, A. (2019) Epigenetic mechanisms are involved in sex-specific trans-generational immune priming in the lepidopteran model host *Manduca sexta*. *Frontiers in physiology*, 10, 137. Frontiers Media SA.
- GEYER, K.K., NIAZI, U.H., DUVAL, D., COSSEAU, C., TOMLINSON, C., CHALMERS, I.W., ET AL. (2017) The *Biomphalaria glabrata* DNA methylation machinery displays spatial tissue expression, is differentially active in distinct snail populations and is modulated by interactions with *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases*, 11, e0005246. Public Library of Science San Francisco, CA USA.
- GIRALDO-CALDERÓN, G.I., EMRICH, S.J., MACCALLUM, R.M., MASLEN, G., DIALYNAS, E., TOPALIS, P., ET AL. (2015) VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic acids research*, 43, D707–D713.
- GOODALL, C.P., BENDER, R.C., BRODERICK, E.J. & BAYNE, C.J. (2004) Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Molecular and biochemical parasitology*, 137, 321–328. Elsevier.
- GORDY, M.A., PILA, E.A. & HANINGTON, P.C. (2015) The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. *Fish & shellfish immunology*, 46, 39–49. Elsevier.
- GÖTZ, S., GARCÍA-GÓMEZ, J.M., TEROL, J., WILLIAMS, T.D., NAGARAJ, S.H., NUEDA, M.J., ET AL. (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*, 36, 3420–3435. Oxford University Press.
- GOURBAL, B., PINAUD, S., BECKERS, G.J., VAN DER MEER, J.W., CONRATH, U. & NETEA, M.G. (2018) Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunological reviews*, 283, 21–40.
- GOURBAL, B., THÉRON, A., GRUNAU, C., DUVAL, D. & MITTA, G. (2015) Polymorphic mucin-like proteins in *Schistosoma mansoni*, a variable antigen and a key component of the compatibility between the schistosome and its snail host. *Pathogen-host interactions: antigenic variation v. somatic adaptations*, 91–108. Springer.
- GRANATH JR, W.O. & YOSHINO, T.P. (1983) Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. *Journal of Experimental Zoology*, 226, 205–210. Wiley Online Library.
- GREEN, T.J. & MONTAGNANI, C. (2013) Poly I: C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1  $\mu$ var). *Fish & shellfish immunology*, 35, 382–388. Elsevier.
- GUO, Z., WANG, L., LIU, H. & XIE, Y. (2022) Innate Immune Memory in Monocytes and Macrophages: The Potential Therapeutic Strategies for Atherosclerosis. *Cells*, 11, 4072. MDPI.
- HAHN, U.K., BENDER, R.C. & BAYNE, C.J. (2000) Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. *Developmental & Comparative Immunology*, 24, 531–541. Elsevier.

- HAHN, U.K., BENDER, R.C. & BAYNE, C.J. (2001a) Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. *The Journal of parasitology*, 292–299.
- HAHN, U.K., BENDER, R.C. & BAYNE, C.J. (2001b) Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 87, 778–785.
- HAMBROOK, J.R. & HANINGTON, P.C. (2021) Immune evasion strategies of schistosomes. *Frontiers in immunology*, 11, 624178. Frontiers Media SA.
- HAN, X., WANG, R., ZHOU, Y., FEI, L., SUN, H., LAI, S., ET AL. (2018) Mapping the mouse cell atlas by microwell-seq. *Cell*, 172, 1091–1107. e17. Elsevier.
- HANINGTON, P.C., FORYS, M.A., DRAGOO, J.W., ZHANG, S.-M., ADEMA, C.M. & LOKER, E.S. (2010) Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 21087–21092. National Acad Sciences.
- HANINGTON, P.C., FORYS, M.A. & LOKER, E.S. (2012) A somatically diversified defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to schistosome infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 6, e1591. Public Library of Science San Francisco, USA.
- HANINGTON, P.C., LUN, C.-M., ADEMA, C.M. & LOKER, E.S. (2010) Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *International journal for parasitology*, 40, 819–831. Elsevier.
- HANSEN, E.L. (1973) Progeny-daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, 3, 267–268.
- HANSEN, E.L. (1976) A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): Establishment and characteristics. *Invertebrate tissue culture: Research applications*, 75–97. Academic Press New York.
- HAO, Y., HAO, S., ANDERSEN-NISSEN, E., MAUCK III, W.M., ZHENG, S., BUTLER, A., ET AL. (2021) Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*. Elsevier.
- HATHAWAY, J.J., ADEMA, C.M., STOUT, B.A., MOBARAK, C.D. & LOKER, E.S. (2010) Identification of protein components of egg masses indicates parental investment in immunoprotection of offspring by *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca). *Developmental & Comparative Immunology*, 34, 425–435. Elsevier.
- HERNÁNDEZ LÓPEZ, J., SCHUEHLY, W., CRAILSHEIM, K. & RIESSBERGER-GALLÉ, U. (2014) Trans-generational immune priming in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 20140454. The Royal Society.
- HILDEMANN, W.H., JOHNSTON, I.S. & JOKIEL, P.L. (1979) Immunocompetence in the lowest metazoan phylum: transplantation immunity in sponges. *Science*, 204, 420–422. American Association for the Advancement of Science.
- HOFFMANN, J.A. & REICHHART, J.-M. (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature immunology*, 3, 121–126. Nature Publishing Group.
- HOLE, C.R., WAGER, C.M.L., CASTRO-LOPEZ, N., CAMPUZANO, A., CAI, H., WOZNIAK, K.L., ET AL. (2019) Induction of memory-like dendritic cell responses in vivo. *Nature communications*, 10, 1–13. Nature Publishing Group.
- HONG, Y., FU, Z., CAO, X. & LIN, J. (2017) Changes in microRNA expression in response to *Schistosoma japonicum* infection. *Parasite Immunology*, 39, e12416. Wiley Online Library.
- HUBENDICK, B. (1958) A possible method of schistosome-vector control by competition between resistant and susceptible strains. *Bulletin of the World Health Organization*, 18, 1113. World Health Organization.

- HUMPHRIES, J.E. & YOSHINO, T.P. (2008) Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32, 554–562. Elsevier.
- HWANG, B., LEE, J.H. & BANG, D. (2018) Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Experimental & molecular medicine*, 50, 1–14. Nature Publishing Group.
- IBRAHIM, A.M. & GHONAME, S.I. (2018) Molluscicidal impacts of *Anagallis arvensis* aqueous extract on biological, hormonal, histological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Experimental parasitology*, 192, 36–41. Elsevier.
- ISMAIL, M., BOTROS, S., METWALLY, A., WILLIAM, S., FARGHALLY, A., TAO, L.-F., ET AL. (1999) Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60, 932–935. ASTMH.
- ITTIPRASERT, W., MANN, V.H., KARINSHAK, S.E., COGLAN, A., RINALDI, G., SANKARANARAYANAN, G., ET AL. (2019) Programmed genome editing of the omega-1 ribonuclease of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Elife*, 8. eLife Sciences Publications, Ltd.
- ITTIPRASERT, W., MILLER, A., MYERS, J., NENE, V., EL-SAYED, N.M. & KNIGHT, M. (2010) Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology*, 169, 27–39. Elsevier.
- IWANAGA, S. & LEE, B.-L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *BMB Reports*, 38, 128–150. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- JABLONSKI, K.A., AMICI, S.A., WEBB, L.M., RUIZ-ROSADO, J. DE D., POPOVICH, P.G., PARTIDA-SANCHEZ, S. & GUERAU-DE-ARELLANO, M. (2015) Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PloS one*, 10, e0145342. Public Library of Science San Francisco, CA USA.
- JANEWAY, C.A. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* pp. 1–13. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- JANEWAY JR, C.A. & MEDZHITOV, R. (1998) Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. In *Seminars in immunology* pp. 349–350.
- JASKIEWICZ, M., CONRATH, U. & PETERHÄNSEL, C. (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO reports*, 12, 50–55. John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK.
- JIANG, Y., LOKER, E.S. & ZHANG, S.-M. (2006) In vivo and in vitro knockdown of FREP2 gene expression in the snail *Biomphalaria glabrata* using RNA interference. *Developmental & Comparative Immunology*, 30, 855–866. Elsevier.
- JOKY, A., MATRICON-GONDRAN, M. & BENEX, J. (1983) Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 7, 669–672. Elsevier.
- JOURDANE, J. & THÉRON, A. (1987) Larval development: eggs to cercariae. *The biology of schistosomes. From genes to latrines*, 83–113. Academic Press Ltd.
- KACHROO, A. & ROBIN, G.P. (2013) Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 527–533. Elsevier.
- KAUFMANN, S.H. (2019) Immunology's coming of age. *Frontiers in immunology*, 10, 684. Frontiers Media SA.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. (2005) Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current opinion in immunology*, 17, 338–344. Elsevier.

- KAWANO CAMEY, T., OKAZAKI, K. & RÉ, L. (1992) Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)(Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. *Malacologia*, 34, 25–32.
- KEATING, S.T. & EL-OSTA, A. (2015) Epigenetics and metabolism. *Circulation research*, 116, 715–736. Am Heart Assoc.
- KEATING, S.T., GROH, L., THIEM, K., BEKKERING, S., LI, Y., MATZARAKI, V., ET AL. (2020) Rewiring of glucose metabolism defines trained immunity induced by oxidized low-density lipoprotein. *Journal of Molecular Medicine*, 1–13. Springer.
- KISELEV, V.Y., YIU, A. & HEMBERG, M. (2018) scmap: projection of single-cell RNA-seq data across data sets. *Nature methods*, 15, 359–362. Nature Publishing Group US New York.
- KLEIN, J. (1989) Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? *Scandinavian Journal of Immunology*, 29, 499–505. Wiley Online Library.
- KLINAKIS, A.G., LOUKERIS, T.G., PAVLOPOULOS, A. & SAVAKIS, C. (2000) Mobility assays confirm the broad host-range activity of the Minos transposable element and validate new transformation tools. *Insect molecular biology*, 9, 269–275. Wiley Online Library.
- KURTZ, J. (2005) Specific memory within innate immune systems. *Trends in immunology*, 26, 186–192. Elsevier.
- KYROU, K., HAMMOND, A.M., GALIZI, R., KRANJC, N., BURT, A., BEAGHTON, A.K., ET AL. (2018) A CRISPR–Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nature biotechnology*, 36, 1062–1066. Nature Publishing Group.
- LAFONT, M., PETTON, B., VERGNES, A., PAULETTO, M., SEGARRA, A., GOURBAL, B. & MONTAGNANI, C. (2017) Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Scientific reports*, 7, 13143.
- LAFONT, M., VERGNES, A., VIDAL-DUPIOL, J., DE LORGERIL, J., GUEGUEN, Y., HAFFNER, P., ET AL. (2020) A sustained immune response supports long-term antiviral immune priming in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mbio*, 11. Am Soc Microbiol.
- LANZ-MENDOZA, H. & CONTRERAS-GARDUÑO, J. (2022) Innate immune memory in invertebrates: Concept and potential mechanisms. *Developmental & Comparative Immunology*, 127, 104285. Elsevier.
- LARSON, M.K., BENDER, R.C. & BAYNE, C.J. (2014) Resistance of *Biomphalaria glabrata* 13-16-R1 snails to *Schistosoma mansoni* PR1 is a function of haemocyte abundance and constitutive levels of specific transcripts in haemocytes. *International journal for parasitology*, 44, 343–353. Elsevier.
- LAURSEN, J.R., DI LIU, H., WU, X.-J. & YOSHINO, T.P. (1997) Heat-shock response in a molluscan cell line: characterization of the response and cloning of an inducible HSP70 cDNA. *Journal of invertebrate pathology*, 70, 226–233. Elsevier.
- LI, H., GHARAMAH, A.A., HAMBROOK, J.R., WU, X. & HANINGTON, P.C. (2021) Single-cell RNA-seq profiling of individual *Biomphalaria glabrata* immune cells with a focus on immunologically relevant transcripts. *Immunogenetics*, 1–22. Springer.
- LI, H., HAMBROOK, J.R., PILA, E.A., GHARAMAH, A.A., FANG, J., WU, X. & HANINGTON, P. (2020) Coordination of humoral immune factors dictates compatibility between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. *Elife*, 9, e51708. eLife Sciences Publications Limited.
- LI, H., JANSSENS, J., DE WAEGENEER, M., KOLLURU, S.S., DAVIE, K., GARDEUX, V., ET AL. (2022) Fly Cell Atlas: A single-nucleus transcriptomic atlas of the adult fruit fly. *Science*, 375, eabk2432. American Association for the Advancement of Science.
- LI, W. (2021) Dscam in arthropod immune priming: What is known and what remains unknown. *Developmental & Comparative Immunology*, 125, 104231. Elsevier.

- LIBERTI, A., MELILLO, D., ZUCCHETTI, I., NATALE, L., DISHAW, L.J., LITMAN, G.W., ET AL. (2014) Expression of *Ciona intestinalis* variable region-containing chitin-binding proteins during development of the gastrointestinal tract and their role in host-microbe interactions. *PLoS One*, 9, e94984. Public Library of Science San Francisco, USA.
- LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. (1975) Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *International Journal for Parasitology*, 5, 621–625. Elsevier.
- LIE, K.J., HEYNEMAN, D. & YAU, P. (1975) The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*, 61, 574–576. JSTOR.
- LOCKYER, A.E., EMERY, A.M., KANE, R.A., WALKER, A.J., MAYER, C.D., MITTA, G., ET AL. (2012) Early differential gene expression in haemocytes from resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* strains in response to *Schistosoma mansoni*. *PloS one*, 7, e51102. Public Library of Science San Francisco, USA.
- LOCKYER, A.E., NOBLE, L.R., ROLLINSON, D. & JONES, C.S. (2004) *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Experimental parasitology*, 107, 97–104. Elsevier.
- LODES, M.J. & YOSHINO, T.P. (1989) Characterization of excretory-secretory proteins synthesized in vitro by *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. *The Journal of parasitology*, 853–862. JSTOR.
- LOKER, E.S., ADEMA, C.M., ZHANG, S.-M. & KEPLER, T.B. (2004) Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological reviews*, 198, 10–24. Wiley Online Library.
- LOKER, E.S., BAYNE, C.J., BUCKLEY, P.M. & KRUSE, K.T. (1982) Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of parasitology*, 84–94. JSTOR.
- LOUKERIS, T.G., ARCA, B., LIVADARAS, I., DIALEKTAKI, G. & SAVAKIS, C. (1995) Introduction of the transposable element Minos into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 9485–9489. National Acad Sciences.
- LOVERDE, P.T., GHERSON, J. & RICHARDS, C.S. (1982) Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: fine structure. *Developmental & Comparative Immunology*, 6, 441–449. Elsevier.
- LOW, C.F. & CHONG, C.M. (2020) Peculiarities of innate immune memory in crustaceans. *Fish & shellfish immunology*, 104, 605–612. Elsevier.
- LU, Q.-Y., ZHANG, L., YEE, J.K., GO, V.-L.W. & LEE, W.-N. (2015) Metabolic consequences of LDHA inhibition by epigallocatechin gallate and oxamate in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Metabolomics*, 11, 71–80. Springer.
- LUNA, E. & TON, J. (2012) The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. *Plant signaling & behavior*, 7, 615–618. Taylor & Francis.
- LUVIANO, N., DUVAL, D., ITTIPRASERT, W., ALLIENNE, J.-F., TAVERNIER, G., CHAPARRO, C., ET AL. (2022) Hit-and-run epigenetic editing for vectors of snail-borne parasitic diseases. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10. Frontiers Media SA.
- LUVIANO, N., LOPEZ, M., GAWEHNS, F., CHAPARRO, C., ARIMONDO, P.B., IVANOVIC, S., ET AL. (2021) The methylome of *Biomphalaria glabrata* and other mollusks: enduring modification of epigenetic landscape and phenotypic traits by a new DNA methylation inhibitor. *Epigenetics & Chromatin*, 14, 1–25. Springer.
- MACARTHUR, R.H. & WILSON, E.O. (1967) The theory of island biogeography Princeton University Press. *Princeton, NJ*, 203.

- MACKANESS, G.B. (1964) The immunological basis of acquired cellular resistance. *The Journal of experimental medicine*, 120, 105–120. Rockefeller University Press.
- MACKANESS, G.B. (1969) The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 129, 973–992. Rockefeller University Press.
- MARQUEZ, J., DINGUIRARD, N., GONZALEZ, A., KANE, A.E., JOFFE, N.R., YOSHINO, T.P. & CASTILLO, M.G. (2022) Molecular characterization of thioester-containing proteins in *Biomphalaria glabrata* and their differential gene expression upon *Schistosoma mansoni* exposure. *Frontiers in immunology*, 13. Frontiers Media SA.
- MARSIN, A.-S., BOUZIN, C., BERTRAND, L. & HUE, L. (2002) The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 30778–30783. ASBMB.
- MARTIN, S.J., BURTON, D.R., ROITT, I.M. & DELVES, P.J. (2016) Roitt's essential immunology. John Wiley & Sons.
- MARTINS-SOUZA, R.L., PEREIRA, C.A.J., COELHO, P.M.Z., MARTINS-FILHO, O.A. & NEGRÃO-CORRÊA, D. (2009) Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology*, 136, 67–76. Cambridge University Press.
- MARTINS-SOUZA, R.L., PEREIRA, C.A.J., MARTINS FILHO, O.A., COELHO, P.M.Z., CORRÊA JR, A. & NEGRÃO-CORRÊA, D. (2006) Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 185–192. SciELO Brasil.
- MATRICON-GONDRAN, M. & LETOCART, M. (1999) Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*: I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. *Journal of invertebrate pathology*, 74, 224–234.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C.A. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91, 295–298. Elsevier.
- MELILLO, D., MARINO, R., ITALIANI, P. & BORASCHI, D. (2018) Innate immune memory in invertebrate metazoans: a critical appraisal. *Frontiers in immunology*, 9, 1915. Frontiers.
- MENDES, T.M.F., CARRILHO, E., AFONSO, A.J.P.F.S., GALINARO, C.A., CABRAL, F.J. & ALLEGRETTI, S.M. (2019) Proteomic, metabolic and immunological changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *International journal for parasitology*, 49, 1049–1060. Elsevier.
- MERIGGI, N., DI PAOLA, M., VITALI, F., RIVERO, D., CAPPÀ, F., TURILLAZZI, F., ET AL. (2019) *Saccharomyces cerevisiae* induces immune enhancing and shapes gut microbiota in social wasps. *Frontiers in microbiology*, 10, 2320. Frontiers Media SA.
- METCHNIKOFF, E. (1883) Untersuchungen über die intracelluläre Verdauung bei wirbellosen Thieren. *Arb. Zool. Inst. Wien* 5, 141–168. Transl.(1884) as: Researches on the intracellular digestion of invertebrates. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 24, 89–111.
- METSCHNIKOFF, E. (1884) A disease of *Daphnia* caused by a yeast. A contribution to the theory of phagocytes as agents for attack on disease-causing organisms. *Archiv. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, 96, 177–195.
- MILLER, J. & SPRENT, J. (1971) Cell-to-cell interaction in the immune response: VI. Contribution of thymus-derived cells and antibody-forming cell precursors to immunological memory. *The Journal of Experimental Medicine*, 134, 66–82. Rockefeller University Press.

- MILUTINOVIĆ, B. & KURTZ, J. (2016) Immune memory in invertebrates. In *Seminars in immunology* pp. 328–342. Elsevier.
- MITROULIS, I., RUPPOVA, K., WANG, B., CHEN, L.-S., GRZYBEK, M., GRINENKO, T., ET AL. (2018) Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell*, 172, 147–161. e12. Elsevier.
- MITTA, G., ADEMA, C.M., GOURBAL, B., LOKER, E.S. & THERON, A. (2012) Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. *Developmental & Comparative Immunology*, 37, 1–8.
- MITTA, G., GALINIER, R., TISSEYRE, P., ALLIENNE, J.-F., GIRERD-CHAMBAZ, Y., GUILLOU, F., ET AL. (2005) Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 29, 393–407.
- MITTA, G., GOURBAL, B., GRUNAU, C., KNIGHT, M., BRIDGER, J.M. & THÉRON, A. (2017) The compatibility between *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni*: an increasingly complex puzzle. In *Advances in parasitology* pp. 111–145. Elsevier.
- MOLEHIN, A.J., MCMANUS, D.P. & YOU, H. (2022) Vaccines for Human Schistosomiasis: Recent Progress, New Developments and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 2255. MDPI.
- MONÉ, Y., GOURBAL, B., DUVAL, D., DU PASQUIER, L., KIEFFER-JAQUINOD, S. & MITTA, G. (2010) A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. *PLOS neglected tropical diseases*, 4, e813.
- MONÉ, Y., MITTA, G., DUVAL, D. & GOURBAL, B.E. (2010) Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental parasitology*, 125, 70–75. Elsevier.
- MONÉ, Y., RIBOU, A.-C., COSSEAU, C., DUVAL, D., THÉRON, A., MITTA, G. & GOURBAL, B. (2011) An example of molecular co-evolution: reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. *International journal for parasitology*, 41, 721–730. Elsevier.
- MORET, Y. & SIVA-JOTHY, M.T. (2003) Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 2475–2480.
- MORGAN, J.A.T., DEJONG, R.J., SNYDER, S.D., MKOJI, G.M. & LOKER, E.S. (2001) *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology*, 123, 211–228.
- MOULIN, A.-M. (1983) De l'analyse au système: le développement de l'Immunologie. *Revue d'histoire des sciences*, 49–67. JSTOR.
- MULDER, W.J., OCHANDO, J., JOOSTEN, L.A., FAYAD, Z.A. & NETEA, M.G. (2019) Therapeutic targeting of trained immunity. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18, 553–566. Nature Publishing Group.
- NEGRÃO-CORRÊA, D., MATTOS, A.C.A., PEREIRA, C.A.J., MARTINS-SOUZA, R.L. & COELHO, P.M.Z. (2012) Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and hemocytes of *Biomphalaria*. *Journal of parasitology research*, 2012. Hindawi.
- NETEA, M.G., DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J., BARREIRO, L.B., CHAVAKIS, T., DIVANGAHI, M., FUCHS, E., ET AL. (2020) Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 1–14. Nature Publishing Group.
- NETEA, M.G., JOOSTEN, L.A., LATZ, E., MILLS, K.H., NATOLI, G., STUNNENBERG, H.G., ET AL. (2016) Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352, aaf1098.
- NETEA, M.G. & VAN DER MEER, J.W. (2017) Trained immunity: an ancient way of remembering. *Cell host & microbe*, 21, 297–300. Elsevier.



- NETEA, M.G., QUINTIN, J. & VAN DER MEER, J.W. (2011) Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe*, 9, 355–361.
- NG, T.H. & KURTZ, J. (2020) Dscam in immunity: a question of diversity in insects and crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, 105, 103539. Elsevier.
- NOROZITALLAB, P., BARUAH, K., BISWAS, P., VANROMPAY, D. & BOSSIER, P. (2016) Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. *Scientific Reports*, 6, 1–14. Nature Publishing Group.
- NOVAKOVIC, B., HABIBI, E., WANG, S.-Y., ARTS, R.J., DAVAR, R., MEGCHELENBRINK, W., ET AL. (2016)  $\beta$ -Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance. *Cell*, 167, 1354–1368. e14. Elsevier.
- O'NEILL, L.A. & ARTYOMOV, M.N. (2019) Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. *Nature Reviews Immunology*, 19, 273–281. Nature Publishing Group.
- O'NEILL, L.A., KISHTON, R.J. & RATHMELL, J. (2016) A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, 16, 553–565. Nature Publishing Group.
- OPAL, S.M. (2010) A brief history of microbiology and immunology. In *Vaccines: A biography* pp. 31–56. Springer.
- PALMIERI, B., VADALA', M. & PALMIERI, L. (2021) Immune memory: an evolutionary perspective. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 17, 1604–1606. Taylor & Francis.
- PAN, S.C.-T. (1996) *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 49, 129–149. National Institute of Infectious Diseases, Japanese Journal of Medical Science and Biology.
- PANG, Z., ZHOU, G., EWALD, J., CHANG, L., HACARIZ, O., BASU, N. & XIA, J. (2022) Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature Protocols*, 1–27. Nature Publishing Group.
- PAVLOPOULOS, A. & AVEROF, M. (2005) Establishing genetic transformation for comparative developmental studies in the crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 7888–7893. National Acad Sciences.
- PAVLOPOULOS, A., BERGHAMMER, A.J., AVEROF, M. & KLINGLER, M. (2004) Efficient transformation of the beetle *Tribolium castaneum* using the Minos transposable element: quantitative and qualitative analysis of genomic integration events. *Genetics*, 167, 737–746. Oxford University Press.
- PAVLOPOULOS, A., OEHLER, S., KAPETANAKI, M.G. & SAVAKIS, C. (2007) The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates. *Genome biology*, 8, 1–7. BioMed Central.
- PAXTON, C.G.M. (2016) Unleashing the Kraken: on the maximum length in giant squid (*Architeuthis* sp.). *Journal of Zoology*, 300, 82–88. Wiley Online Library.
- PHAM, L.N., DIONNE, M.S., SHIRASU-HIZA, M. & SCHNEIDER, D.S. (2007) A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS pathogens*, 3, e26. Public Library of Science San Francisco, USA.
- PIANKA, E.R. (1970) On r- and K-selection. *The American naturalist*, 104, 592–597. University of Chicago Press.
- PICHON, R., PINAUD, S., CHAPPARO, C., FALLET, M., COSSEAU, C., LEBRON, R., ET AL. (2023) Innate immune memory in *Biomphalaria glabrata* snail: an epigenetic and metabolic trained immunity-related phenotype. *En préparation*.

- PICHON, R., PINAUD, S., VIGNAL, E., CHAPARRO, C., PRATLONG, M., PORTET, A., ET AL. (2022) Single cell RNA sequencing reveals hemocyte heterogeneity in *Biomphalaria glabrata*: plasticity over diversity. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media.
- PIKE WINER, L.S. & WU, M. (2014) Rapid analysis of glycolytic and oxidative substrate flux of cancer cells in a microplate. *PLoS one*, 9, e109916. Public Library of Science San Francisco, USA.
- PILA, EMMANUEL A., GORDY, M.A., PHILLIPS, V.K., KABORE, A.L., RUDKO, S.P. & HANINGTON, P.C. (2016) Endogenous growth factor stimulation of hemocyte proliferation induces resistance to *Schistosoma mansoni* challenge in the snail host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 5305–5310. National Acad Sciences.
- PILA, E.A., LI, H., HAMBROOK, J.R., WU, X. & HANINGTON, P.C. (2017) Schistosomiasis from a snail's perspective: advances in snail immunity. *Trends in parasitology*, 33, 845–857. Elsevier.
- PILA, E. A., SULLIVAN, J.T., WU, X.Z., FANG, J., RUDKO, S.P., GORDY, M.A. & HANINGTON, P.C. (2016) Haematopoiesis in molluscs: a review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 119–128. Elsevier.
- PILA, EMMANUEL A., TARRABAIN, M., KABORE, A.L. & HANINGTON, P.C. (2016) A novel Toll-like receptor (TLR) influences compatibility between the gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the digenean trematode *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens*, 12, e1005513. Public Library of Science San Francisco, CA USA.
- PINAUD, S., PORTELA, J., DUVAL, D., NOWACKI, F.C., OLIVE, M.-A., ALLIENNE, J.-F., ET AL. (2016) A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS pathogens*, 12, e1005361.
- PINAUD, S., PORTET, A., ALLIENNE, J.-F., BELMUDES, L., SAINT-BEAT, C., ARANCIBIA, N., ET AL. (2019) Molecular characterisation of immunological memory following homologous or heterologous challenges in the schistosomiasis vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 92, 238–252.
- PINAUD, S., TETREAU, G., POTEAUX, P., GALINIER, R., CHAPARRO, C., LASSALLE, D., ET AL. (2021) New insights into biomphalysin gene family diversification in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Frontiers in immunology*, 12, 635131. Frontiers Media SA.
- PLOTKIN, S. (2014) History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 12283–12287. National Acad Sciences.
- PORTELA, J., DUVAL, D., ROGNON, A., GALINIER, R., BOISSIER, J., COUSTAU, C., ET AL. (2013) Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. *Journal of innate immunity*, 5, 261–276.
- PORTET, A., GALINIER, R., PINAUD, S., PORTELA, J., NOWACKI, F., GOURBAL, B. & DUVAL, D. (2018) BgTEP: an antiprotease involved in innate immune sensing in *Biomphalaria glabrata*. *Frontiers in immunology*, 9, 1206.
- PORTET, A., PINAUD, S., CHAPARRO, C., GALINIER, R., DHEILLY, N.M., PORTELA, J., ET AL. (2019) Sympatric versus allopatric evolutionary contexts shape differential immune response in *Biomphalaria/Schistosoma* interaction. *PLoS pathogens*, 15, e1007647.
- PORTET, A., PINAUD, S., TETREAU, G., GALINIER, R., COSSEAU, C., DUVAL, D., ET AL. (2017) Integrated multi-omic analyses in *Biomphalaria-Schistosoma* dialogue reveal the immunobiological significance of FREP-SmPoMuc interaction. *Developmental & Comparative Immunology*, 75, 16–27. Elsevier.
- PRADA, J.A.H., HAIRE, R.N., ALLAIRE, M., JAKONCIC, J., STOJANOFF, V., CANNON, J.P., ET AL. (2006) Ancient evolutionary origin of diversified variable regions demonstrated by

- crystal structures of an immune-type receptor in amphioxus. *Nature immunology*, 7, 875–882. Nature Publishing Group.
- PRIGOT-MAURICE, C., BELTRAN-BECH, S. & BRAQUART-VARNIER, C. (2022) Why and how do protective symbionts impact immune priming with pathogens in invertebrates? *Developmental & Comparative Immunology*, 126, 104245. Elsevier.
- PROKHOROVA, E.E., SEREBRYAKOVA, M.K., TOKMAKOVA, A.S. & ATAEV, G.L. (2018) Hemocytes of mollusc *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata). *Invertebrate Survival Journal*, 15, 346–351.
- PURVIS, A. & HECTOR, A. (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 405, 212–219. Nature Publishing Group.
- QUEIROZ, F.R., SILVA, L.M., JEREMIAS, W. DE J., BABA, E.H., CALDEIRA, R.L., COELHO, P.M.Z. & GOMES, M. DE S. (2017) Differential expression of small RNA pathway genes associated with the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* interaction. *PLoS One*, 12, e0181483. Public Library of Science San Francisco, CA USA.
- QUINTIN, J., SAEED, S., MARTENS, J.H., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J., IFRIM, D.C., LOGIE, C., ET AL. (2012) *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell host & microbe*, 12, 223–232. Elsevier.
- RADDI, G., BARLETTA, A.B.F., EFREMOVA, M., RAMIREZ, J.L., CANTERA, R., TEICHMANN, S.A., ET AL. (2020) Mosquito cellular immunity at single-cell resolution. *Science*, 369, 1128–1132. American Association for the Advancement of Science.
- RAGHAVAN, N. & KNIGHT, M. (2006) The snail (*Biomphalaria glabrata*) genome project. *Trends in parasitology*, 22, 148–151. Elsevier.
- REGEV, A., TEICHMANN, S.A., LANDER, E.S., AMIT, I., BENOIST, C., BIRNEY, E., ET AL. (2017) The human cell atlas. *elife*, 6, e27041. eLife Sciences Publications, Ltd.
- REIMER-MICHALSKI, E.-M. & CONRATH, U. (2016) Innate immune memory in plants. In *Seminars in immunology* pp. 319–327. Elsevier.
- RENA, G., PEARSON, E.R. & SAKAMOTO, K. (2013) Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*, 56, 1898–1906. Springer.
- RIDGWAY, I.D. & RICHARDSON, C.A. (2011) *Arctica islandica*: the longest lived non colonial animal known to science. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21, 297–310. Springer.
- RIESKE, J.S., BAUM, H., STONER, C. T & LIPTON, S.H. (1967) On the antimycin-sensitive cleavage of complex III of the mitochondrial respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4854–4866. Elsevier.
- RIKSEN, N.P. & NETEA, M.G. (2020) Immunometabolic control of trained immunity. *Molecular Aspects of Medicine*, 100897. Elsevier.
- ROARK, E.B., GUILDERTON, T.P., DUNBAR, R.B., FALLON, S.J. & MUCCIARONE, D.A. (2009) Extreme longevity in proteinaceous deep-sea corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 5204–5208. National Acad Sciences.
- RODRIGUES, J., BRAYNER, F.A., ALVES, L.C., DIXIT, R. & BARILLAS-MURY, C. (2010) Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science*, 329, 1353–1355.
- ROSS, A.G., OLVEDA, R.M. & LI, Y. (2015) An audacious goal: the elimination of schistosomiasis in our lifetime through mass drug administration. *Lancet (London, England)*, 385, 2220–2221.
- ROTH, O. & KURTZ, J. (2009) Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Developmental & Comparative Immunology*, 33, 1151–1155. Elsevier.
- ROWLEY, A.F. & POWELL, A. (2007) Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology*, 179, 7209–7214. Am Assoc Immunol.

- ROZENBLATT-ROSEN, O., STUBBINGTON, M.J., REGEV, A. & TEICHMANN, S.A. (2017) The Human Cell Atlas: from vision to reality. *Nature*, 550, 451–453. Nature Publishing Group.
- RUTSCHMANN, S., KILINC, A. & FERRANDON, D. (2002) Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *The Journal of Immunology*, 168, 1542–1546. Am Assoc Immunol.
- SADD, B.M. & SCHMID-HEMPEL, P. (2006) Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology*, 16, 1206–1210. Elsevier.
- SAEED, S., QUINTIN, J., KERSTENS, H.H., RAO, N.A., AGHAJANIREFAH, A., MATARESE, F., ET AL. (2014) Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *science*, 345, 1251086. American Association for the Advancement of Science.
- SALIM, A.-M. & ABDEL-RAHMAN, A.-H. (2013) Concomitant immunity to *Schistosoma mansoni* in mice. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 37, 19. Galenos Publishing House.
- SAMBON, L.W. (1907) New or little known African Entozoa. *J Trop Med Hyg*, 10, 117.
- SAMOIL, V., DAGENAIS, M., GANAPATHY, V., ALDRIDGE, J., GLEBOV, A., JARDIM, A. & RIBEIRO, P. (2018) Vesicle-based secretion in schistosomes: analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni*. *Scientific reports*, 8, 3286. Nature Publishing Group UK London.
- SAMUELSON, J.C. & CAULFIELD, J.P. (1985) Role of pleated septate junctions in the epithelium of miracidia of *Schistosoma mansoni* during transformation to sporocysts in vitro. *Tissue and Cell*, 17, 667–682. Elsevier.
- SANTOS, I.G. DE A., BEZERRA, L.P., CIRILO, T.M., SILVA, L.O., MACHADO, J.P.V., LIMA, P.D., ET AL. (2020) New epidemiological profile of schistosomiasis from an area of low prevalence in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53. SciELO Brasil.
- SASAKURA, Y., AWAZU, S., CHIBA, S., KANO, S. & SATOH, N. (2003) Application of Minos, one of the Tc1/mariner superfamily transposable elements, to ascidian embryos as a tool for insertional mutagenesis. *Gene*, 308, 11–20. Elsevier.
- SAY, T. (1818) Account of two new genera, and several new species, of fresh water and land shells. *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 1, 276–284.
- SCHUTTE, C.H.J. (1975) Studies on the South African Strain of *Schistosoma mansoni*-Part 3: Notes on certain host-parasitic relationships between intra-molluscan larvae and intermediate host. *South African Journal of Science*, 71, 8. Academy of Science for South Africa (ASSAf).
- SCHWARTZ, M. (2022) The Pasteurian contribution to the history of vaccines. *Comptes Rendus. Biologies*, 345, 1–15.
- SEVERO, M.S., LANDRY, J.J., LINDQUIST, R.L., GOOSMANN, C., BRINKMANN, V., COLLIER, P., ET AL. (2018) Unbiased classification of mosquito blood cells by single-cell genomics and high-content imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E7568–E7577. National Acad Sciences.
- SHEEHAN, G., FARRELL, G. & KAVANAGH, K. (2020) Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence*, 11, 238–246. Taylor & Francis.
- SHI, L. & LEE, T. (2012) Molecular diversity of Dscam and self-recognition. *Sensing in Nature*, 262–275. Springer.
- SIRE, C., ROGNON, A. & THERON, A. (1998) Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect Biomphalariaglabrata snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology*, 117, 117–122.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1976) The immunology of schistosomiasis. *Advances in Parasitology*, 14, 399–422. Elsevier.

- SONG, K., LI, L. & ZHANG, G. (2017) The association between DNA methylation and exon expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 12, e0185224. Public Library of Science San Francisco, CA USA.
- SOUZA, C.P. DE, BORGES, C.C., SANTANA, A.G. & ANDRADE, Z.A. (1997) Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 517–522. SciELO Brasil.
- SOUZA, S. DOS S. & ANDRADE, Z.A. (2012) The significance of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 598–603. SciELO Brasil.
- STREET, K., RISSO, D., FLETCHER, R.B., DAS, D., NGAI, J., YOSEF, N., ET AL. (2018) Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC genomics*, 19, 1–16. Springer.
- STUART, L.M. & EZEKOWITZ, R.A. (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nature Reviews Immunology*, 8, 131–141. Nature Publishing Group.
- SULEK, M., KORDACZUK, J. & WOJDA, I. (2021) Current understanding of immune priming phenomena in insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 185, 107656. Elsevier.
- SULLIVAN, J.T. & SPENCE, J.V. (1994) Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ. *The Journal of parasitology*, 449–453. JSTOR.
- SUPEK, F., BOŠNJAK, M., ŠKUNCA, N. & ŠMUC, T. (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS one*, 6.
- SVENSSON, V., VENTO-TORMO, R. & TEICHMANN, S.A. (2018) Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. *Nature protocols*, 13, 599–604. Nature Publishing Group.
- TANG, F., BARBACIORU, C., WANG, Y., NORDMAN, E., LEE, C., XU, N., ET AL. (2009) mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature methods*, 6, 377–382. Nature Publishing Group.
- TASSETTO, M., KUNITOMI, M. & ANDINO, R. (2017) Circulating immune cells mediate a systemic RNAi-based adaptive antiviral response in *Drosophila*. *Cell*, 169, 314–325. e13. Elsevier.
- TAUBER, A.I. (1994) The immune self: theory or metaphor? *Immunology today*, 15, 134–136. Elsevier.
- TERCAN, H., RIKSEN, N.P., JOOSTEN, L.A., NETEA, M.G. & BEKKERING, S. (2021) Trained Immunity: Long-Term Adaptation in Innate Immune Responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41, 55–61. Am Heart Assoc.
- TETREAU, G., PINAUD, S., PORTET, A., GALINIER, R., GOURBAL, B. & DUVAL, D. (2017) Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate. *Frontiers in immunology*, 8, 1249.
- TETREAU, G.H., DHINAUT, J., GOURBAL, B. & MORET, Y. (2019) Trans-generational immune priming in invertebrates: Current knowledge and future prospects. *Frontiers in Immunology*, 10, 1938. Frontiers.
- THEODOR, J.L. (1970) Distinction between “self” and “not-self” in lower invertebrates. *Nature*, 227, 690–692. Nature Publishing Group.
- THÉRON, A., PAGES, J.-R. & ROGNON, A. (1997) *Schistosoma mansoni*: Distribution Patterns of Miracidia among *Biomphalaria glabrata* Snail as Related to Host Susceptibility and Sporocyst Regulatory Processes. *Experimental parasitology*, 85, 1–9. Elsevier.
- THERON, A., ROGNON, A., GOURBAL, B. & MITTA, G. (2014) Multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: a new approach of the *Biomphalaria*

- glabrata*/*Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, 80–88. Elsevier.
- TORRE, C., ABNAVE, P., TSOUMTSA, L.L., MOTTOLA, G., LEPOLARD, C., TROUPLIN, V., ET AL. (2017) *Staphylococcus aureus* promotes Smed-PGRP-2/Smed-setd8-1 methyltransferase signalling in planarian neoblasts to sensitize anti-bacterial gene responses during re-infection. *EBioMedicine*, 20, 150–160. Elsevier.
- TUCKER, M.S., LEWIS, F.A., DRIVER, J.D. & GRANATH JR, W.O. (2014) Determination and quantification of *Schistosoma mansoni* cercarial emergence from *Biomphalaria glabrata* snails. *The Journal of Parasitology*, 100, 778–783. American Society of Parasitologists.
- TWEEDIE, S., CHARLTON, J., CLARK, V. & BIRD, A. (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Molecular and cellular biology*, 17, 1469–1475. Am Soc Microbiol.
- VAN DER KNAAP, W.P.W. & LOKER, E.S. (1990) Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitology Today*, 6, 175–182. Elsevier.
- VERJEE, M.A. (2019) Schistosomiasis: still a cause of significant morbidity and mortality. *Research and reports in tropical medicine*, 10, 153. Dove Press.
- VETVICKA, V., SIMA, P. & VANNUCCI, L. (2021) Trained immunity as an adaptive branch of innate immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 10684. MDPI.
- VILCINSKAS, A. (2016) The role of epigenetics in host–parasite coevolution: lessons from the model host insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum*. *Zoology*, 119, 273–280. Elsevier.
- WANG, G., ZHANG, S. & WANG, Z. (2009) Responses of alternative complement expression to challenge with different combinations of *Vibrio anguillarum*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: evidence for specific immune priming in amphioxus *Branchiostoma belcheri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 33–39. Elsevier.
- WANG, R., ZHANG, P., WANG, J., MA, L., SUO, S., JIANG, M., ET AL. (2022) Construction of a cross-species cell landscape at single-cell level. *Nucleic Acids Research*.
- WANG, S. & JACOBS-LORENA, M. (2013) Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends in biotechnology*, 31, 185–193. Elsevier.
- WANG, W., WANG, L. & LIANG, Y.-S. (2012) Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitology research*, 111, 1871–1877.
- WANG, X., HE, Y., ZHANG, Q., REN, X. & ZHANG, Z. (2021) Direct comparative analyses of 10X genomics chromium and smart-seq2. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 19, 253–266. Elsevier.
- WANG, Z., ZHANG, L., ZHANG, D., SUN, R., WANG, Q. & LIU, X. (2015) Glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose suppresses carcinogen-induced rat hepatocarcinogenesis by restricting cancer cell metabolism. *Molecular medicine reports*, 11, 1917–1924. Spandidos Publications.
- WARBURG, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309–314. JSTOR.
- WARBURG, O., WIND, F. & NEGELEIN, E. (1927) The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, 8, 519. The Rockefeller University Press.
- WATSON, F.L., PÜTTMANN-HOLGADO, R., THOMAS, F., LAMAR, D.L., HUGHES, M., KONDO, M., ET AL. (2005) Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, 309, 1874–1878. American Association for the Advancement of Science.
- WEAVERS, H., EVANS, I.R., MARTIN, P. & WOOD, W. (2016) Corpse engulfment generates a molecular memory that primes the macrophage inflammatory response. *Cell*, 165, 1658–1671. Elsevier.

- WEBSTER, J.P., GOWER, C.M., KNOWLES, S.C., MOLYNEUX, D.H. & FENTON, A. (2016) One health—an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evolutionary applications*, 9, 313–333. Wiley Online Library.
- WENDT, G., ZHAO, L., CHEN, R., LIU, C., O'DONOGHUE, A.J., CAFFREY, C.R., ET AL. (2020) A single-cell RNA-seq atlas of *Schistosoma mansoni* identifies a key regulator of blood feeding. *Science*, 369, 1644–1649. American Association for the Advancement of Science.
- WHEELER, D.L., BARRETT, T., BENSON, D.A., BRYANT, S.H., CANESE, K., CHETVERNIN, V., ET AL. (2007) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 36, D13–D21. Oxford University Press.
- WILKINSON, J.H. & WALTER, S.J. (1972) Oxamate as a differential inhibitor of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Enzyme*, 13, 170–176. Karger Publishers.
- WILLIS, A.R., SUKHDEO, R. & REINKE, A.W. (2021) Remembering your enemies: mechanisms of within-generation and multigenerational immune priming in *Caenorhabditis elegans*. *The FEBS Journal*, 288, 1759–1770. Wiley Online Library.
- WITTEVELDT, J., CIFUENTES, C.C., VLAK, J.M. & VAN HULTEN, M.C. (2004) Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of virology*, 78, 2057–2061. Am Soc Microbiol.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017) Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers. World Health Organization.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2018) Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva. *World Health Organization*.
- WU, X.-J., DINGUIRARD, N., SABAT, G., LUI, H., GONZALEZ, L., GEHRING, M., ET AL. (2017) Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. *PLoS pathogens*, 13, e1006081. Public Library of Science San Francisco, CA USA.
- WU, X.-J., SABAT, G., BROWN, J.F., ZHANG, M., TAFT, A., PETERSON, N., ET AL. (2009) Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 164, 32–44. Elsevier.
- YAMAWAKI, T.M., LU, D.R., ELLWANGER, D.C., BHATT, D., MANZANILLO, P., ARIAS, V., ET AL. (2021) Systematic comparison of high-throughput single-cell RNA-seq methods for immune cell profiling. *BMC genomics*, 22, 1–18. BioMed Central.
- YAN, J., ZHAO, N., YANG, Z., LI, Y., BAI, H., ZOU, W., ET AL. (2020) A trade-off switch of two immunological memories in *Caenorhabditis elegans* reinfected by bacterial pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 295, 17323–17336. ASBMB.
- YANG, M., DARWISH, T., LARRAUFIE, P., RIMMINGTON, D., CIMINO, I., GOLDSPIK, D.A., ET AL. (2021) Inhibition of mitochondrial function by metformin increases glucose uptake, glycolysis and GDF-15 release from intestinal cells. *Scientific Reports*, 11, 1–20. Nature Publishing Group.
- YANG, Z. & MING, X.-F. (2014) Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Frontiers in immunology*, 5, 533. Frontiers Media SA.
- YAO, C.-H., LIU, G.-Y., WANG, R., MOON, S.H., GROSS, R.W. & PATTI, G.J. (2018) Identifying off-target effects of etomoxir reveals that carnitine palmitoyltransferase I is essential for cancer cell proliferation independent of  $\beta$ -oxidation. *PLoS biology*, 16, e2003782. Public Library of Science San Francisco, CA USA.

- YOSHINO, T.P. & BAYNE, C.J. (1983) Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasite immunology*, 5, 317–328. Wiley Online Library.
- YOSHINO, T.P., BROWN, M., WU, X.-J., JACKSON, C.J., OCADIZ-RUIZ, R., CHALMERS, I.W., ET AL. (2014) Excreted/secreted *Schistosoma mansoni* venom allergen-like 9 (SmVAL9) modulates host extracellular matrix remodelling gene expression. *International journal for parasitology*, 44, 551–563. Elsevier.
- YOSHINO, T.P., WU, X.-J., GONZALEZ, L.A. & HOKKE, C.H. (2013) Circulating *Biomphalaria glabrata* hemocyte subpopulations possess shared schistosome glycans and receptors capable of binding larval glycoconjugates. *Experimental parasitology*, 133, 28–36. Elsevier.
- YOSHINO, T.P., WU, X.J. & LIU, H.D. (1998) Transfection and heat-inducible expression of molluscan promoter-luciferase reporter gene constructs in the *Biomphalaria glabrata* embryonic snail cell line. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 59, 414–420. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- YU, J.J. & GAFFEN, S.L. (2008) Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci*, 13, 170–177.
- ZAGORAIOU, L., DRABEK, D., ALEXAKI, S., GUY, J.A., KLINAKIS, A.G., LANGEVELD, A., ET AL. (2001) In vivo transposition of Minos, a Drosophila mobile element, in mammalian tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 11474–11478. National Acad Sciences.
- ZAHOOR, Z., DAVIES, A.J., KIRK, R.S., ROLLINSON, D. & WALKER, A.J. (2010) Larval excretory-secretory products from the parasite *Schistosoma mansoni* modulate HSP70 protein expression in defence cells of its snail host, *Biomphalaria glabrata*. *Cell Stress and Chaperones*, 15, 639–650. Springer.
- ZELCK, U. & BECKER, W. (1992) *Biomphalaria glabrata*: influence of calcium, lectins, and plasma factors on in vitro phagocytic behavior of hemocytes of noninfected or *Schistosoma mansoni*-infected snails. *Experimental parasitology*, 75, 126–136. Elsevier.
- ZHANG, S.-M., ADEMA, C.M., KEPLER, T.B. & LOKER, E.S. (2004) Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science*, 305, 251–254. American Association for the Advancement of Science.
- ZHANG, S.-M., BU, L., LAIDEMITT, M.R., LU, L., MUTUKU, M.W., MKOJI, G.M. & LOKER, E.S. (2018) Complete mitochondrial and rDNA complex sequences of important vector species of *Biomphalaria*, obligatory hosts of the human-infecting blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Scientific reports*, 8, 1–10. Nature Publishing Group.
- ZHANG, S.-M. & LOKER, E.S. (2003) The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 175–187. Elsevier.
- ZHANG, S.-M. & LOKER, E.S. (2004) Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Gene*, 341, 255–266. Elsevier.
- ZHANG, S.-M., LOKER, E.S. & SULLIVAN, J.T. (2016) Pathogen-associated molecular patterns activate expression of genes involved in cell proliferation, immunity and detoxification in the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 56, 25–36. Elsevier.
- ZHANG, S.-M., NIAN, H., ZENG, Y. & DEJONG, R.J. (2008) Fibrinogen-bearing protein genes in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of two novel genes and expression studies during ontogenesis and trematode infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 32, 1119–1130. Elsevier.



- ZHANG, S.-M., ZENG, Y. & LOKER, E.S. (2007) Characterization of immune genes from the schistosome host snail *Biomphalaria glabrata* that encode peptidoglycan recognition proteins and gram-negative bacteria binding protein. *Immunogenetics*, 59, 883–898. Springer.
- ZHANG, S.-M., ZENG, Y. & LOKER, E.S. (2008) Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*. *Innate immunity*, 14, 175–189. SAGE Publications Sage UK: London, England.
- ZHANG, T., QIU, L., SUN, Z., WANG, L., ZHOU, Z., LIU, R., ET AL. (2014) The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 45, 141–150. Elsevier.
- ZHANG, X., LI, T., LIU, F., CHEN, Y., YAO, J., LI, Z., ET AL. (2019) Comparative analysis of droplet-based ultra-high-throughput single-cell RNA-seq systems. *Molecular cell*, 73, 130-142. e5. Elsevier.
- ZHANG, Y., XU, S., JIANG, N., TANG, H., DONG, H. & ZHAO, Q.-P. (2021) Morphology and activities of cell populations of haemocytes in *Oncomelania hupensis* following *Schistosoma japonicum* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181, 107590. Elsevier.
- ZHU, L., DAO, J., DU, X., LI, H., LU, K., LIU, J. & CHENG, G. (2015) Altered levels of circulating miRNAs are associated *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Parasites & vectors*, 8, 1–11. BioMed Central.
- ZIELKE, N., EDGAR, B.A. & DEPAMPHILIS, M.L. (2013) Endoreplication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5, a012948. Cold Spring Harbor Lab.

# ANNEXE 1

**Présentation de posters:** International congress of invertebrate pathology and 53rd annual meeting of the society for invertebrate pathology (SIP) and 18<sup>th</sup> ecology and evolution of infectious diseases meeting.

**Présentation orale:** International congress of parasitology (ICOPA)

## **A Single Cell RNA sequencing approach to characterize *Biomphalaria glabrata* hemocyte responses in innate immune memory process.**

Rémi Pichon<sup>1</sup>, Silvain Pinaud<sup>1</sup>, Maud Laffitte<sup>1</sup>, Cristian Chaparro<sup>1</sup>, Emmanuel Vignal<sup>1</sup>, Guillaume Charrière<sup>1</sup>, David Duval<sup>1</sup>, Richard Galinier<sup>1</sup>, Benjamin Gourbal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hosts Pathogens Environments Interactions, UMR 5244, CNRS, IFREMER, UM, University of Perpignan Via Domitia, F-66860 Perpignan, France.

The innate immune system of *B. glabrata* showed memory capacities especially when confronted to *S. mansoni*, the agent of human intestinal schistosomiasis. This innate immune memory (IIM) process is still an extremely complex black box in which the hemocytes, the innate immune cells of *B. glabrata* seem to play a fundamental role. Unfortunately, hemocytes are still poorly defined, three populations have been described based on their morphological characteristics: the hyalinocytes, the granulocytes, and the blast like cells. Herein, we propose to evaluate the complex processes played by hemocyte populations in IIM. Thus, we used Single-Cell RNA sequencing technology to analyse the hemocyte transcriptional response following *S. mansoni* experimental infestation and re-infestation. This approach permitted to discriminate transcriptional infra-populations and trajectories of differentiation. Therefore, we are able to define specific genes related to each hemocyte population and conduct functional enrichment analysis to define hemocyte population sub-functionalization and molecular processes supporting IIM. Finally, using such specific molecular markers, it would be possible to associate transcriptional populations and morphological populations and defined more accurately which and how hemocyte populations could be recorded, stored and activated an efficient IIM response in *B. glabrata* snails.

Key words: ScRNA seq; *B. glabrata*; *S. mansoni*; hemocytes; Innate immune memory

# A Single Cell RNA sequencing approach to characterize *Biomphalaria glabrata* hemocyte responses in innate immune memory process

Rémi Pichon<sup>1</sup>, Silvain Pinaud<sup>1</sup>, Maud Laffitte<sup>1</sup>, Cristian Chaparro<sup>1</sup>, Emmanuel Vignal<sup>1</sup>, Guillaume Charrière<sup>1</sup>, David Duval<sup>1</sup>, Richard Galinier<sup>1</sup>, Benjamin Gourbal<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Hosts Pathogens Environments Interactions, UMR 5244, CNRS, IFREMER, UM, University of Perpignan Via Domitia F-66860 Perpignan, France.

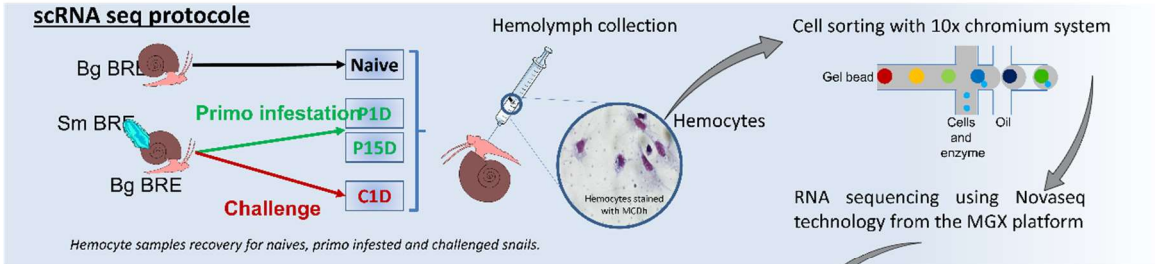
One world – One health – One ocean



## First molecular characterization of *B. glabrata* hemocyte populations at a single cell level

In the early 2000's, several studies have highlighted the ability of invertebrates immune system to be primed, protecting the individual when meets the same pathogen twice during its life span, this process is called « innate immune memory » (IIM). This IIM has recently been demonstrated for *B. glabrata* snails against *S. mansoni* infestation and it is characterized by a shift from a cellular response to a humoral response, certainly carried by the snail innate immune cells, the hemocytes.

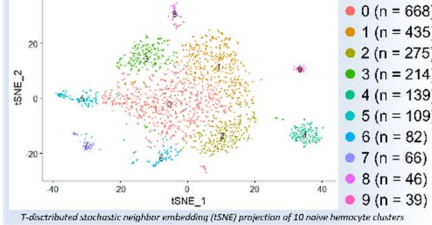
**Objectives** : Identify hemocyte sub-populations of *B. glabrata* involved in IIM response towards *S. mansoni* parasite based on different transcriptomic profiles using Single-Cell RNA sequencing technology



*Hemocyte samples recovery for naives, primo infested and challenged snails.*

*In silico analysis using Cell ranger and Seurat*

### Hemocyte transcriptomic populations

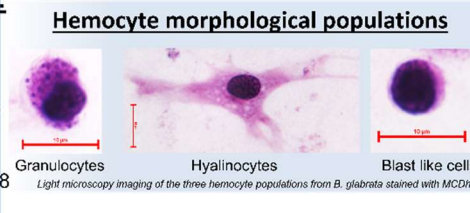


*T-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) projection of 10 naive hemocyte clusters*

### Results in number :

Genome mapping rate : 90,1%  
 Recovered cells : 2 073  
 Unique genes detected : 16 926  
 Median genes per cell : 1 885  
 Number of reads : 185 257 268

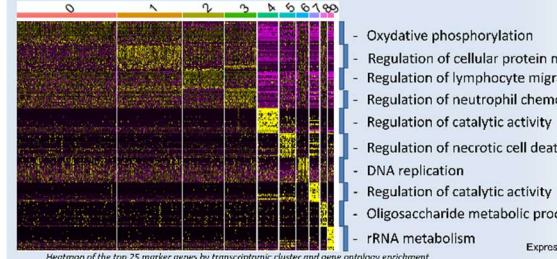
### Hemocyte morphological populations



*Light microscopy imaging of the three hemocyte populations from B. glabrata stained with MCDh*

Enrichment analysis using Gene Ontology annotation allowed us to determine the functions associated with each transcriptomic population, based on gene markers.

### Transcriptomic populations and gene markers

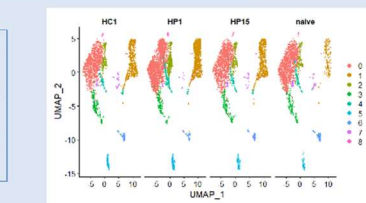


*Heatmap of the top 25 marker genes by transcriptomic cluster and gene ontology enrichment*

Use of scRNA seq allows us to demonstrate a greater hemocyte population diversity. **10** Transcriptomic populations are defined among the **3** hemocyte morphological populations

### Sample data integration and *in vivo* validation

Integration of all data may allow us to identify the transcriptomic populations able to respond to the infection and thus support IIM.



*Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) projection of the entire kinetic of infestation en re infestation*

Two technics will be used to make the link between hemocyte transcriptional and morphological populations :

- Flow cytometry technique : sorting hemocytes based on morphological characteristics and test each population using qPCR for expression of gene markers previously identified by scRNA.
- In Situ Hybridization (ISH) targeting scRNA gene markers on hemocytes.

Acknowledgements: this work is supported by « BQR » grant of the University of Perpignan Via Domitia



# ANNEXE 2


## Présentation de poster : Congrès des doctorants de l'Université de Perpignan 2022.

One world – One health – One ocean


### Développement de nouvelles techniques de transgénèse sur le mollusque *Biomphalaria glabrata* vecteur de la bilharziose intestinale

**Rémi Pichon**  
Contact : remi.pichon@univ-perp.fr

Laboratoire Interactions Hôtes Pathogènes Environnements, UMR 5244, CNRS, IFREMER, UM, Université de Perpignan  
Via Domitia F-66860 Perpignan, France.



Interactions - Hôtes - Pathogènes - Environnements



Ecole Doctorale

---


### Premières expériences de micro-injection dans des œufs et cellules Bge de mollusques *Biomphalaria glabrata*

Le développement de telles techniques de transgénèse utilisant des transposons n'a, à ce jour, jamais été réalisé sur le modèle d'étude *B. glabrata*. Un laboratoire de l'IGFL de Lyon, dirigé par le Pr Michalis Averof, s'est spécialisé dans ce domaine d'étude et à su développer avec succès des approches de transgénèse par micro-injection dans des œufs de *Parhyale hawaiiensis*. Nous cherchons donc, au laboratoire IHPE, en collaboration avec ce laboratoire lyonnais, à apprendre, développer et utiliser ces nouvelles techniques de modification du génome sur le mollusque *Biomphalaria glabrata*.


---

### Objectifs : Acquérir les savoir-faire et techniques indispensables à l'utilisation des matériels nécessaires au développement d'outils de transgénèse sur le modèle mollusque *Biomphalaria glabrata*.

---

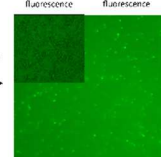


**Michalis Averof**  
Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon (IGFL) UMR 5242  
Equipe comparative Developmental Biology and Regeneration



#### Le laboratoire d'accueil et le matériel moléculaire nécessaire aux approches de transgénèse

Grâce au matériel moléculaire fourni par l'équipe de Lyon, nous avons réalisé avec succès les premières transfections sur cellules Bge. Le promoteur inclus dans le plasmide et la transfection par lipofectan fonctionnent (ARNm et ADN plasmidique).



Premiers tests de transfection sur les cellules Bge

Ou ARNm et ADN

ARNm Transposase

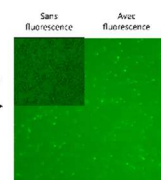
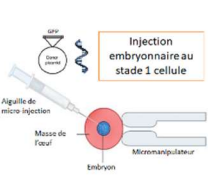
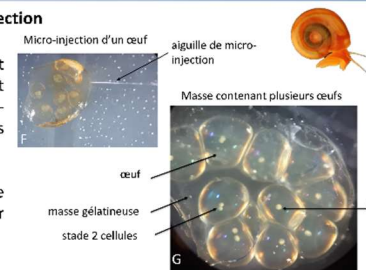


Figure: cellule Bge exprimant la GFP

---

#### Matériels et méthodes de la micro-injection de l'IGFL

La micro-injection sur embryon au stade 1 cellule demande l'utilisation d'aiguilles de quartz et un meulage (Fig. A et B) particulier. Ces aiguilles sont montées sur une loupe (Fig. C) et un micro-manipulateur (Fig. D) pour réaliser les micro-injections (Fig. E).

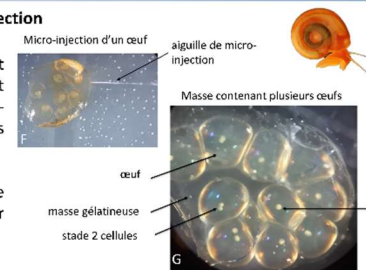
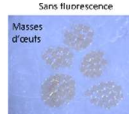



---

#### Les premiers résultats de micro-injection

Les aiguilles en quartz (Fig. F) et le meulage de ces dernières se sont révélés indispensables à la micro-injection à travers les masses d'œufs chez *Biomphalaria* (Fig. G).

Il est cependant très complexe d'approcher l'embryon pour injecter directement dans les cellules.

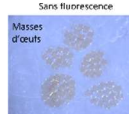



Une injection directe dans l'embryon semble trop complexe dans ce modèle mollusque mais l'utilisation d'un dextran fluorescent de 10kDa est capable d'atteindre les cellules de l'embryon lorsqu'il est injecté dans l'œuf (Fig. H et I).

---

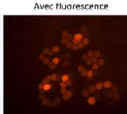
#### Mesure de la survie des mollusques injectés

Sans fluorescence




Masses d'œufs

Avec fluorescence

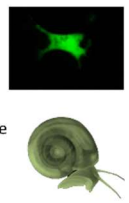


Sans fluorescence



Mollusque juvénile

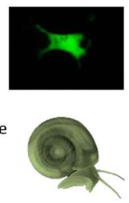
Avec fluorescence



Grâce aux outils et techniques du laboratoire de Lyon, nous avons été capable, pour la première fois, d'injecter dans des embryons au stade une cellule et de n'avoir aucune mortalité. Le dextran persiste même dans certaines cellules après éclosion.









#### Les défis futurs

- Co-transfections sur cellules Bge
- Création d'une lignée Bge fluorescente
- Micro-injections dans l'œuf d'ADN plasmidique et d'ARNm avec ou sans lipofectan
- Création d'une lignée de mollusques GFP



---

Remerciements: Ce travail est soutenu par l'école doctorale énergie environnement (ED305) de l'université de perpignan via domitia

Mise en page : Anais Bordes



## **ANNEXE 3**



Article

# A New Assessment of Thioester-Containing Proteins Diversity of the Freshwater Snail *Biomphalaria glabrata*

David Duval, Remi Pichon , Damien Lassalle , Maud Laffitte, Benjamin Gourbal  and Richard Galinier \* 

IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, 66860 Perpignan, France; david.duval@univ-perp.fr (D.D.); remi.pichon@univ-perp.fr (R.P.); damien.lassalle@univ-perp.fr (D.L.); maud.laffitte01@etu.umontpellier.fr (M.L.); benjamin.gourbal@univ-perp.fr (B.G.)

\* Correspondence: richard.galinier@univ-perp.fr

Received: 26 November 2019; Accepted: 20 December 2019; Published: 7 January 2020



**Abstract:** Thioester-containing proteins (TEPs) superfamily is known to play important innate immune functions in a wide range of animal phyla. TEPs are involved in recognition, and in the direct or mediated killing of several invading organisms or pathogens. While several TEPs have been identified in many invertebrates, only one TEP (named BgTEP) has been previously characterized in the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*. As the presence of a single member of that family is particularly intriguing, transcriptomic data and the recently published genome were used to explore the presence of other BgTEP related genes in *B. glabrata*. Ten other TEP members have been reported and classified into different subfamilies: Three complement-like factors (BgC3-1 to BgC3-3), one  $\alpha$ -2-macroglobulin (BgA2M), two macroglobulin complement-related proteins (BgMCR1, BgMCR2), one CD109 (BgCD109), and three insect TEP (BgTEP2 to BgTEP4) in addition to the previously characterized BgTEP that we renamed BgTEP1. This is the first report on such a level of TEP diversity and of the presence of macroglobulin complement-related proteins (MCR) in mollusks. Gene structure analysis revealed alternative splicing in the highly variable region of three members (BgA2M, BgCD109, and BgTEP2) with a particularly unexpected diversity for BgTEP2. Finally, different gene expression profiles tend to indicate specific functions for such novel family members.

**Keywords:** *Biomphalaria glabrata*; Thioester-containing protein; alternative splicing; immunity; Schistosome

## 1. Introduction

Thioester-containing proteins (TEP) are large secreted proteins playing central roles in the innate immune response [1,2]. TEP are characterized by the presence of a unique intrachain  $\beta$ -cysteinyl- $\gamma$ -glutamyl thioester bond (CGEQ) originally discovered in the human protease inhibitor,  $\alpha$ -2-macroglobulin (A2M), and complement C3 and C4 [3]. A2M are pan-protease suicide inhibitors that encapsulate targets after protease cleavage activation, leading to neutralization of targeted protease activity [4–8]; whereas complement factors deposit on target surfaces following activation, enabling the subsequent elimination or killing of the pathogens [9–11].

Phylogenetic analyses classified TEP proteins in two distinct groups, the complement factor and A2M depending on the presence of two domains, anaphylotoxin and C345C. The complement factor group is composed of vertebrate C3, C4, and C5 components and their orthologues (complement-like factors) in invertebrates. The A2M group comprises several closely related molecules:  $\alpha$ -2-macroglobulin (A2M), macroglobulin complement-related protein (MCR), pregnancy zone protein (PZP), C3/PZP-like/A2M domain containing 8 (CPAMD8), antigen CD109 (CD109), and insect TEP (iTep) [12].



Since the increasing availability of molecular databases for Metazoa (from Cnidarians to Mammalians), the thioester-encoding regions were found in many genes, that help in a better definition of the thioester-containing protein family. This ancestral family of molecules is present in all animal phyla except Porifera (sponges) [12]. However, each TEP type is not always recovered in all phyla. For example, seven members of this family are encoded in the human genome: Three complement factors (C3, C4, and C5), A2M, PZP, CD109, and CPAMD8. At the opposite, *Drosophila melanogaster* encodes solely six members, five iTTEP, and one MCR [13–15]. The question of the origin and evolution of TEP was raised by several studies [1,12]. Indeed, iTTEP was only found for Protostomia, MCR was, until now, only reported for arthropods, whereas complement factor TEP was never found in available insect genomes while present in all other arthropod groups. If vertebrate genomes are relatively well documented, data from invertebrates are too fragmentary to have a clear view of TEP gene distribution among them. Thus, additional data of TEP family member characterizations from organisms belonging to seldom documented phyla would be mandatory for a better understanding of TEP origin and evolution.

Among invertebrates, TEPs were most deeply studied in insect group, especially in flies and mosquitos, with *Anopheles gambiae* TEP1 (AgTEP1) being the only TEP for which a crystal structure was resolved [16]. Several TEPs were also characterized in other arthropod species, like in the Tick *Ixodes ricinus*, for which most of the TEP classes, including C3-like complement factors, A2M, MCR, and iTTEP were described [17]. In *D. melanogaster*, iTTEP and MCR are induced upon bacterial, fungal, and parasitic challenges [1,14,15,18–20]. In mosquito, AgTEP1 was shown to be able to directly bind malaria parasite and to promote their elimination [21,22], while *Aedes aegypti* iTTEP have been shown to regulate *Flavivirus* infection [23,24]. Finally, the Mollusca phylum has been seldom explored, CD109 molecule was characterized in the cephalopod *Euprymna scolopes* [25], two bivalve species were reported to contain A2M, iTTEP, and C3-like complement factor [26–28], and more recently five TEP members belonging to C3-like complement factors, A2M, and CD109 classes have been identified in the gastropod *Littorina littorea* [29]. However, only few data are available concerning the functional role of such TEP proteins in mollusc phylum.

The freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Bg) is the intermediate host of the trematode parasite *Schistosoma mansoni*, the agent of human intestinal schistosomiasis. As such, many studies have been conducted on the immunobiological interactions between these two protagonists [30–32]. In this host–parasite interaction was defined the compatible/incompatible status of the so-called compatibility polymorphism [33–36] that resulted from the co-evolutionary arm race between host and parasite [37]. Compatibility polymorphism can be defined as follow: A specific *B. glabrata* strain harbors variable degrees of susceptibility toward different parasite strains, whereas a defined *S. mansoni* strain presents different levels of virulence/infectivity toward different *B. glabrata* strains. Several studies have thus investigated key molecules of snail immune system and parasite virulence factors in order to decipher the molecular dialogue between *B. glabrata* and *S. mansoni*, and to explain this compatibility polymorphism phenotype [30,38–43]. Among the snail immune determinants playing a role in the host–parasite interplay, proteomic analyses have demonstrated the presence of a thioester-containing protein (BgTEP) within an immune complex formed by parasite antigen and snail immune recognition receptor [39,44]. A recent study characterized this BgTEP as being similar to insect TEP, secreted by hemocytes, expressed following immune challenges, and able to bind to different pathogen teguments including the parasite *S. mansoni* [45]. Binding of full-length and processed forms toward such pathogens, suggests important immune functions and potential opsonizing role [45]. In addition, a protease inhibitor activity of this BgTEP following proteolytic cleavage was previously provided by several biochemical studies, and more particularly against a cysteine proteinase secreted by *S. mansoni* [46–48]. Altogether, these results suggested a potential dual function of BgTEP as protease inhibitor and potential opsonin involved in snail immune response [45].

In the present study, we used transcriptomic data, as well as the *B. glabrata* recently published genome [49], to explore the diversity of TEP family members in the snail *B. glabrata*. We described

10 additional members of TEP family, based on the presence of thioester and A2M domains. We subsequently performed a phylogenetic analysis to classify these molecules and analyzed their exon-intron structures. We also determined the tissue expression pattern of BgTEP genes by quantitative PCR.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ethical Statements

Our laboratory holds permit # A66040 for experiments on animals, which was obtained from the French Ministry of Agriculture and Fisheries and the French Ministry of National Education, Research, and Technology. The housing, breeding, and care of the utilized animals followed the ethical requirements of our country. The experimenter possesses an official certificate for animal experimentation from both of the above-listed French ministries (Decree # 87–848, 19 October 1987). The various protocols used in this study have been approved by the French veterinary agency of the DRAAF Languedoc-Roussillon (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt), Montpellier, France (authorization # 007083).

### 2.2. Database Mining, Gene Identification, and Sequence Analysis

The transcriptomes corresponding either to naïve [50] (NCBI BioProject PRJNA213050) or to *S. mansoni* infected [51] snails from Brazil (BgBre1) (Recife, Brazil), and whole-genome sequence databases of *B. glabrata* [49] were screened to search for the presence of A2M (pfam00207) and/or thioester-containing (cd02897) domains to identify TEP related genes. When only partial transcripts were obtained from transcriptomic data for a given gene, the lacking portions of cDNA were confirmed by standard PCR amplification to complete cDNA sequences.

Then, genomic structures of the corresponding genes were determined using VectorBase database (<https://www.vectorbase.org/organisms/biomphalaria-glabrata>).

Open reading frames for each gene and their encoded amino acid sequences were determined using Translate tool from the Expasy Bioinformatics Resource Portal of the Swiss Institute of Bioinformatics (<https://web.expasy.org/translate/>).

Conserved protein domains were searched using SMART tool [52,53] from the European Molecular Biology Laboratory (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Signal peptide sequences were predicted using both SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) and Interproscan. Transmembrane domains were predicted using the TMHMM Server version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), whereas glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor sites were predicted using the GPI-SOM Server (<http://gpi.unibe.ch/>). Amino acid sequence alignments between all TEP proteins were generated by BioEdit software version 7.1.3.0 using ClustalW multiple alignment.

### 2.3. RNA Extraction and Quantitative RT-PCR Analysis

Tissues were collected from 9 individual *B. glabrata* snails (Brazilian strain, Recife) under binocular microscope dissection. Albumen gland, head-foot, intestine, stomach, hepatopancreas, and ovotestis were recovered. Six hemocyte samples were each recovered by pooling the hemolymph of 20 snails followed by a 10 min centrifugation at 10,000× *g*. Total RNA was then extracted with TRIzol reagent (Sigma Life Science, Saint Louis, Missouri, USA) according to manufacturer's instructions and subsequently reverse transcribed to first strand cDNA from oligo dT using Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) according to manufacturer's instructions.

Quantitative PCR analyses were performed with the LightCycler 480 System (Roche, Basel, Switzerland) in a 10 µL volume comprising 2 µL of cDNA diluted to 1:30 with ultrapure-water, 5 µL of No Rox SYBR Master Mix blue dTTP (Takyon Eurogentec, Liege, Belgium), 1 µL of ultrapure-water, and 10 µM of each primer. Each couple of primers used in this study has been tested to determine

the exponential and efficiency of PCR reaction. PCR amplification efficiencies were established for each target and house-keeping gene by calibration curves using two times serial dilutions of cDNA (from 1/20 to 1/640) in triplicates. Amplification efficiencies were calculated using slope values of the log-linear portion of the calibration curves by the LightCycler 480 Software release 1.5 (Roche). As a result, only the primer couples presenting a PCR amplification efficiency of 2 were retained for the study (Table S1). None of the primer used for quantification of gene expression was designed in region submitted to alternative splicing. The cycling program is as follows: Denaturation step at 95 °C for 2 min, 45 cycles of amplification (denaturation at 95 °C for 10 s, annealing and elongation together at 60 °C for 45 s) with single fluorescence acquisition at the end of each amplification cycle. Q-PCR was ended by a melting curve step from 65 °C to 97 °C with a heating rate of 0.11 °C/s and continuous fluorescence measurement. For each reaction, the cycle threshold (Ct) was determined using the 2nd derivative method of the LightCycler 480 Software release 1.5 (Roche). PCR experiments were performed in triplicate (technical replicates) from each biological replicate. The mean value of Ct was calculated. Corrected melting curves were checked using the Tm-calling method of the LightCycler 480 Software release 1.5. The relative expression of each TEP gene was calculated with the  $\Delta\Delta C_t$  method as the efficiency of both couple of primers (target and housekeeping genes) presented the same PCR amplification efficiency. Results were normalised with respect to a housekeeping gene: The S19 ribosomal protein gene, as previously described [45].

#### 2.4. PCR Analysis of BgTEP2 Isoforms

According to BgTEP2 cDNA sequence, a couple of primer (F1: 5'-ACTACGGAGGCAGTGATGC-3'; R1: 5'-GATAGTATCTGGTACTGTTGC-3') designed in non-variable parts of the sequence and framing the highly variable region was used to detect all the different alternatively spliced isoforms of BgTEP2 from snail tissues prepared as described above. Then, 1  $\mu$ L of a 1:30 dilution of cDNA was used as template amplification with primers F1 and R1 using the GoTaq G2 HotStart enzyme (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in a 50  $\mu$ L final reaction, according to the manufacturer's instructions. PCR reaction was performed in a Biometra TOne thermocycler (Analytik Jena AG, Jena, Thuringia, Germany), using the following cycling program: Initial denaturation 3 min at 95 °C, 45 cycles of amplification (denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 20 s), final elongation of 2 min at 72 °C. Then, 20  $\mu$ L of the resulting PCR were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel. Another couple of primer targeting the cDNA coding for the ribosomal protein S19 was used as a positive control of PCR amplification (S19F: 5'-TTCTGTTGCTCGCCAC-3'; S19R: 5'-CCTGTATTTGCATCCTGTT-3').

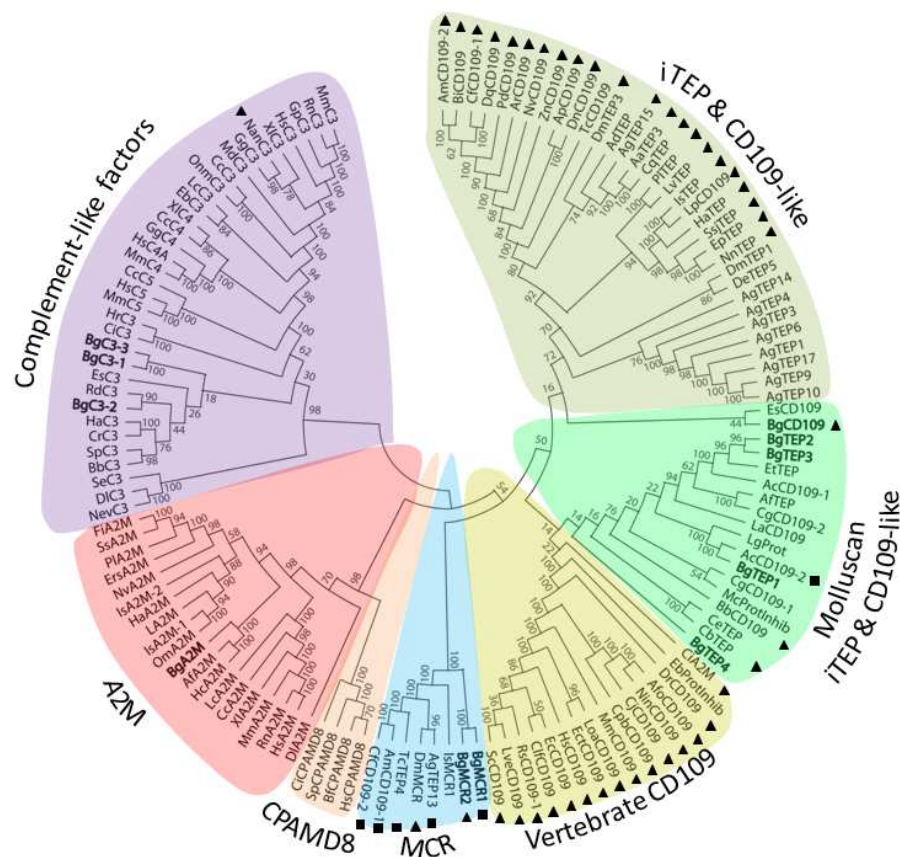
#### 2.5. Phylogenetic Analyses

Homologous amino acid sequences were identified using BLASTp searches against the GenBank non redundant database (Bethesda, MD, USA). Full length protein sequences covering a wide range of animal phyla were used for multiple sequence alignment with the Guidance 2 server (<http://guidance.tau.ac.il/ver2/>) using the MAFFT algorithm [54] (Figure S1). Phylogenetic analyses of these aligned sequences was performed by using the maximum likelihood method and Whelan And Goldman + Freq. model [55], with pairwise deletion option as gaps/missing data treatment. A bootstrap analysis of 1000 replications was carried out to assess the robustness of the tree branches. The tree with the highest log likelihood (−345,206.19) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying neighbor-join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete  $\gamma$  distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 1.5454)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 0.06% sites). This analysis involved 134 amino acid sequences. There were a total of 5324 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [56].

### 3. Results

#### 3.1. Phylogenetic Analysis of *B. glabrata* Thioester-Containing Proteins

Interproscan analysis of two snail transcriptomes was conducted to identify new TEP-related members and had revealed several positive transcripts that were assembled to generate a total of 11 TEP cDNA sequences (Figure S2). In order to investigate the relationship of the different snail TEP (BgTEPs) identified with various orthologous sequences recovered from other animal species, a phylogenetic analysis was performed using 123 other sequences (Table S2). Amino-acid sequences of full-length TEP superfamily proteins from both vertebrate and invertebrate phyla, including Complement-like factors, A2M, MCR, CPAMD8, iTEP, and CD109, and the 11 BgTEP sequences were used to construct a phylogenetic tree with the maximum likelihood method (Figure 1).



**Figure 1.** Phylogenetic tree of various thioester-containing protein (TEP) superfamily members. A total of 134 full-length protein sequences from diverse animal origin were used to construct the tree. A bootstrap analysis of 1000 replications was carried out on the tree inferred from the maximum likelihood method and the values are shown at each branch of the tree. BgTEPs are indicated in bold characters. Black triangles correspond to predicted glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor signal, while black square corresponds to C-terminal transmembrane helix. TEP subgroups are highlighted by different colors: Purple for complement-like factors, pink for A2M, orange for CPAMD8, blue for MCR, and shades of green for iTEP and CD109-like.

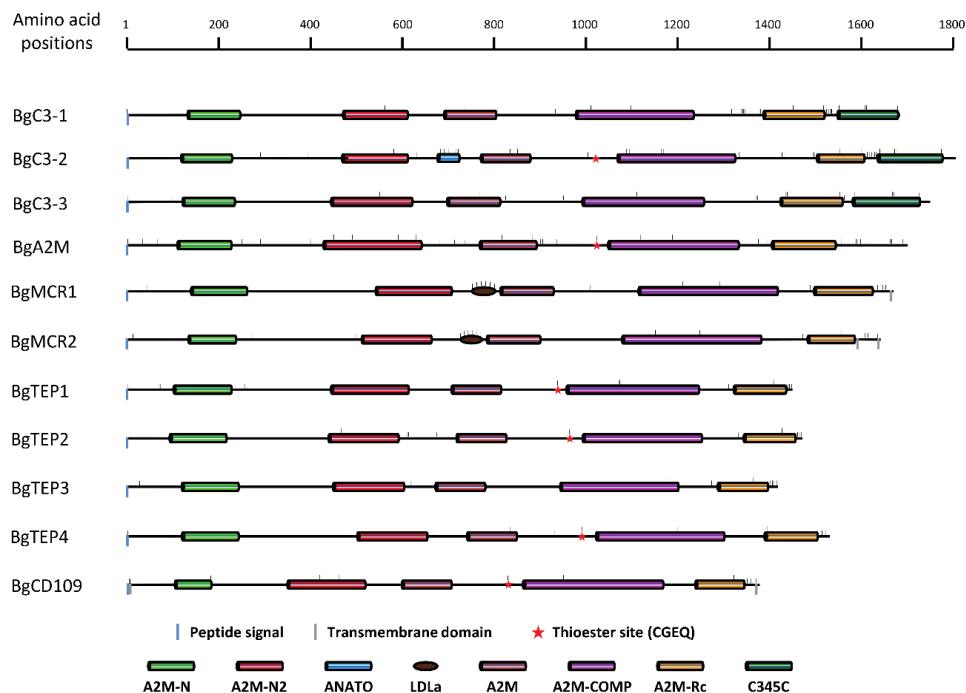
TEP molecules from *B. glabrata* belong to four clades of the TEP superfamily, and were named according to the actual nomenclature: (1) Complement-like factors (BgC3-1, BgC3-2, and BgC3-3), (2) Alpha2-macroglobulins (BgA2M), (3) Macroglobulin complement-related proteins (BgMCR1 and BgMCR2), and (4) insect TEP/CD109 molecules (BgTEP1, BgTEP2, BgTEP3, BgTEP4, and BgCD109). BgC3 molecules are close to the C3-like proteins from two other mollusk species, with BgC3-2 being more distant from BgC3-1 and BgC3-3 that clustered together. It is of note that a hypothetical transcripts

corresponding to incomplete BgC3-2 cDNA was previously identified from the *B. glabrata* genome publication [49]. BgA2M also clustered with the A2M members from other mollusks. The two BgMCR clustered together and are the first macroglobulin complement-related proteins reported from the Mollusca phylum. Between the four iTTEP, only BgTEP2 and BgTEP3 cluster together, while the two others are distributed among the cluster of molluscan iTTEP and CD109-like. It is noteworthy that the name of BgTEP1 was assigned to the sole BgTEP previously identified from *B. glabrata* [39,45]. The taxonomic position of BgCD109 is less clear as it is more distant from BgTEPs and clusters with the CD109 from the bobtail squid *E. scolopes* (EsCD109).

As vertebrate CD109 are characterized by the presence of GPI-anchoring site, we looked for the presence of such GPI-anchor signal prediction as well as C-terminal transmembrane helix prediction in all the TEP members used in this analysis. This confirmed the presence of GPI-anchor site in vertebrate CD109, but also in numerous invertebrate molecules either named CD109-like or iTTEP, including BgCD109. Most of the GPI-anchor site predicted molecules tend to form a specific cluster sustained by a bootstrap value of 92%. Another notable result is that iTTEP and CD109-like molecules from mollusks tend to form a specific cluster separated from other invertebrate iTTEP and CD109. Such classification has been previously highlighted [45] but is not well supported by bootstrap values, and need to be validated by an analysis including much more TEP members from Mollusca phylum.

### 3.2. BgTEP Protein Features Analysis

To confirm taxonomic positions revealed by the phylogenetic analysis, we investigated for the presence of evolutionary conserved domains in the BgTEP amino acid sequences using SMART tool. Figure 2 shows an overview of the protein domain organization for each TEP member. All BgTEP candidates possess a signal peptide meaning that all these molecules are secreted. Several conserved domains (A2M-N, A2M-N2, A2M, A2M-complement, and A2M-Receptor binding domain) defining the A2M proteins were also recovered in BgA2M with the similar organization. In addition, A2M proteins include the presence of a highly variable bait region, which determines the specificity of these protease inhibitors [57].



**Figure 2.** Schematic representation of BgTEP protein domains organization. Colored rectangles correspond to SMART conserved domains with following accession number: N-terminal alpha2-macroglobulin domain (A2M-N, PF01835), N-terminal  $\alpha$ -2-macroglobulin domain2 (A2M-N2,

SM001359), anaphylotoxin domain (ANATO, SM000104), low-density lipoprotein receptor domain class A (LDLa, SM000192),  $\alpha$ -2-macroglobulin domain (A2M, SM001360),  $\alpha$ -2-macroglobulin complement domain (A2M-COMP, PF07678),  $\alpha$ -2-macroglobulin receptor-binding domain (A2M-Rc, SM001361), Netrin C-terminal domain (C345C, SM000643). Blue and grey vertical bar positioned under the main horizontal line respectively correspond to peptide signal and transmembrane helix predictions. Small horizontal bars positioned above the main lines correspond to cysteine positions in BgTEP protein sequences.

The other TEP superfamily members are defined by the presence of conserved domains similar to the A2M, but also possess additional features or domains. Indeed, TEP complement factors possess an extra C-terminal C345C domain characterized by four conserved cysteine residues that are likely to form internal disulphide bonds [58]; this domain was recovered in our three BgC3 (See Figure 2 and Figure S3). On the other hand, the anaphylotoxin domain and the arginine-rich region, two other specific features of C3-like molecules, were only recovered for BgC3-2 and not for BgC3-1 and BgC3-3 (Figure S3). The anaphylotoxin domain is characterized by a stretch of six cysteines, and the arginine-rich region is a classic posttranslational proteolytic cleavage site where C3 molecules could be cut into  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain by respective serine protease [59,60]. Furthermore, the canonical CGEQ thioester site is mutated in BgC3-1 and BgC3-3 protein sequences, which clearly indicates that these two members cannot bind target molecules via a functional thioester bond.

MCR molecules contain an additional low-density lipoprotein receptor domain class A (LDLa domain), in place of (i) the anaphylotoxin domain harbored by the complement factors or (ii) the A2M bait region [15]. This LDLa domain constituted by a cysteine-rich repeat typical from the N-terminal part of LDL receptor involved in lipoproteins binding is present in each BgMCR molecule. The presence of one or two C-terminal transmembrane helices were predicted respectively in BgMCR1 and BgMCR2, which is also consistent with MCR in other organisms [15]. Like all MCR orthologs, the canonical thioester site is mutated in BgMCR sequences. Finally, they also present a C-terminal stretch of cysteine residues, four of them being extremely conserved between all known MCR (See Figure 2 and Figure S3).

The four BgTEPs and the BgCD109 do not contain additional domain when compared with BgA2M. Nevertheless, they are shorter in length by 200 to 350 amino acids and present a C-terminal stretch of cysteines, a common signature of iTEP (Figure 2). Only BgTEP3 possesses a point mutation in the thioester site, changing the key cysteine into a serine residue (Figure S3). In addition, N- and C-terminal transmembrane domains were also predicted for BgCD109 molecule, which is consistent with the predicted GPI-anchor site, as CD109 are known to be cell surface-membrane bound molecules [25,61].

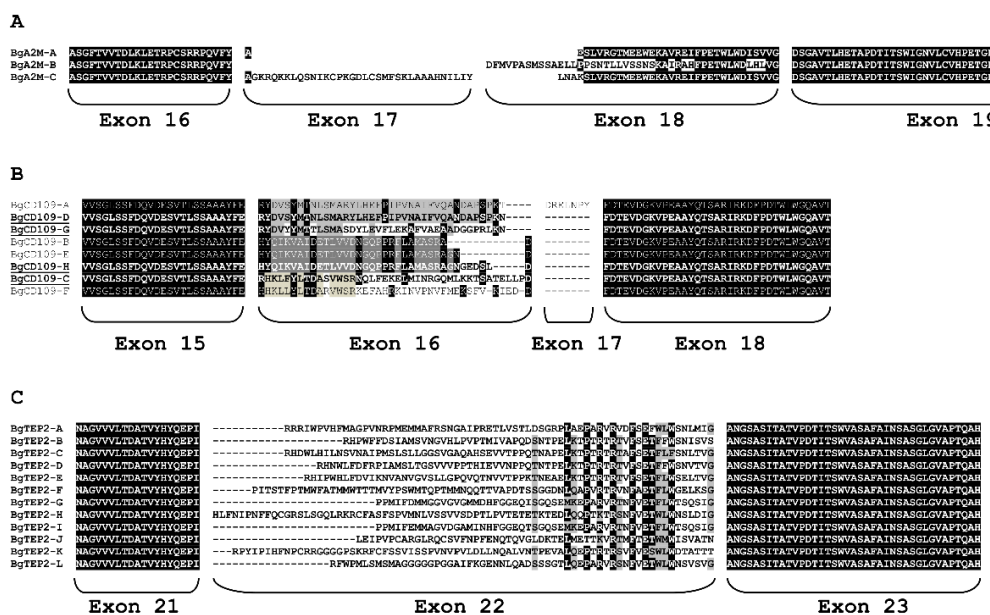
Another important feature is the presence of a catalytic residue located approximately 110 amino acids downstream of the thioester site in the primary sequence, but very close in the tridimensional structure of TEP molecules [3]. The nature of this catalytic residue partly determines binding specificity of the thioester site [62,63]. This catalytic amino acid was identified as a serine residue for BgA2M like in other mollusk A2M [26] and most other protostomia invertebrate A2M, while asparagine residue is the most commonly encountered in vertebrates [64]. Histidine, which is the typical catalytic residue of complement factors, was only found in BgC3-2 sequence, but also in BgTEP2, BgTEP4, and BgCD109, while BgTEP1 harbors an aspartic acid (Figure S3). It is noteworthy that aspartic acid is a well-known alternative catalytic residue also found in human C4a molecule [62].

### 3.3. Organization and Structure of BgTEP Genes

BgTEPs are large proteins ranging from 1389 to 1804 amino acid lengths (Figure 2). In order to determine their genomic organizations, BgTEP cDNA sequences obtained from two snail transcriptomes [50,51] were mapped to the genome BglaB1assembly [49] using the Blast tool of the VectorBase website. BgTEP genes are composed of various exon numbers ranging from 35 to 43 (Table S3). All reconstructed cDNA were retrieved in the recently published genome of *B. glabrata*. However, 9 out of 11 corresponding genes were distributed upon several different scaffolds in the

BglaB1 genome assembly (from 2 to 11 different scaffolds). Only BgC3-3 and BgA2M genes were each assembled on a single scaffold. Moreover, several genes comprised missense or badly positioned exons, for example: BgC3-1 (exons 27-29), BgC3-3 (exon 33), BgA2M (exon 1), BgMCR1 (exons 23-26), BgMCR2 (exon 34), BgTEP1 (exon 31), BgTEP4 (exons 7, 16, 17), and BgCD109 (exons 10, 28, 29) (Table S3). BgA2M was the only gene not completely determined as the exon(s) coding for signal peptide and 5'UTR were not recovered in the snail genome assembly. Sequences of exon-intron boundaries were conserved along all sequences (Table S4) as already described for BgTEP1 [45]. Importantly, none of the BgTEP protein was correctly predicted from BglaB1 genome assembly (Figure S4).

Interestingly, alternative splicing was identified from transcriptomic data for the three genes encoding BgA2M, BgTEP2, and BgCD109 (Tables S3 and S4). The alternative exons encode the highly variable region corresponding to the bait region of BgA2M protein and to the proteolytic cleavage site for BgTEP2 and BgCD109 proteins. Thus, we identified three variants of BgA2M protein of which two were also predicted from BglaB1 assembly (Figure 3A). Regarding BgCD109, a total of eight protein variants were predicted from BglaB1 genome assembly, while transcripts corresponding to only four of these eight variants were recovered from Bg transcriptomes (Figure 3B). Particular attention was paid to BgTEP2 gene for which we identified 12 possible variants from *B. glabrata* transcriptomes (Figure 3C, Table S3), of which only one was predicted from BglaB1 assembly. The 12 possible alternative exons number 22 are positioned tandemly along 30kb length of the genome (Tables S3 and S4).

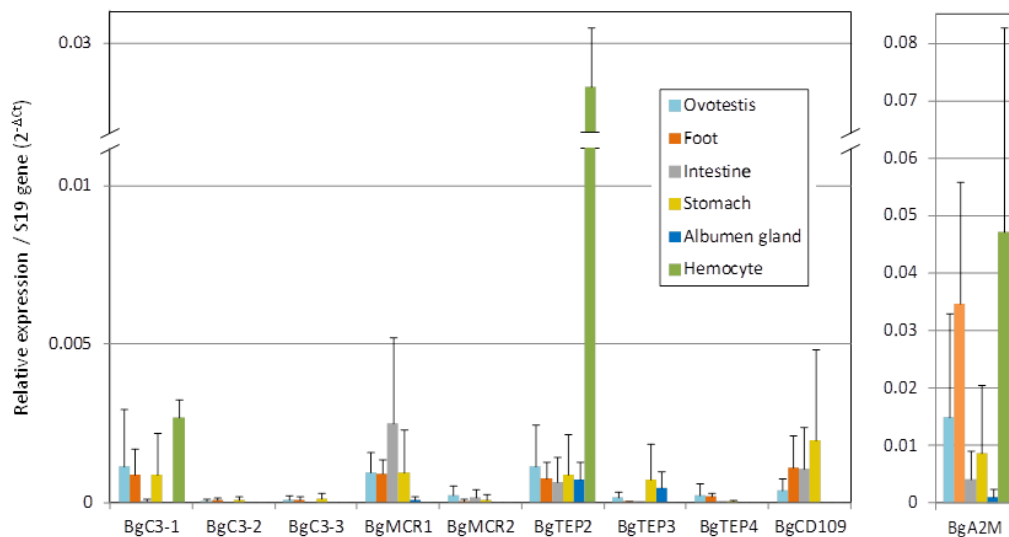


**Figure 3.** ClustalW alignment of alternative splice variants for three BgTEP proteins. Amino acids encoded by alternative exons corresponding to the highly variable region of some BgTEP were aligned, together with amino acids from border conserved exons, using clustalW. Identical amino acids are highlighted in black, similar ones in grey. (A) Alignment of BgA2M variants showing alternative splicing in exons 17 and 18. (B) Alignment of BgCD109 splice variants. Underlined variant names correspond to variants recovered from *Biomphalaria glabrata* transcriptomes. The other variants were only predicted from BglaB1 genome assembly. (C) Alignment of the 12 BgTEP2 splice variants.

### 3.4. BgTEPs Genes Expression Pattern in Snail Tissues

Tissue specific expression of BgTEP by quantitative RT-PCR was conducted using head-foot, albumen gland, ovotestis, intestine, stomach, and hemocytes of *B. glabrata* (Figure 4). BgTEP1 was not included in the present analysis as already published [45]. We observed a large variability between the different *B. glabrata* TEP members in both tissue distribution and expression levels. At the tissue distribution level, the expression of all BgTEPs was detected in ovotestis, head-foot, and stomach, while it is more variable for other tissues. Six members belonging to the four TEP clades (BgC3-1, BgMCR1,

BgMCR2, BgTEP2, BgCD109, and BgA2M) are also expressed in intestine, whereas the expression of only four members (BgMCR1, BgTEP2, BgTEP3, and BgA2M) was detected in albumen gland, and finally, three members (BgC3-1, BgTEP2, and BgA2M) were exclusively detected in hemocytes. At the expression level, BgA2M is 10 to 50 times more expressed than all other members, depending on the tissue considered, with the exception of BgTEP2 in hemocytes, which is expressed at the same level than BgA2M. The expression of BgC3-1, BgMCR1, BgTEP2, and BgCD109 was easily detected, while BgC3-2, BgC3-3, BgMCR2, BgTEP3, and BgTEP4 are more weakly expressed in most of the tissues tested.



**Figure 4.** Relative expression of BgTEP genes in snail tissues. Transcription profile of BgTEPs in different tissues derived from nine individual snails. Six snail tissues were dissected: Ovotestis, head-foot, intestine, stomach, albumen gland. Six pools of hemocytes were each collected from 20 snails. Quantitative RT-PCR was performed on mRNA.  $C_t$  values of transcripts were normalized to the transcript level of the reference S19 ribosomal protein gene. Error bars represent the SD of the  $\Delta C_t$  mean values obtained for each tissue. BgA2M is presented apart as transcripts level reaches a different scale.

We paid a particular attention to the splice variants of BgTEP2. We investigated the presence of putative spliced variants in different snail tissues by end point PCR amplification (Figure S5). In most tissues, several bands in the expected size range of 296–371 bp, were recovered, indicating that several isoforms of BgTEP2 are expressed in these tissues. In addition, we obtained variable band patterns between snail tissues suggesting that different BgTEP2 splice variants might be expressed depending of the tissue considered (Figure S5).

#### 4. Discussion

In the present study, we identified 10 new TEP members containing A2M domain and/or thioester domain in addition to the previously identified BgTEP1 [45]. These new TEP members were named according to their classification provided by a phylogenetic analysis based on their full-length amino acid sequences. Three C3-like complement factors, one A2M, two MCR, three iTEP, and one CD109 were identified (Figure 1). Such diversity of *B. glabrata* TEP members is unexpected, as solely few members of the TEP family have been previously reported in Mollusca, and especially for Gastropoda. The class of iTEP/CD109 is the most represented in *B. glabrata* with a total of four iTEP (including the previously described BgTEP1) and one CD109.

All BgTEPs were further characterized by the presence of specific domains, like A2M domains for all members, C345C for C3-like complement factors, or LDLa for MCR. BgTEP1–4 present the C-terminal cysteine stretch that is a characteristic of iTEP [39], the MCR possess a C-terminal transmembrane domain and a mutated thioester site, and the CD109 show a GPI anchor-signal (Figure 2). The analysis



of BgTEP gene structure revealed a number of exons from 35 to 43. Such structure is consistent with the TEP gene family yet described for bivalve [28] or for human [61]. However, these BgTEPs are rigorously different from *A. gambiae* or *D. melanogaster* TEPs, which are composed of 11 to 15 exons [65,66]. Such results suggest a different evolutionary history between mollusks and insects TEPs, as previously raised by other studies [13,67]. However, relationships between the two clusters formed by on the one hand vertebrate CD109 and iTEP/CD109 from mollusks and on the other hand iTEP/CD109 from other invertebrates are not clear as the clustering is not sufficiently sustained by bootstrap values (Figure 1). Additional iTEP/CD109 sequences from *Mollusca* phylum are needed to answer this question.

Herein, the presence of MCR molecules was reported for the first time from a mollusk species, whereas this subclass of TEP was previously demonstrated solely in few arthropod species. In addition, the presence of MCR genes in mollusk genomes may be much more common than previously thought. Indeed, in a recent study on the Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*, five TEP members were identified from this bivalve species [68], among which a member was classified as a CD109 whereas it is more likely a MCR. Indeed, this molecule assigned as CD109 because of the presence of a C-terminal transmembrane domain, also possesses an LDLa domain and a mutated thioester site, which are typical features of MCR family members [15]. In the same way, two CD109-like molecules have been previously reported from the *Littorina littorea* transcriptome [29]. Nevertheless, the LiCD109-2 molecule from this gastropod also bears all the features of MCR, including LDLa domain, mutated thioester site, and C-terminal transmembrane domain.

The canonical CGEQ thioester site is mutated in 5 out of 11 BgTEP proteins: BgC3-1, BgC3-3, BgMCR1, BgMCR2, and BgTEP3. BgTEP3 harbors a single nucleotide mutation in this site leading to the replacement of the cysteine residue to a serine residue, but the Gln-moiety of the thioester is preserved. Such replacement of the cysteine residue by a serine was also reported for tsetse fly TEP2, an iTEP of which the expression is particularly up-regulated in the salivary gland following *Trypanosoma brucei* infection [69]. The replacement of cysteine residue in the thioester site was also evidenced for chicken ovostatin [70], without alteration of its proteinase-inhibitor activity [71]. The absence of thioester site in the BgMCRs and two of the three BgC3 suggests that these molecules cannot covalently bind to microbe surface, but that does not mean that they are not functional. Indeed, these molecules possess several other protein–protein interacting domains, and many other TEP proteins without thioester site were shown to exert important immunological functions. For example, MCR from *A. aegypti* was shown to be implicated in the regulation of Flavivirus infection, by binding to a scavenger receptor that also interacts with viral particles, leading to the regulation of antimicrobial peptide with anti-flavivirus activity [24]. MCR from *D. melanogaster* was reported to specifically bind the *Candida albicans* surface, and to subsequently promote its phagocytosis [15]. Otherwise, some TEP molecules with canonical thioester site were shown to be able to bind pathogens in a thioester-dependent or independent manner, like the mosquito AgTEP1 towards bacteria [72]. Moreover, it was recently evidenced that some invertebrate TEPs also play roles in other functions than immunity. *Drosophila* MCR was found to be implicated in development [73], nitric oxide regulation, and metabolic processes [74,75], while AgTEP1 was shown to increase male fertility [76].

The level of BgTEP genes expression from *B. glabrata* tissues was investigated by RT-qPCR in order to investigate a tissue-specific expression. BgA2M and BgTEP2 were recovered from all tested tissues, with BgA2M being the more expressed in all tissues (Figure 4). We found that BgMCR1, BgA2M, BgTEP2, and BgTEP3 were expressed in the albumen gland, an accessory gland of the genital tract also known to produce immune relevant molecules, like antimicrobial glycoprotein LBP/BPI, or C-type lectin [77]. Otherwise, expression of BgC3-1, BgA2M, and BgTEP2 in hemocytes suggests a potential role in immune functions in addition to BgTEP1 known to be expressed by a specific subtype of hemocytes [45]. The probable immune function of BgTEP2 is supported by its expression in hemocytes and by its identification in a proteomic screen searching for the *B. glabrata* plasma proteins able to bind surface of *S. mansoni* sporocyst [44]. Indeed, in this study, Wu and collaborators identified peptides corresponding to BgTEP1 but also to another candidate named CD109 antigen-like (see Table 2

from [44]). We confirmed that the peptide sequences of this “CD109 antigen-like” perfectly matched to BgTEP2 protein sequence described herein. This suggests that BgTEP2 is able to directly or indirectly bind *S. mansoni* tegument, as shown for BgTEP1 [45].

Finally, we paid particular attention to BgA2M, BgCD109, and BgTEP2 that present alternative splicing in their highly variable central region. We found from *B. glabrata* transcriptomes three possible forms of BgA2M (BgA2M-A to BgA2M-C) coded by either one or two exons (Figure 3A), while only two of these three variants were predicted from BglaB1 genome assembly (Figure S4). Such alternative splicing was also reported for the A2M of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [64] or in insects, and may serve to extend the repertoire of inhibited proteases [21].

Concerning BgCD109, eight isoforms were predicted from BglaB1 genome assembly (BgCD109-A to BgCD109-H), while only four were recovered from *B. glabrata* transcriptomes (BgCD109-C, -D, -G, and -H) (Figure 3B). This might, of course, be due to the fact that the unrecovered transcript forms are not expressed in the available transcriptomes used herein. However, incorrect prediction of some variants from BglaB1 genome assembly has also to be considered as (i) BgCD109 isoforms A and D have the same exon 16 (same genome position), but differ by the presence of an additional exon 17 only predicted for isoform A that was never reported to be expressed and probably does not exist, and (ii) BgCD109 isoforms B, E, and H are predicted from the transcription of the same exon 16, which starts at the same position but ends at different positions for the three isoforms, that is highly improbable and explains why only one of these isoforms (BgCD109-H) was recovered from Bg transcriptomes. Unlike other TEP members, CD109 is a GPI-linked glycoprotein, which clearly indicates different function than other TEP. CD109 was originally found on endothelial cells, platelets, and activated T-cell of human [78], it was shown to interfere with TGF- $\beta$  signaling, to be highly expressed in some cancer diseases, and to play role in bone metabolism [79–82]. The role of CD109 in invertebrates remains seldom investigated, nonetheless for juvenile Hawaiian bobtail squid *E. scolopes*, a down-regulation of CD109 (EsCD109) expression in the light organ of the squid after colonization by its bioluminescent symbiont *Vibrio fischeri* was shown. The authors suggested that the presence of the symbiont modulated the squid’s immune system, including EsCD109, to permit symbiont growth and colonization of the light organ [25]. In the present study, the only data available about BgCD109 is that it is not expressed by naïve snail hemocytes (Figure 4). However, it is to note that for bobtail squid too, EsCD109 transcript was not detected in hemocyte transcriptome [83], while the EsCD109 protein was detected by Western blot in the animal blood [25], suggesting that circulating CD109 might be produced by other immune tissues than hemocytes and secreted in the hemolymph.

The more intriguing molecule is BgTEP2 for which 12 different variants were recovered from *B. glabrata* transcriptomes. After mapping on the genome, the variants were found to be the result of alternative splicing from 12 mutually exclusive exons tandemly positioned along 30 kb in the BglaB1 genome (BgTEP2-A to BgTEP2-L) (Table S4). The amino acid sequences encoded by these 12 exons are variables in length and composition. However, some amino acids are extremely conserved in the C-terminal part of the sequences encoded by these exons (Figure 3C) suggesting a key role in the structure-function of the molecule. To our knowledge, such degree of diversity is not common. Moreover, BgTEP2, the most expressed member in hemocyte, might display a central role in the innate immune function of the snail as it was shown able to bind *S. mansoni* larva surface [44].

The highly variable region of BgTEP2 and BgCD109 corresponds to the bait region of A2M, which is known to be structurally exposed and sensitive to protease cleavage [57]. Such cleavages induce conformational changes of the protein and activation of the internal thioester, leading both to fine interactions with targeted proteins, and to the exposition of receptor binding site allowing fixation to receptor-bearing cells followed by clearance of the targeted protein [84–86]. Such diversity in the sequences of these highly variable regions might produce different avidities/affinities to various ligands. Alternative splicing in this bait-like region was previously highlighted in several invertebrate species. The A2M-2 of the shrimp *F. chinensis* harbors six variants in the same part of the sequence that are activated differently toward *Vibrio* challenges [64]. Moreover, five isoforms of *Drosophila* TEP2 were

transcribed by alternative splicing of the bait region encoding exon 5 [14]. Finally, seven isoforms of *Chlamys farreri* TEP (CfTEP) were reported, being produced by alternative splicing of six mutually exclusive exons. Only one isoform is expressed in the gonads, which differs between male and female, and the other isoforms were induced following immune challenges, in a pathogen-dependent specific pattern [87]. In *B. glabrata*, several isoforms of BgTEP2 display a restricted expression pattern in naive snail tissues suggesting a broad repertoire of recognition molecules. Their patterns of expression following specific immune challenges will deserve further investigations.

*D. melanogaster* possesses six TEP differing in their preference between opsonizing different pathogens [15]. The discovery of 11 TEP proteins in the genome of *B. glabrata* and the multiple alternatives splicing for three of them will generate a high level of protein diversity in this family, increasing in the same time the affinity/avidity of such immune receptors towards potential pathogens. Moreover, biochemical study has shown that BgTEP1 is likely to form homo-tetramers [46], that might also contribute in increasing the binding capacities of these BgTEP molecules by heteromeric recognition complex formation. To conclude, this paper revealed a diversity of TEP family member higher than expected in a gastropod species and could potentially enhance the snail immune repertoire.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4425/11/1/69/s1>, Figure S1: Alignment file of TEP protein sequences used for the phylogenetic analysis; Figure S2: cDNA sequences of the 11 TEP of *Biomphalaria glabrata*; Figure S3: ClustalW alignment of BgTEP protein sequences with related sequences from other organisms; Figure S4: ClustalW alignment of each BgTEP protein sequence with corresponding protein sequences predicted from BglaB1 genome assembly; Figure S5: BgTEP2 alternative splicing in snail tissues, Table S1: Table list of primers used to measure gene expression by quantitative PCR; Table S2: Table list of protein sequences used to construct phylogenetic tree; Table S3: Genome organization of BgTEP genes; Table S4: Genome organization of BgTEP2 splice variants; File S1: Supplementary materials caption.

**Author Contributions:** R.G. conceived and supervised the work, he also performed bioinformatic, phylogenetic, and gene expression analysis, and wrote the original draft preparation. D.D. helped in conceptualization, performed spliced variant analysis, and help in reviewing the article. B.G. helped in validation of methodological choice and participate in reviewing the paper. D.L. prepared cDNA from snail tissues for gene expression analysis. R.P. and M.L. performed Q-PCR analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding and the APC was funded by ANR (Agence Nationale de la Recherche) in France (project ANR-19-CE11-0016-01). This study is set within the framework of the “Laboratoires d’Excellences (LABEX)” TULIP (ANR-10-LABX-41).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no competing interests for this research.

## References

1. Shokal, U.; Eleftherianos, I. Evolution and Function of Thioester-Containing Proteins and the Complement System in the Innate Immune Response. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 759. [CrossRef]
2. Theopold, U.; Schmid, M. Thioester-containing proteins: At the crossroads of immune effector mechanisms. *Virulence* **2017**, *8*, 1468–1470. [CrossRef]
3. Dodds, M.W.; Law, A.S.K. The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and  $\alpha$ 2-macroglobulin. *Immunol. Rev.* **1998**, *166*, 15–26. [CrossRef]
4. Barrett, A.J.; Starkey, P.M. The interaction of  $\alpha$  2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.* **1973**, *133*, 709–724. [CrossRef]
5. Armstrong, P.B. Proteases and protease inhibitors: A balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology* **2006**, *211*, 263–281. [CrossRef]
6. Armstrong, P.B.; Quigley, J.P. Alpha2-macroglobulin: An evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* **1999**, *23*, 375–390. [CrossRef]
7. Garcia-Ferrer, I.; Marrero, A.; Gomis-Ruth, F.X.; Goulas, T. alpha2-Macroglobulins: Structure and Function. *Sub-Cell. Biochem.* **2017**, *83*, 149–183.
8. Rehman, A.A.; Ahsan, H.; Khan, F.H.  $\alpha$ -2-Macroglobulin: A physiological guardian. *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 1665–1675. [CrossRef] [PubMed]
9. Muller-Eberhard, H.J. Complement. *Annu. Rev. Biochem.* **1975**, *44*, 697–724. [CrossRef] [PubMed]

10. Ricklin, D.; Reis, E.S.; Mastellos, D.C.; Gros, P.; Lambris, J.D. Complement component C3—The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunol. Rev.* **2016**, *274*, 33–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ricklin, D.; Hajishengallis, G.; Yang, K.; Lambris, J.D. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 785–797. [[CrossRef](#)]
12. Nonaka, M. The complement C3 protein family in invertebrates. *Invertebr. Surviv. J.* **2011**, *8*, 21–32.
13. Bou Aoun, R.; Hetru, C.; Troxler, L.; Doucet, D.; Ferrandon, D.; Matt, N. Analysis of Thioester-Containing Proteins during the Innate Immune Response of *Drosophila melanogaster*. *J. Innate Immun.* **2010**, *3*, 52–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lagueux, M.; Perrodou, E.; Levashina, E.A.; Capovilla, M.; Hoffmann, J.A. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11427–11432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Stroschein-Stevenson, S.L.; Foley, E.; O’Farrell, P.H.; Johnson, A.D. Identification of *Drosophila* Gene Products Required for Phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Baxter, R.H.G.; Chang, C.-I.; Chelliah, Y.; Levashina, E.A.; Deisenhofer, J. Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11615–11620. [[CrossRef](#)]
17. Buresova, V.; Hajdusek, O.; Franta, Z.; Loosova, G.; Grunclova, L.; Levashina, E.A.; Kopáček, P. Functional Genomics of Tick Thioester-Containing Proteins Reveal the Ancient Origin of the Complement System. *J. Innate Immun.* **2011**, *3*, 623–630. [[CrossRef](#)]
18. Castillo, J.C.; Creasy, T.; Kumari, P.; Shetty, A.; Shokal, U.; Tallon, L.J.; Eleftherianos, I. *Drosophila* anti-nematode and antibacterial immune regulators revealed by RNA-Seq. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 519. [[CrossRef](#)]
19. Shokal, U.; Kopydlowski, H.; Eleftherianos, I. The distinct function of Tep2 and Tep6 in the immune defense of *Drosophila melanogaster* against the pathogen *Photorhabdus*. *Virulence* **2017**, *8*, 1668–1682. [[CrossRef](#)]
20. Dostálová, A.; Rommelaere, S.; Poidevin, M.; Lemaitre, B. Thioester-containing proteins regulate the Toll pathway and play a role in *Drosophila* defence against microbial pathogens and parasitoid wasps. *BMC Biol.* **2017**, *15*, 79. [[CrossRef](#)]
21. Blandin, S.; Shiao, S.H.; Moita, L.F.; Janse, C.J.; Waters, A.P.; Kafatos, F.C.; Levashina, E.A. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* **2004**, *116*, 661–670. [[CrossRef](#)]
22. Blandin, S.A.; Marois, E.; Levashina, E.A. Antimalarial Responses in *Anopheles gambiae*: From a Complement-like Protein to a Complement-like Pathway. *Cell Host Microbe* **2008**, *3*, 364–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cheng, G.; Liu, L.; Wang, P.; Zhang, Y.; Zhao, Y.O.; Colpitts, T.M.; Feitosa, F.; Anderson, J.F.; Fikrig, E. An in vivo transfection approach elucidates a role for *Aedes aegypti* thioester-containing proteins in flaviviral infection. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Xiao, X.; Liu, Y.; Zhang, X.; Wang, J.; Li, Z.; Pang, X.; Wang, P.; Cheng, G. Complement-related proteins control the flavivirus infection of *Aedes aegypti* by inducing antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yazzie, N.; Salazar, K.A.; Castillo, M.G. Identification, molecular characterization, and gene expression analysis of a CD109 molecule in the Hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes*. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *44*, 342–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ma, H.; Mai, K.; Xu, W.; Liufu, Z. Molecular cloning of alpha2- macroglobulin in sea scallop *Chlamys farreri* (Bivalvia, Mollusca). *Fish Shellfish Immunol.* **2005**, *18*, 345–349. [[CrossRef](#)]
27. Xue, Z.; Wang, L.; Liu, Z.; Wang, W.; Liu, C.; Song, X.; Wang, L.; Song, L. The fragmentation mechanism and immune-protective effect of CfTEP in the scallop *Chlamys farreri*. *Dev. Comp. Immunol.* **2017**, *76*, 220–228. [[CrossRef](#)]
28. Zhang, H.; Song, L.; Li, C.; Zhao, J.; Wang, H.; Gao, Q.; Xu, W. Molecular cloning and characterization of a thioester-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 3492–3500. [[CrossRef](#)]
29. Gorbushin, A.M. Immune repertoire in the transcriptome of *Littorina littorea* reveals new trends in lophotrochozoan proto-complement evolution. *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *84*, 250–263. [[CrossRef](#)]

30. Mitta, G.; Gourbal, B.; Grunau, C.; Knight, M.; Bridger, J.M.; Theron, A. The Compatibility Between *Biomphalaria glabrata* Snails and *Schistosoma mansoni*: An Increasingly Complex Puzzle. *Adv. Parasitol.* **2016**, *97*, 111–145.
31. Pila, E.A.; Li, H.; Hambrook, J.R.; Wu, X.; Hanington, P.C. Schistosomiasis from a Snail's Perspective: Advances in Snail Immunity. *Trends Parasitol.* **2017**, *33*, 845–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Portet, A.; Pinaud, S.; Tetreau, G.; Galinier, R.; Cosseau, C.; Duval, D.; Grunau, C.; Mitta, G.; Gourbal, B. Integrated multi-omic analyses in *Biomphalaria-Schistosoma* dialogue reveal the immunobiological significance of FREP-SmPoMuc interaction. *Dev. Comp. Immunol.* **2017**, *75*, 16–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bouchut, A.; Roger, E.; Gourbal, B.; Grunau, C.; Coustau, C.; Mitta, G. The compatibility polymorphism in invertebrate host/trematodes interactions: Research of molecular determinants. *Parasite* **2008**, *15*, 304–309. [[CrossRef](#)]
34. Mitta, G.; Adema, C.M.; Gourbal, B.; Loker, E.S.; Theron, A. Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, *37*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Theron, A.; Coustau, C. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J. Helminthol.* **2005**, *79*, 187–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Morand, S.; Manning, S.D.; Woolhouse, M.E. Parasite-host coevolution and geographic patterns of parasite infectivity and host susceptibility. *Proceedings* **1996**, *263*, 119–128.
37. Combes, C. Selective pressure in host-parasite systems. *J. Soc. Biol.* **2000**, *194*, 19–23. [[CrossRef](#)]
38. Galinier, R.; Portela, J.; Moné, Y.; Allienne, J.F.; Henri, H.; Delbecq, S.; Mitta, G.; Gourbal, B.; Duval, D. Biomphalysin, a New  $\beta$  Pore-forming Toxin Involved in *Biomphalaria glabrata* Immune Defense against *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003216. [[CrossRef](#)]
39. Moné, Y.; Gourbal, B.; Duval, D.; du Pasquier, L.; Kieffer-Jaquinod, S.; Mitta, G. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e813. [[CrossRef](#)]
40. Adema, C.M.; Hertel, L.A.; Miller, R.D.; Loker, E.S. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8691–8696. [[CrossRef](#)]
41. Roger, E.; Grunau, C.; Pierce, R.J.; Hirai, H.; Gourbal, B.; Galinier, R.; Emans, R.; Cesari, I.M.; Cosseau, C.; Mitta, G. Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite (*Schistosoma mansoni*) Interacting with Its Invertebrate Host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Galinier, R.; Roger, E.; Mone, Y.; Duval, D.; Portet, A.; Pinaud, S.; Chaparro, C.; Grunau, C.; Genthon, C.; Dubois, E.; et al. A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mone, Y.; Ribou, A.C.; Cosseau, C.; Duval, D.; Theron, A.; Mitta, G.; Gourbal, B. An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41*, 721–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wu, X.J.; Dinguirard, N.; Sabat, G.; Lui, H.D.; Gonzalez, L.; Gehring, M.; Bickham-Wright, U.; Yoshino, T.P. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Portet, A.; Galinier, R.; Pinaud, S.; Portela, J.; Nowacki, F.; Gourbal, B.; Duval, D. BgTEP: An Antiprotease Involved in Innate Immune Sensing in *Biomphalaria glabrata*. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1206. [[CrossRef](#)]
46. Bender, R.C.; Bayne, C.J. Purification and characterization of a tetrameric  $\alpha$ -macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. *Biochem. J.* **1996**, *316 Pt 3*, 893–900. [[CrossRef](#)]
47. Bender, R.C.; Fryer, S.E.; Bayne, C.J. Proteinase inhibitory activity in the plasma of a mollusc: Evidence for the presence of  $\alpha$ -macroglobulin in *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* **1992**, *102*, 821–824. [[CrossRef](#)]
48. Fryer, S.E.; Bender, R.C.; Bayne, C.J. Inhibition of cysteine proteinase from *Schistosoma mansoni* larvae by  $\alpha$ -macroglobulin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* **1996**, *82*, 343–347. [[CrossRef](#)]
49. Adema, C.M.; Hillier, L.W.; Jones, C.S.; Loker, E.S.; Knight, M.; Minx, P.; Oliveira, G.; Raghavan, N.; Shedlock, A.; do Amaral, L.R.; et al. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15451. [[CrossRef](#)]

50. Dheilly, N.M.; Duval, D.; Mouahid, G.; Emans, R.; Allienne, J.-F.; Galinier, R.; Genthon, C.; Dubois, E.; Du Pasquier, L.; Adema, C.M.; et al. A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *48*, 234–243. [[CrossRef](#)]
51. Pinaud, S.; Portela, J.; Duval, D.; Nowacki, F.C.; Olive, M.A.; Allienne, J.F.; Galinier, R.; Dheilly, N.M.; Kieffer-Jaquinod, S.; Mitta, G.; et al. A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Letunic, I.; Bork, P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D493–D496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Letunic, I.; Doerks, T.; Bork, P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D257–D260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Penn, O.; Privman, E.; Ashkenazy, H.; Landan, G.; Graur, D.; Pupko, T. GUIDANCE: A web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W23–W28. [[CrossRef](#)]
55. Whelan, S.; Goldman, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **2001**, *18*, 691–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Sottrup-Jensen, L.; Sand, O.; Kristensen, L.; Fey, G.H. The  $\alpha$ -macroglobulin bait region. Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian  $\alpha$ -macroglobulins. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15781–15789.
58. Banyai, L.; Patthy, L. The NTR module: Domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1636–1642. [[CrossRef](#)]
59. de Bruijn, M.H.; Fey, G.H. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 708–712. [[CrossRef](#)]
60. Gerard, N.P.; Lively, M.O.; Gerard, C. Amino acid sequence of guinea pig C3a anaphylatoxin. *Protein Seq. Data Anal.* **1988**, *1*, 473–478.
61. Prosper, J.Y.A. Characterization of CD109. In *Graduate Department of Medical Biophysics*; University of Toronto: Toronto, ON, Canada, 2011.
62. Law, S.K.; Dodds, A.W. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 263–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gadjeva, M.; Dodds, A.W.; Taniguchi-Sidle, A.; Willis, A.C.; Isenman, D.E.; Law, S.K. The covalent binding reaction of complement component C3. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 985–990. [[PubMed](#)]
64. Ma, H.; Wang, B.; Zhang, J.; Li, F.; Xiang, J. Multiple forms of  $\alpha$ -2 macroglobulin in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and their transcriptional response to WSSV or *Vibrio* pathogen infection. *Dev. Comp. Immunol.* **2010**, *34*, 677–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Adams, M.D.; Celniker, S.E.; Holt, R.A.; Evans, C.A.; Gocayne, J.D.; Amanatides, P.G.; Scherer, S.E.; Li, P.W.; Hoskins, R.A.; Galle, R.F.; et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **2000**, *287*, 2185–2195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Holt, R.A.; Subramanian, G.M.; Halpern, A.; Sutton, G.G.; Charlab, R.; Nusskern, D.R.; Wincker, P.; Clark, A.G.; Ribeiro, J.M.; Wides, R.; et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **2002**, *298*, 129–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Falade, M.O.; Otarigho, B. Comparative Functional Study of Thioester-containing Related Proteins in the Recently Sequenced Genome of *Biomphalaria glabrata*. *Iran. J. Parasitol.* **2018**, *13*, 79–88.
68. Liao, H.; Wang, J.; Xun, X.; Zhao, L.; Yang, Z.; Zhu, X.; Xing, Q.; Huang, X.; Bao, Z. Identification and characterization of TEP family genes in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) and their diverse expression patterns in response to bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *79*, 327–339. [[CrossRef](#)]
69. Matetovici, I.; Van Den Abbeele, J. Thioester-containing proteins in the tsetse fly (*Glossina*) and their response to trypanosome infection. *Insect Mol. Biol.* **2018**, *27*, 414–428. [[CrossRef](#)]
70. Nielsen, K.L.; Sottrup-Jensen, L.; Nagase, H.; Thogersen, H.C.; Etzerodt, M. Amino acid sequence of hen ovomacroglobulin (ovostatin) deduced from cloned cDNA. *DNA Seq.* **1994**, *5*, 111–119. [[CrossRef](#)]
71. Nagase, H.; Harris, E.D., Jr. Ovostatin: A novel proteinase inhibitor from chicken egg white. II. Mechanism of inhibition studied with collagenase and thermolysin. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 7490–7498.

72. Levashina, E.A.; Moita, L.F.; Blandin, S.; Vriend, G.; Lagueux, M.; Kafatos, F.C. Conserved Role of a Complement-like Protein in Phagocytosis Revealed by dsRNA Knockout in Cultured Cells of the Mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* **2001**, *104*, 709–718. [[CrossRef](#)]
73. Batz, T.; Forster, D.; Luschnig, S. The transmembrane protein Macroglobulin complement-related is essential for septate junction formation and epithelial barrier function in *Drosophila*. *Development* **2014**, *141*, 899–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Lin, L.; Rodrigues, F.; Kary, C.; Contet, A.; Logan, M.; Baxter, R.H.G.; Wood, W.; Baehrecke, E.H. Complement-Related Regulates Autophagy in Neighboring Cells. *Cell* **2017**, *170*, 158–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Shokal, U.; Kopydlowski, H.; Harsh, S.; Eleftherianos, I. Thioester-Containing Proteins 2 and 4 Affect the Metabolic Activity and Inflammation Response in *Drosophila*. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00810-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Pompon, J.; Levashina, E.A. A New Role of the Mosquito Complement-like Cascade in Male Fertility in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol.* **2015**, *13*, e1002255. [[CrossRef](#)]
77. Guillou, F.; Mitta, G.; Galinier, R.; Coustau, C. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* **2007**, *31*, 657–671. [[CrossRef](#)]
78. Lin, M.; Sutherland, D.R.; Horsfall, W.; Totty, N.; Yeo, E.; Nayar, R.; Wu, X.F.; Schuh, A.C. Cell surface antigen CD109 is a novel member of the  $\alpha(2)$  macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood* **2002**, *99*, 1683–1691. [[CrossRef](#)]
79. Finnson, K.W.; Tam, B.Y.; Liu, K.; Marcoux, A.; Lepage, P.; Roy, S.; Bizet, A.A.; Philip, A. Identification of CD109 as part of the TGF- $\beta$  receptor system in human keratinocytes. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1525–1527. [[CrossRef](#)]
80. Hagiwara, S.; Murakumo, Y.; Sato, T.; Shigetomi, T.; Mitsudo, K.; Tohnai, I.; Ueda, M.; Takahashi, M. Up-regulation of CD109 expression is associated with carcinogenesis of the squamous epithelium of the oral cavity. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 1916–1923. [[CrossRef](#)]
81. Mii, S.; Hoshino, A.; Enomoto, A.; Murakumo, Y.; Ito, M.; Yamaguchi, A.; Takahashi, M. CD109 deficiency induces osteopenia with an osteoporosis-like phenotype in vivo. *Genes Cells* **2018**, *23*, 590–598. [[CrossRef](#)]
82. Zhou, S.; da Silva, S.D.; Siegel, P.M.; Philip, A. CD109 acts as a gatekeeper of the epithelial trait by suppressing epithelial to mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cells in vitro. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16317. [[CrossRef](#)]
83. Collins, A.J.; Schleicher, T.R.; Rader, B.A.; Nyholm, S.V. Understanding the role of host hemocytes in a squid/vibrio symbiosis using transcriptomics and proteomics. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. van Lookeren Campagne, M.; Wiesmann, C.; Brown, E.J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 2095–2102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Alcorlo, M.; Lopez-Perrote, A.; Delgado, S.; Yebenes, H.; Subias, M.; Rodriguez-Gallego, C.; Rodriguez de Cordoba, S.; Llorca, O. Structural insights on complement activation. *FEBS J.* **2015**, *282*, 3883–3891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Williams, M.; Contet, A.; Hou, C.D.; Levashina, E.A.; Baxter, R.H.G. *Anopheles gambiae* TEP1 forms a complex with the coiled-coil domain of LRIM1/APL1C following a conformational change in the thioester domain. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0218203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Zhang, H.; Wang, L.; Song, L.; Zhao, J.; Qiu, L.; Gao, Y.; Song, X.; Li, L.; Zhang, Y.; Zhang, L. The genomic structure, alternative splicing and immune response of *Chlamys farreri* thioester-containing protein. *Dev. Comp. Immunol.* **2009**, *33*, 1070–1076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]







## Résumé

Le système immunitaire inné de *B. glabrata* est capable de mémoire en réponse à des infestations répétées par *S. mansoni*. Cette mémoire immunitaire innée (MII) est, encore aujourd'hui, considérée comme une véritable boîte noire. Les travaux des dix dernières années ont décrit une réponse majoritairement cellulaire, médiée par les hémocytes du mollusque, lors d'une première rencontre avec le parasite, et basculant vers une réponse exclusivement humorale et spécifique, après une seconde rencontre avec le pathogène. Cette réponse appelée « immune shift » est associée à une reprogrammation transcriptionnelle massive. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette MII restent encore méconnus. Les travaux de cette thèse ont principalement porté sur les cellules immunitaires du mollusque, les hémocytes, avec pour objectif principal, de décortiquer leur rôle dans cette MII. Ces travaux, menés par des approches « Omiques », ont permis, dans un premier temps, de confirmer l'immune shift au niveau hémocytaire. Nous sommes également parvenus à mettre en évidence et à décrire une partie des mécanismes d'acquisition de la MII, dans ces cellules immunitaires, qui se rapproche de ceux décrits dans la « trained immunity » chez les organismes vertébrés. Par une approche de scRNAseq, nous avons, pour la première fois, décrit la diversité transcriptomique complète des hémocytes, exploré leur rôle potentiel ainsi que la dynamique de ces populations transcriptionnelles en réponse à des infestations par *S. mansoni*. Finalement cette thèse aura été, aussi, le point de départ du développement de nouveaux outils d'édition du génome de *B. glabrata*, basés sur des approches de transgénése.

**Mots clés** : *B. glabrata*, *S. mansoni*, Hemocytes, Transcriptomique, Epigénomique, scRNAseq, Métabolomique ciblée, Transgénése.

## Abstract

The innate immune system of *B. glabrata* is capable of memory in response to repeated infestations by *S. mansoni*. This innate immune memory (IIM) is still considered a black box. Work over the past decade has described a predominantly cellular response, mediated by the mollusc's hemocytes, during a first encounter with the parasite and shifting to an exclusively humoral and specific response after a second encounter with the pathogen. This response, called "immune shift", is associated with massive transcriptional reprogramming. However, the molecular and cellular mechanisms of this IIM remain poorly understood. The work in this thesis focused on the mollusc's immune cells, the hemocytes, with the main objective of unravelling their role in this IIM. This work, carried out using "Omics" approaches, firstly allowed us to confirm the immune shift at the hemocyte level. We also succeeded in highlighting and describing some of the mechanisms of IIM acquisition in these immune cells, which are similar to those described in "trained immunity" in vertebrate organisms. Using a scRNAseq approach, we have for the first time described the complete transcriptomic diversity of hemocytes and explored the potential role and dynamics of these transcriptional populations in response to *S. mansoni* infestations. Finally, this thesis was also the starting point for the development of new genome editing tools for *B. glabrata* based on transgenic approaches.

**Keywords**: *B. glabrata*, *S. mansoni*, Hemocytes, Transcriptomics, Epigenomics, Targeted Metabolomics, scRNAseq, Transgenesis.