# UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

## *DE TOURS*

***ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et Technologies***

**Équipe multirésistance et pouvoir pathogène des nématodes**

**INRA de Tours**

# THÈSE présentée par :


## Alexia Delannoy-Normand


soutenue le : **8 Septembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline ou Spécialité : Sciences de la Vie et Santé

# Recherche de gènes impliqués dans l'installation du strongle *Haemonchus contortus* par une approche transcriptomique

**THÈSE dirigée par :**

| | |
|---|---|
| **M CABARET Jacques** | Directeur de recherche, INRA (Tours) |
| **Co-encadré par :** | |
| **M NEVEU Cédric** | Chargé de recherche, INRA (Tours) |

**RAPPORTEURS :**

| | |
|---|---|
| **M CASTAGNONE Philippe** | Directeur de recherche, INRA (Sophia Antipolis) |
| **M JACQUIET Philippe** | Directeur de recherche, INRA-ENVT (Toulouse) |

---

**JURY :**

| | |
|---|---|
| **Mme BAIN Odile** | Directeur de recherche, MNHN CNRS (Paris) |
| **M CABARET Jacques** | Directeur de recherche, INRA (Tours) |
| **M CASTAGNONE Philippe** | Directeur de recherche, INRA (Sophia Antipolis) |
| **Mme DIMIER-POISSON Isabelle** | Professeur, Université François Rabelais (Tours) |
| **M JACQUIET Philippe** | Directeur de recherche, INRA-ENVT (Toulouse) |
| **M NEVEU Cédric** | Chargé de recherche, INRA (Tours) |

A Séb, Lise et Bibou

# Remerciements

*C'est toujours à la fin du manuscrit que l'on s'attaque aux remerciements en pensant que ça va aller vite mais non !! Il ne faut oublier personne et essayer de retranscrire par écrit ses sentiments. Pas évident pour une scientifique !*

*A **Cédric**, pour ses 3 ans et demi voir bientôt 4 de dur labeur. Pour ton premier encadrement et ma première thèse ;-) on peut dire qu'on ne s'en est pas trop mal sorti ! Merci de m'avoir appris à devenir autonome dans mes choix même si des fois tu n'approuvais pas toujours ma méthodologie. Merci aussi d'avoir lu et relu, corrigé et recorrigé ce manuscrit même quand je pensais qu'enfin tout était bouclé. Mais bon, je pense que le résultat n'est pas si mal et que ces quelques durs mois de rédaction ont enfin une récompense.*

*A **Jacques Cabaret**, mon encadrant officiel de thèse. Merci d'avoir toujours été là pour répondre à quelques questions dans un coin du bureau et de m'avoir fait confiance dans le début de cette thématique qui laisse entrevoir de belles perspectives.*

*A **Alexandra**, on peut dire que ton arrivée il y a peu dans l'équipe m'aura été d'une grande aide. Quand on parle de chercheurs passionnés, ma première pensée vient vers toi. A peine arrivée, tu t'es investie à fond dans ma fin de thèse pour m'aider au maximum. Tes conseils ont toujours été bons même si j'ai maudit certains de tes mails. Mais avec du recul, heureusement que tu me les as envoyés ces mails avec « c'est bien mais…… » Enfin, je garde quand même en tête un certain jeudi de l'ascension. Trêve de plaisanterie, je te remercie vraiment et sincérement de ton aide et de ton soutien sans faille.*

*A toute l'équipe du laboratoire, **Claude**, **Christine**, **Jacques** de m'avoir supporté pendant toute ces périodes. Eh oui j'ai parfois eu mes mauvaises journées avec mes petits « coups de gueule ». D'avoir également toujours essayé de répondre à mes questions et d'avoir facilité ce travail. Christine, surtout ne perd pas ta soif d'apprendre et ta gentillesse. On sait qu'on peut toujours compter sur toi à tout point de vue mais surtout pour retrouver une souche perdue dans les fins fonds d'un congélo et ça nous a bien dépannés plus d'une fois. Jacques, merci pour l'obtention de toutes mes petites larves ; sans elles il n'y aurait pas eu ce travail. Par contre je ne peux pas parler de toi sans te dire qu'il faut que tu restes zen… ne te fais pas de souci, tu verras que tu arriveras à les dompter ces protéines recombinantes et que tu en seras plus que fier après.*

*Je ne peux pas parler de l'équipe sans citer mon copain de galère, celui qui me connaît sans doute le mieux au sein du labo : Aymeric dit « **Kemy** ». Merci de m'avoir écoutée, d'avoir subi mes rigolades, mes chansons, mes cris, mes énervements et tous les autres mots qui peuvent décrire un comportement humain. Allez ma thèse est finie et la tienne sent bon la fin. Tu as déjà plein de super papiers, fait un super boulot, essaie d'avoir le plus possible confiance en toi et je te promets que tu vas tout déchirer !!! En tout cas, tu le sais, ce n'est pas parce que la thèse est finie que notre amitié s'arrête et ma porte sera toujours ouverte surtout à l'heure de l'apéro ;-). De toute façon, je suis sure que tu vas m'appeler au secours pour la mise en page de ton manuscrit !! Mais fais gaffe, prépare la provision de M&M's.*

*A la deuxième partie de l'équipe, **Anne**, **Fabien**, **Alisson**, **Françoise** que de bons moments passés avec vous. Et puis Anne, on a été plus souvent dans le même bureau que dans des bureaux séparés. Et du coup je n'ai pas perdu ma bonne habitude de venir papoter avec toi quand l'occasion se présentait. Alisson, bon courage pour l'aventure que tu commences avec ta thèse mais je ne me fais pas de souci pour toi. Et Fabien, l'ami des orchidées !!! Merci pour toutes nos conversations, nos bons moments de rigolade et surtout merci pour les protéines recombinantes je pense que je ne les aurais pas encore si tu ne m'avais pas filé un petit coup de main.*

*A tous les copains qui ont fait de ces années un vrai moment de plaisir, et surtout de pause café et déjeuner vraiment sympa. Alors je vais essayer de citer tout le monde : **Gégé**, **Greg**, **Momo**, **Karine**, **Benoit**, **Marilyne**, **Anne-Lise**, **Marlène**, **Claire, Gaëlle, Nicolas, Evelyne** et tous les autres…*

*A toute ma **famille** et **belle famille**, **frère, sœur**, **neveu**, **nièces**, **grands-parents** et surtout mes **parents** qui m'ont toujours soutenue et cru en moi. Quand j'ai eu quelquefois envie de baisser les bras ils ont su trouver les mots justes. J'espère que vous serez fiers de moi et que vous me soutiendrez encore et toujours dans les projets à venir.*

*Un paragraphe spécial pour ma **mémé,** ma **mamie** et mon **papy** qui m'ont quittée trop tôt à mon goût. Tu vois mémé le fait de mettre les « mains dans l'brin » aura quand même eu un résultat. Je pense fort à vous.*

*Enfin et surtout à ma Famille, mon mari,* ***Sébastien****, ma fille,* ***Lise****, et à notre petit* ***bébé*** *qui grandit doucement dans le creux de mon ventre. Vous êtes ma plus belle réussite et ma plus grande fierté. Sans vous, tout cela n'aurait jamais été possible. Ma fille m'a donné une belle leçon de courage lorsqu'à 1 mois elle était reliée à des « tuyaux » pour l'aider à respirer, à se nourrir et qu'elle m'a fait son premier sourire. À ce moment là, je me suis dit que je devrai toujours avoir cette force et ce courage en moi pour ne jamais la décevoir, j'espère qu'un jour tu seras fière de ta maman comme je suis déjà si fière de toi. Et je voudrais finir ces remerciements pour dire à mon époux qui me répète souvent qu'il est fier de moi que cette fierté est plus que réciproque et que son courage à reprendre et à réussir des études de Pharmacie font de lui un homme que j'admire tous les jours un peu plus même si les temps peuvent paraître durs.*

# Résumé

Parmi les nématodes gastro-intestinaux ayant un impact majeur sur la santé des ruminants *Haemonchus contortus* est l'espèce la plus pathogène. Actuellement, le contrôle des populations parasitaires repose sur les traitements anthelminthiques dont l'efficacité est limitée par l'émergence de parasites résistants. L'établissement de nouvelles stratégies de lutte (thérapeutiques ou vaccinales) repose actuellement sur l'identification de nouvelles cibles moléculaires. Ainsi, les gènes spécifiquement régulés lors de la phase précoce d'interaction du parasite *H. contortus* avec son hôte sont des cibles de choix. Afin d'identifier ces gènes, 4 banques d'*H. contortus* enrichies en ADNc spécifiquement exprimés au stade L4 (5 jours après infestation) ont été obtenues par la technique d'Hybridation Suppressive et Soustractive (SSH). Sur 400 clones criblés (dot-blot, RT-PCR), 51 clones d'intérêts ont été regroupés en 10 contigs. Les candidats possèdant un peptide signal de sécrétion ont fait l'objet d'une étude plus approfondie. Les homologues de ces candidats ont été recherchés chez les deux autres principales espèces de strongles gastro-intestinaux (*T. circumcincta* et *T. colubriformis*) dans le but d'évaluer leur polymorphisme. La production et la purification des protéines recombinantes correspondant à ces ces candidats a également été réalisée afin de tester leur éventuel pouvoir immunogène.

# Résumé en anglais

Gastro-intestinal nematodes such as *Haemonchus contortus* have a major impact on health of small ruminants world-wide. The control of infections remains largely based on anthelminthic treatments, but spreading of resistance has reduced their efficiency. An attractive solution would be the development of anti-nematode vaccines. Genes expressed during the early parasitic stage of *H. contortus* constituted our main targets. We have developed an approach based on SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) technique and generated 4 subtracted cDNA libraries of *H. contortus* enriched in cDNA specifically expressed during L4 stage (five days post infection). 400 clones were analyzed by dot-blot and and 51 clones regrouped in 10 contigs. All contigs were validated by RT-PCR. Homologues of candidates possessing a signal peptide were searched in *T. colubriformis* and *T. circumcincta* to evaluate their polymorphism. Recombinant proteins of theses candidates were produced and purified in order to know if they have a good vaccine potential with cross protection against two major gastro-intestinal nematodes.

# Table des matières

Table des matières ..... 13
Liste des tableaux ..... 16
Liste des figures ..... 17
Liste des annexes ..... 18
Liste des principales abréviations ..... 19
Introduction ..... 21
Première partie Contexte bibliographique ..... 25
I Généralités. ..... 27
1. Présentation générale des nématodes. ..... 27
2. Les nématodes gastro-intestinaux. ..... 28
a. Classification des trichostrongles. ..... 28
b. Le cycle biologique des strongles gastro-intestinaux. ..... 29
3. Les principales espèces de strongles d'intérêt agronomique. ..... 31
*a. Haemonchus contortus.* ..... 31
*b. Teladorsagia circumcincta* ..... 33
*c. Trichostrongylus colubriformis.* ..... 34
4. Le pouvoir pathogène des trichostrongles. ..... 35
a. Strongylose gastro-intestinale des ruminants. ..... 36
b. Le pouvoir pathogène d'*Haemonchus contortus* : l'haemonchose ovine. ..... 36
5. Les moyens de contrôle des trichostrongles. ..... 37
a. Lutte chimique : les traitements anthelminthiques. ..... 38
i. La résistance aux anthelminthiques. ..... 39
ii. Mesures permettant de limiter le contournement de la résistance. ..... 39
b. Lutte biologique. ..... 40
i. Les champignons nématophages. ..... 40
ii. Les bactéries. ..... 40
c. Alternance des traitements. ..... 41
i. La nutrition complémentée. ..... 41
ii. La rotation des pâturages. ..... 41
d. La vaccination. ..... 42
i. Généralités. ..... 42
ii. La vaccination dirigée contre H. contortus. ..... 44
♦ Les antigènes cachés ..... 45
♦ Les antigènes naturels ..... 46
♦ Le mucus. ..... 46
iii. Les limites de la vaccination. ..... 47
6. Objectifs de la thèse. ..... 47
a. Stratégie générale de la techniqe SSH. ..... 48
b. Choix du stade. ..... 48
Deuxième partie Résultats ..... 51
II Résultats. ..... 53
1. Obtention des banques d'ADNc par la technique de SSH. ..... 53
2. Résultats obtenus par la technique SSH. ..... 56

a. Obtention des banques soustraites. 56
b. Clonage et séquençage des fragments de la banque soustraite enrichie au stade L4. 57
3. Analyse des fragments obtenus par la technique SSH. 60
a. Analyse des banques d'ESTs. 60
b. Cinétique d'expression des gènes candidats au cours des stades libres et parasitaires. 61
4. Obtention des ADNc complets. 62
a. Analyse des banques protéiques 62
b. Cinétique d'expression des gènes candidats au cours des stades du cycle parasitaire. 64
5. Caractérisation des candidats. 66
a. Caractérisation d'Hco-FAR-1. 66
b. Caractérisation d'Hco-TTL-1. 67
c. Caractérisation d' Hco-SLP-1. 67
d. Caractérisation d'Hco-LON-1. 68
e. Caractérisation d'Hco-LIP-1. 69
f. Caractérisation d'Hco-PSSP-1. 70
g. Caractérisation d'Hco-COL-166. 71
h. Caractérisation d'Hco-PSSP-2. 71
*6.* Recherche et caractérisation des candidats chez *T. circumcincta* et *T. colubriformis.* 72
a. Conservation des séquences entre espèces. 73
7. Production des protéines recombinantes. 76
Troisième partie Discussion 79
III Discussion. 81
1. Stratégie générale. 81
2. Les gènes candidats. 82
a. Gènes codant pour des protéines ayant une interaction avec les lipides. 82
i. Hco-far-1. 82
ii. Hco-slp-1. 84
iii. Hco-lip-1. 84
b. Gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement. 85
i. Hco-lon-1 85
ii. Hco-col-166. 86
c. Gènes codant pour des protéines n'ayant pas de fonction connue. 87
i. Hco-ttl-1. 87
ii. Hco-nim-1 et Hco-nim-2. 88
iii. Hco-pssp-1. 88
iv. Hco-pssp-2 89
3. Cibles potentielles ? 89
Quatrième partie Perspectives et Conclusion 91
IV Perspectives. 93
1. Immuno-localisation et test de l'activité des candidats. 93
2. Validation de l'implication des candidats dans les mécanismes d'invasion. 94
3. Essais vaccinaux 94
V Conclusion. 97
Quatrième partie Matériels et Méthodes 99
VI Matériels et methods. 101

1. Matériels biologiques. ... 101
a. Extraction des œufs. ... 101
b. Récupération des larves L3 et xL3. ... 101
c. Récupération des larves L4 et adultes. ... 101
d. Récupération du mucus. ... 102
e. Récupération des ganglions lymphatiques abomasaux. ... 102
f. Récupération des sera. ... 102
2. Manipulation des acides nucléiques. ... 102
a. Extraction des ARN totaux ... 102
b. Dosage des ARN. ... 103
3. Hybridation Suppressive Soustractive (SSH). ... 103
a. Synthèse des ADNc. ... 105
b. Amplification des ADNc. ... 105
c. Préparation des ADNc pour la soustraction ... 105
d. Ligation des adaptateurs ... 105
e. Hybridation soustractive. ... 106
f. Amplification par PCR. ... 106
4. Clonage moléculaire. ... 108
a. Ligation. ... 108
b. Transformation bactérienne. ... 108
5. Criblage par dot blot. ... 108
a. Transfert des colonies et fixation de l'ADN. ... 108
b. Marquage des sondes. ... 109
c. Hybridation des membranes, lavages et détection. ... 109
6. Identification des ADNc complets. ... 110
a. 3' RACE PCR. ... 110
b. SL1-PCR. ... 110
7. Séquençage et analyse des séquences nucléotidiques et protéiques. ... 110
8. Production de protéines recombinantes. ... 111
a. Vecteur d'expression en bactérie ... 111
b. Amplification et purification des plasmides. ... 112
c. Transformation bactérienne ... 112
9. Expression des protéines recombinantes. ... 113
a. Purification des protéines de fusion. ... 113
b. Electrophorèse en condition dénaturante sur gel de polyacrylamide ... 113
c. Coloration au bleu de Coomassie. ... 114
d. Western blot. ... 114
i. Révélation de la production des protéines recombinantes par un anticorps anti-HIS. ... 114
ii. Révélation de l'immunogénicité des protéines recombinantes. ... 115
10. Essai de vaccination. ... 115
ARTICLE ... 117
Bibliographie ... 143
Annexes ... 155

# Liste des tableaux

Tableau n°1 : Principaux trichostrongles parasites de ruminants domestiques. ..... 29
Tableau n°2 : Classification des anthelminthiques actifs chez les ovins en fonction de leur site d'action. ..... 38
Tableau n°3 : Liste des vaccins antiparasitaires commercialisables et /ou fabriqués ou distribués par des organisations gouvernementales, d'après Vercruysse et al, 2007. ..... 43
Tableau n°4 : Résumé des candidats obtenus par les 4 banques soustraites. ..... 59
Tableau n°5 : Résumé de l'analyse des banques ESTs par les candidats obtenus par la technique SSH. ..... 60
Tableau n°6 : Résumé des candidats validés par RT-PCR analysés par les banques protéiques et détermination des ADNc complets. ..... 63
Tableau n°7 : synthèse des homologues obtenus chez *Tci* (*T. circumcincta*) et *Tco* (*T. colubriformis*). MM : masse moléculaire, PI : point isoélectrique. ..... 73

# Liste des figures

Figure n°1 : Représentation schématique du cycle parasitaire d'un nématode gastrointestinal, Haemonchus contortus, parasite d'ovins. 30
Figure n°2 : *H. contortus* adultes issus de prélévement au niveau de la caillette d'un mouton autopsié. 32
Figure n°3 : Morphologie d'*Haemonchus contortus*. 33
Figure n°4 : Morphologie de *Teladorsagia circumcincta*. 34
Figure n°5 : Morphologie de *Trichostrongylus colubriformis*. 35
Figure n°6 : Estimation de l'anémie par la technique de Famacha en observant les muqueuses conjonctivales. 37
Figure n°7 : Représentation schématique de la technique SSH. 54
Figure n°8 : Représentation schématique de l'optimisation de la couverture du transcriptome. 55
Figure n°9 : profils de migration des différentes étapes de la technique SSH. 56
Figure n°10 : Visualisation des 4 banques soustraites obtenues par la technique de SSH. 57
Figure n°11 : Résultat du criblage par dot-blot. 58
Figure n°12 : Validation des candidats par RT-PCR obtenus par la technique SSH. 61
Figure n°13 : Cinétique d'expression des gènes candidats sur tous les stades d'un cycle parasitaire. 65
Figure n°14 : Alignement d'Hco-FAR-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank. 66
Figure n°15 : Alignement d'Hco-TTL-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank. 67
Figure n°16 : Alignement d'Hco-SLP-1 avec son plus proche homologue identifié dans GenBank. 68
Figure n°17 : Alignement d'Hco-LON-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank. 69
Figure n°18 : Alignement d'Hco-LIP-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank. 70
Figure n°19 : Alignement d'Hco-PSSP-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank. 70
Figure n°20 : Alignement d'Hco-COL-166 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank. 71
Figure n°21 : Alignement d'Hco-PSSP-2 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank. 72
Figure n°22 : Alignement de la séquence Hco-FAR-1 avec les homologues déterminés chez *T. colubriformis* (Tco) et *T. circumcincta* (Tci). 74
Figure n°23 : Alignement de la séquence Hco-TTL-1 avec les homologues déterminés chez *T. colubriformis* (Tco) et *T. circumcincta* (Tci). 74
Figure n°24 : Alignement de la séquence Hco-LON-1 avec les homologues déterminés chez *T. colubriformis* (Tco) et *T. circumcincta* (Tci). 75
Figure n°25 : Alignement de la séquence Hco-LIP-1 avec les homologues déterminés chez *T. circumcincta* (Tci). 75
Figure n°26 : Alignement de la séquence Hco-PSSP-1 avec les homologues déterminés chez *T. circumcincta* (Tci). 75
Figure n°27 : Révélation des protéines recombinantes par l'anticorps anti-HIS. 77
Figure n°28 : Représentation schématique de la technique SSH. 104
Figure n°29 : Représentation du jeu d'amorces lors de la réalisation de la technique SSH. 107
Figure n°30 : Représentation schématique de la technique 3'RACE. 110
Figure n°31 : Carte du vecteur pET-22b(+) de chez Novagène 112

# Liste des annexes

Annexe n°1 : Amorces utilisées pour le clonage des ADNc complets ..... 157
Annexe n°2 : amorces utilisées lors de la réalisation de la technique SSH. ..... 157
Annexe n°3 : amorces validées au cours des expérimentations de RT PCR et utilisées pour le clonage des ADNc complets. . 159
Annexe n°4 : amorces utilisées et non validées au cours des expérimentations de RT-PCR ..... 160
Annexe n°5 : Amorces utilisées pour la construction des protéines recombinantes. ..... 161

# Liste des principales abréviations

| | |
|---|---|
| aa | acide aminé |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ARNm | ARN messager |
| DEPC | Diéthylpyrocarbonate |
| DIG | Digoxygénine |
| DTT | Dithiothreitol |
| dNTP | Désoxyribonucléotide triphosphate |
| EDTA | Ethylène diamine tétra acétate de sodium |
| EST | Expressed sequence tag |
| H | Heure |
| kDa | kilo Dalton |
| LB | Luria Broth |
| min | minute |
| MM | Masse Moléculaire |
| pb | paire de bases |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PI | Point Isoélectrique |
| RACE-PCR | Rapid Amplification Chain Extension PCR |
| RT-PCR | Reverse Transcriptase PCR |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| SSH | Suppression Subtractive Hybridization |
| TBE | Tris Borate EDTA |

# Introduction

La France est le troisième pays producteur de petits ruminants de l'Union européenne derrière le Royaume-Uni et l'Espagne. Le cheptel ovin français se compose d'environ 9 millions d'animaux, dont 6,7 millions de femelles reproductrices (majoritairement des brebis allaitantes) réparties dans approximativement 50 000 élevages. Plus de la moitié des effectifs de brebis et d'agnelles est localisée dans 4 régions du sud ouest de la France : le Poitou-Charentes, l'Auvergne, la région Midi-Pyrénées et la région Provence-Alpes-Côtes d'Azur. La France est également le deuxième consommateur européen de viande ovine et caprine. Les viandes ovines et caprines représentent 4,1% de la consommation totale de viande en France et 2,8% dans l'union européenne. (Office de l'élevage, 2007).

Il existe principalement trois espèces de strongles gastro-intestinaux : *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Ce sont des nématodes parasites du tube digestif qui sont présents chez tous les ruminants de rente (bovins, ovins et caprins) et qui ont un impact majeur sur la santé des ruminants. En effet, ces parasites occasionnent de fortes baisses de production et peuvent entraîner la mort des animaux les plus infestés.

Les méthodes de lutte contre les strongles digestifs reposent essentiellement sur des traitements chimiques de synthèse : les anthelminthiques. Cependant, l'utilisation massive de ces composés a induit à l'apparition et l'émergence de populations de nématodes résistantes aux traitements. Actuellement, des méthodes de lutte alternatives doivent donc être mises au point de manière à être en mesure de traiter efficacement les animaux de rente et de limiter l'apparition et l'émergence de nouvelles résistances, ou bien de renforcer les capacités de défense des hôtes. De ce fait la compréhension des mécanismes de résistance aux nématodes gastro-intestinaux est donc devenue un véritable défi scientifique avec des conséquences économiques importantes.

L'équipe multirésistance et pouvoir pathogène des nématodes (MPN) de l'INRA de Tours travaille principalement sur l'étude des mécanismes d'acquisition et de diffusion de la résistance aux anthelminthiques chez ces nématodes. Si la compréhension des mécanismes de résistance développés par les nématodes constitue un enjeu majeur notamment dans le but de prévoir l'émergence dans les populations d'individus résistants, ainsi que pour la mise au point de diagnostiques, un autre volet doit impérativement être développé pour mettre au point de nouvelles stratégies de lutte. Pour cela, il est nécessaire de connaître les mécanismes utilisés par les nématodes pour pénétrer, s'installer et se maintenir au sein de leur hôte. Ainsi, le projet qui m'a été confié avait pour objectif d'identifier des gènes impliqués dans la virulence comme,

l’installation du parasite et l’échappement au système immunitaire de l’hôte. En effet ces gènes peuvent constituer des cibles privilégiées pour la mise au point de nouvelles méthodes de lutte.

Ce manuscrit va ainsi s'articuler autour de trois axes principaux : le premier axe est un rappel bibliographique sur le nématode parasite modèle *Haemonchus contortus* ainsi que sur deux autres espèces de nématodes gastro-intestinaux, les moyens de lutte utilisés contre les strongles gastro-intestinaux et les méthodes de lutte alternative. Le deuxième axe concernera les résultats obtenus. La troisième partie est une discussion générale sur le travail réalisé au cours de la thèse et sur les perspectives de recherche qui s’ouvrent à l’issue de ce travail.

# Première partie

# Contexte bibliographique

# I Généralités.

## 1. Présentation générale des nématodes.

Les nématodes sont des métazoaires triploblastiques pseudocoelomates appartenant à l'embranchement des némathelminthes. Ce groupe zoologique est caractérisé par une structure anatomique simple et présente des caractéristiques morphologiques homogènes (Maggenti, 1991). Schématiquement, ces animaux vermiformes non segmentés possèdent une cuticule externe sous-tendue par quatre cordons musculaires, un tube digestif et des glandes génitales. Ce groupe, dans lequel plus de 25 000 espèces ont été décrites à ce jour, présente une grande diversité de modes de vie. Certaines espèces sont libres, et se rencontrent aussi bien dans le sol que dans l'eau douce ou salée, d'autres sont parasites d'animaux ou de plantes.

Les nématodes libres sont généralement de petite taille (~1mm à l'état adulte) et sont aquatiques. Ils se trouvent principalement dans les sédiments océaniques ou lacustres ainsi que dans l'eau interstitielle du sol où ils participent à l'équilibre biologique de leur environnement en recyclant la matière organique et minérale. C'est à cette catégorie de nématodes qu'appartient l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*.

Les nématodes parasites de plantes (0,5 à 1,5 mm à l'état adulte) possèdent une vaste gamme d'hôtes s'étendant des graminées jusqu'aux arbres ligneux. Certaines espèces s'attaquent aux parties aériennes de la plante mais la majorité d'entre elles se localisent au niveau du système racinaire. Ces nématodes ont une très forte incidence économique sur les productions agricoles. Au niveau mondial, les pertes qu'ils occasionnent sur les cultures ont été estimées à plusieurs milliards d'euros par an (Sasser, 1987). En raison de leur extrême résistance aux conditions environnementales et de leur mode de vie essentiellement souterrain, il est très difficile de combattre ces nématodes.

Les nématodes parasites d'animaux représentent environ 45% des espèces décrites (Hugot, 2001.) et vivent aux dépens d'une très large gamme d'hôtes comprenant des invertébrés (annélides, arthropodes, mollusques) et des vertébrés. Leur taille varie en fonction de l'espèce. En raison de leur impact sur la santé humaine ou animale, de nombreuses espèces font l'objet d'une recherche active.

Dans le cadre de mon travail, nous nous sommes intéressés aux nématodes parasites d'animaux et plus particulièrement aux nématodes gastro-intestinaux présentant un impact agronomique.

## 2. Les nématodes gastro-intestinaux.

Les principaux nématodes gastro-intestinaux d'intérêt agronomique sont *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Ils vivent dans la lumière du tube digestif (caillette pour *H. Contortus* et *T. circumcincta*, intestin grêle pour *T. colubriformis*) et se nourrissent des substances alimentaires de l'hôte sauf pour *H. contortus* qui est hématophage. Parmi les différentes espèces, *T. circumcincta* et *T. colubriformis* sont présents dans tous les élevages ovins d'Europe tempérée. La répartition géographique du strongle *H. contortus* est quant à elle plus influencée par les conditions climatiques. En effet, on le retrouve principalement en régions tropicales.

### a. Classification des trichostrongles.

La classification des trichostrongles est donnée d'après Durette-Desset et Chabaud (1993).

| | |
|---|---|
| Phylum | Némathelminthes |
| Classe | Nématodes |
| Sous-Classe | Secernenta |
| Ordre | Strongylida |
| Sous-Ordre | Trichostrongylina |
| Super-Famille | Trichostrongyloida |
| Famille | Trichostrongylidae |

La famille des trichostrongles comprend quatre sous-familles : Cooperiinae, Ostertaginae, Trichostrongylinae et Haemonchinae (**cf tableau n°1**)

| Sous-Famille | Espèces | Organe | Hôtes |
|---|---|---|---|
| **Cooperiinae** | *Cooperia curticei* | Intestin grêle | Bovins, Ovins, Caprins |
| | *Cooperia oncophora* | Intestin grêle | Bovins, Ovins |
| **Ostertagiinae** | *Teladorsagia circumcincta* | Caillette | Ovins |
| | *Ostertagia ostertagi* | Caillette | Bovins, Ovins, Caprins |
| **Trichostrongylinae** | *Trichostrongylus colubriformis* | Intestin grêle | Ovins, Caprins |
| | *Trichostrongylus axei* | Caillette | Bovins, Ovins, Caprins |
| **Haemonchinae** | ***Haemonchus contortus*** | **Caillette** | **Ovins, Caprins** |
| | *Haemonchus placei* | Caillette | Bovins |
| | *Haemonchus similis* | Caillette | Bovins |
| | *Haemonchus longistipes* | Caillette | Dromadaires |

**Tableau n°1 : Principaux trichostrongles parasites de ruminants domestiques.**

La systématique des strongles est essentiellement basée sur les caractères morphologiques des vers adultes (longueur, appareil reproducteur mâle, bourse caudale et longueur des spicules). On distingue le mâle de la femelle par la présence d'une bourse caudale avec des spicules caractéristiques au niveau de l'extrémité postérieure du mâle (**cf figures n°3, 4 et 5**). Chez les trichostrongles, l'identification est impossible au stade œuf et la diagnose des stades larvaires infestants est limitée au genre.

Cette classification évolue au fur et à mesure des années avec l'utilisation des techniques de biologie moléculaire. Ces dernières ont permis de mettre en évidence la variabilité génétique notamment au niveau du strongle *H. contortus* sur des marqueurs neutres par des techniques différentes telles que l'étude des alloenzymes (Bentounsi & Cabaret, 1999) et par la technique de Random Amplification Polymorphism DNA (RAPD) (Humbert & Cabaret, 1995; Jacquiet *et al.*, 1995).

## b. Le cycle biologique des strongles gastro-intestinaux.

Le cycle des strongles gastro-intestinaux est un cycle monoxène (absence d'hôte intermédiaire) et possède deux phases distinctes : une phase libre qui se déroule au pâturage et une phase parasitaire chez l'hôte ruminant (**cf figure n°1**).

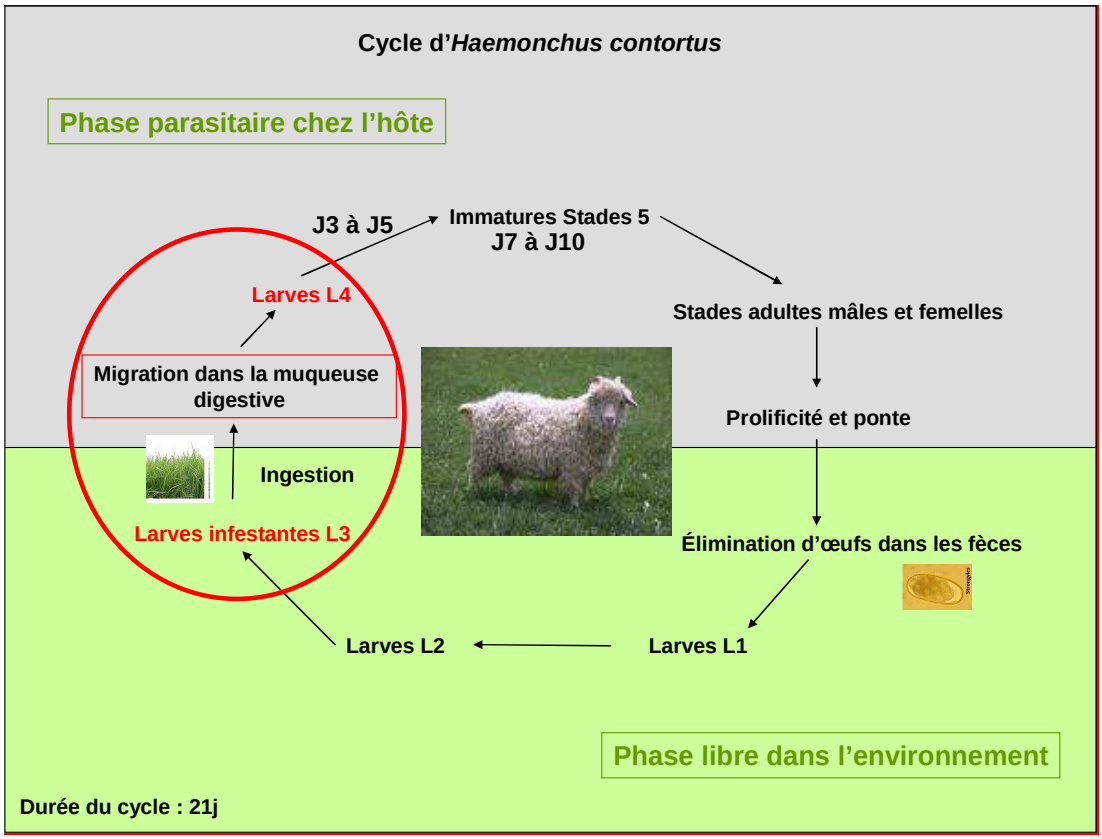



**Figure n°1 : Représentation schématique du cycle parasitaire d'un nématode gastrointestinal, Haemonchus contortus, parasite d'ovins.**

Le cycle évolutif du parasite comprend cinq stades séparés par des changements structuraux. Les deux premiers stades et une partie du troisième stade se déroulent au cours de la phase libre. La deuxième partie du stade 3 et les stades 4 et 5 ont lieu pendant la phase parasitaire.

La phase libre : cette phase commence par l'excrétion des œufs par les femelles dans les matières fécales sur le pâturage. Les œufs s'embryonnent et éclosent en larves de stade 1 (L1). La durée du stade embryonnaire varie selon les températures. Le développement le plus favorable serait une température de 26°C (Veglia, 1916). Les L1 muent pour aboutir au stade 2 (L2). Ces deux premiers stades se nourrissent de matières organiques et de micro-organismes des matières fécales, et sont peu résistantes dans le milieu extérieur ce qui explique un taux de mortalité très élevé. Les larves L2 subissent une nouvelle mue qui sera incomplète et donnent naissance au stade 3 (L3) qui correspond au stade infestant. Les larves L3 sont extrêmement résistantes au milieu extérieur grâce à leur exuvie et à leurs réserves lipidiques. Lors de cette phase, les caractéristiques du climat (température et humidité) modulent le développement des œufs en larves infestantes mais également la survie des larves infestantes au pâturage. D'après Veglia, la température doit se situer entre 23°C et 30°C et un taux d'humidité aux alentours de

70%. La durée de cette phase est d'environ 5 à 6 jours dans les conditions optimales et peut durer 2 à 3 semaines en pays tempérés.

La phase parasitaire : cette phase commence par l'ingestion des larves L3 infestantes par l'hôte lors du pâturage. Les larves L3 vont subir la perte de leur gaine, qui était une gaine protectrice leur permettant de survivre dans le milieu extérieur, pour donner naissance aux larves xL3 et pénètrer dans la muqueuse pour muer en larves de stade 4 (L4). Celles-ci peuvent s'enkyster dans la muqueuse digestive au moment de l'hiver communément appelé phénomène d'hypobiose larvaire et reprendre leur développement au moment du printemps. Les larves de stade 4 vont ensuite regagner la lumière intestinale et muer en larve de stade 5 aussi appelées stades juvéniles pour aboutir ensuite aux stades adultes mâles et femelles.

Pour chaque espèce de strongle, il existe une combinaison optimale des paramètres environnementaux qui assure un rapport maximal entre le nombre de larves infestantes obtenues et le nombre d'œufs émis.

## 3. Les principales espèces de strongles d'intérêt agronomique.

Les infestations en conditions naturelles c'est-à-dire lors du pâturage sont des multi-infestations. Les ovins/caprins sont infestés non pas par une seules espèce de strongle mais la plupart du temps par les trois espèces en même temps.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis donc intéressée aux trois espèces de strongles d'intérêt agronomique. Néanmoins, au vu de la pathogénicité provoquée par le strongle *H. contortus*, mon étude s'est d'abord focalisée sur ce nématode puis les études ont été élargies aux deux autres espèces de strongles.

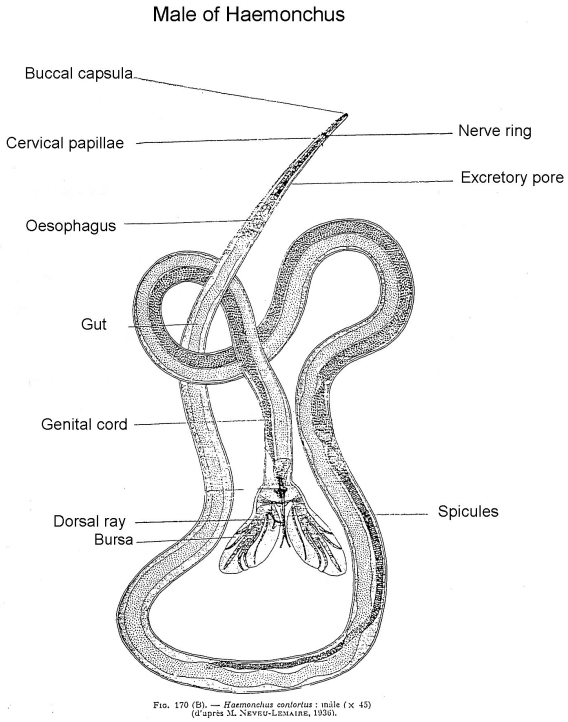
### *a. Haemonchus contortus.*

*Haemonchus contortus* est un strongle inféodé à la caillette qui à la particularité d'être hématophage. Cette caractéristique entraîne un pouvoir pathogène plus important par rapport aux autres strongles gastro-intestinaux. En effet, les parasites hématophages absorbent le sang des fins vaisseaux capillaires des muqueuses digestives pouvant provoquer des anémies plus ou moins sévères. Il a été montré que 2000 femelles ponctionnent 30 ml de sang par jour à un mouton. De plus la femelle est extrêmement active en terme de ponte (excretion d'environ 5000 à 7000 œufs/jour (Coyne *et al.*, 1991)). Sa morphologie est représentée **figures n°2 et n°3**.

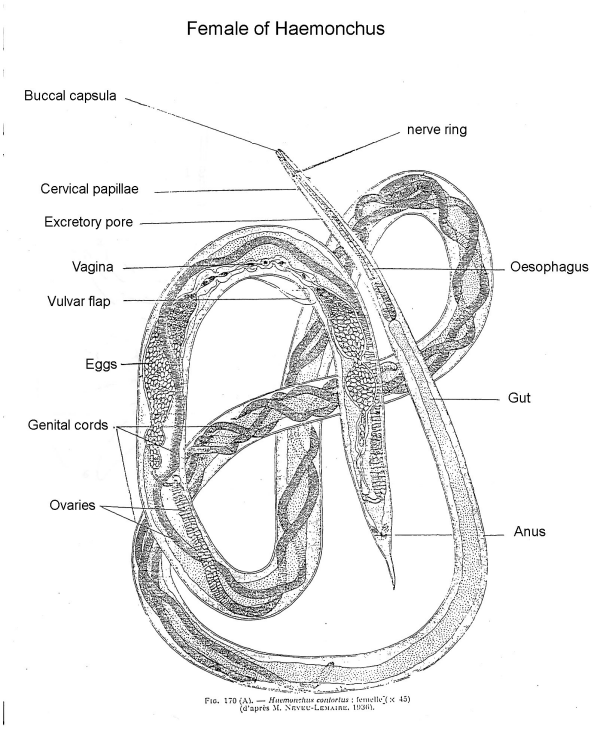


**Figure n°2 : *H. contortus* adultes issus de prélèvement au niveau de la caillette d'un mouton autopsié.**

**A**




**B**



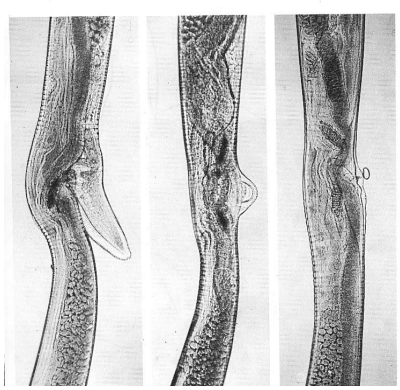



**Figure n°3 : Morphologie d'*Haemonchus contortus*.**

*A : représentation schématique du mâle avec la présence de la bourse caudale ; B : représentation schématique de la femelle avec sa morphologie supravulvaire, C : linguiforme, D : boutonnée, E : lisse.*

*H. contortus* parasite principalement deux espèces d'hôtes de rente (ovins/caprins). Néanmoins, *H. contortus* est la principale espèce de strongle rencontrée chez le mouton au niveau des zones tropicales (l'Afrique, l'Amérique centrale et le sud-est Asiatique) et sub-tropicales (l'Australie et l'Amérique du sud). Cependant, on note également une large représentation de cette espèce dans les pays européens (Eysker *et al.*, 2005; Waller *et al.*, 2004).

En raison de sa forte pathogénicité, *H. contortus* est l'espèce de strongle la plus étudiée, le génome de cette espèce est en cours de séquençage (isolat ISE *H. contortus* (Roos *et al.*, 2004). C'est pourquoi, mon étude va donc se porter essentiellement sur ce strongle.

### *b. Teladorsagia circumcincta.*

*T. circumcincta* se rencontre partout dans le monde à l'exception des zones tropicales. En France, il est présent dans la majorité des régions d'élevages ovins et caprins et infeste 80 à 100% des hôtes disponibles (Chartier & Reche, 1992). Sa localisation chez son hôte est la caillette dont il occupe aussi bien la partie pylorique que fundique. *T. circumcincta* est une espèce à sexes séparés. Le printemps et l'automne constituent les périodes durant lesquelles le risque d'infestation est le plus fort en Europe pour la majorité des helminthes, ce qui s'explique par les conditions climatiques favorables au développement et à la survie des larves infestantes de troisième stade. La morphologie et les caractéristiques du nématode *T. circumcincta* sont représentées sur la **figure n°4.**

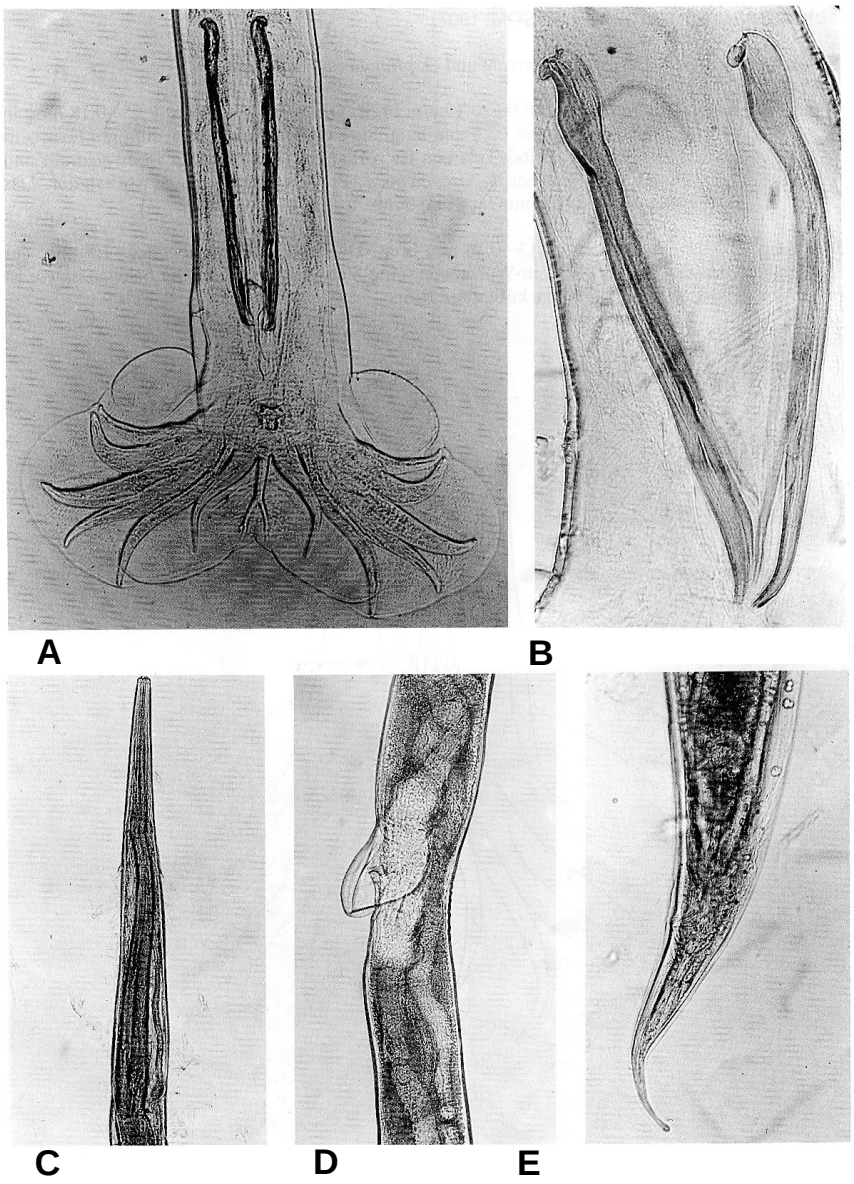



**Figure n°4 : Morphologie de *Teladorsagia circumcincta.***

*A : Bourse caudale du mâle adulte, B : Spicules, C : cavité buccale, D : languette supra vulvaire, E : extrémitécaudale effilée de la femelle.*

### *c. Trichostrongylus colubriformis.*

*T. colubriformis* est un parasite de la portion proximale de l'intestin grêle des petits ruminants. Sa distribution géographique est mondiale. C'est une espèce qui tolère des températures plus basses que l'espèce *H. contortus.* Les infestations liées à *T. colubriformis* sont généralement asymptomatiques. Lors d'infestations importantes, les signes cliniques sont principalement un syndrome diarrhéique plus ou moins marqué, associé à un amaigrissement progressif. La morphologie et les caractéristiques de ce strongle sont représentées sur la **figure n°5**.

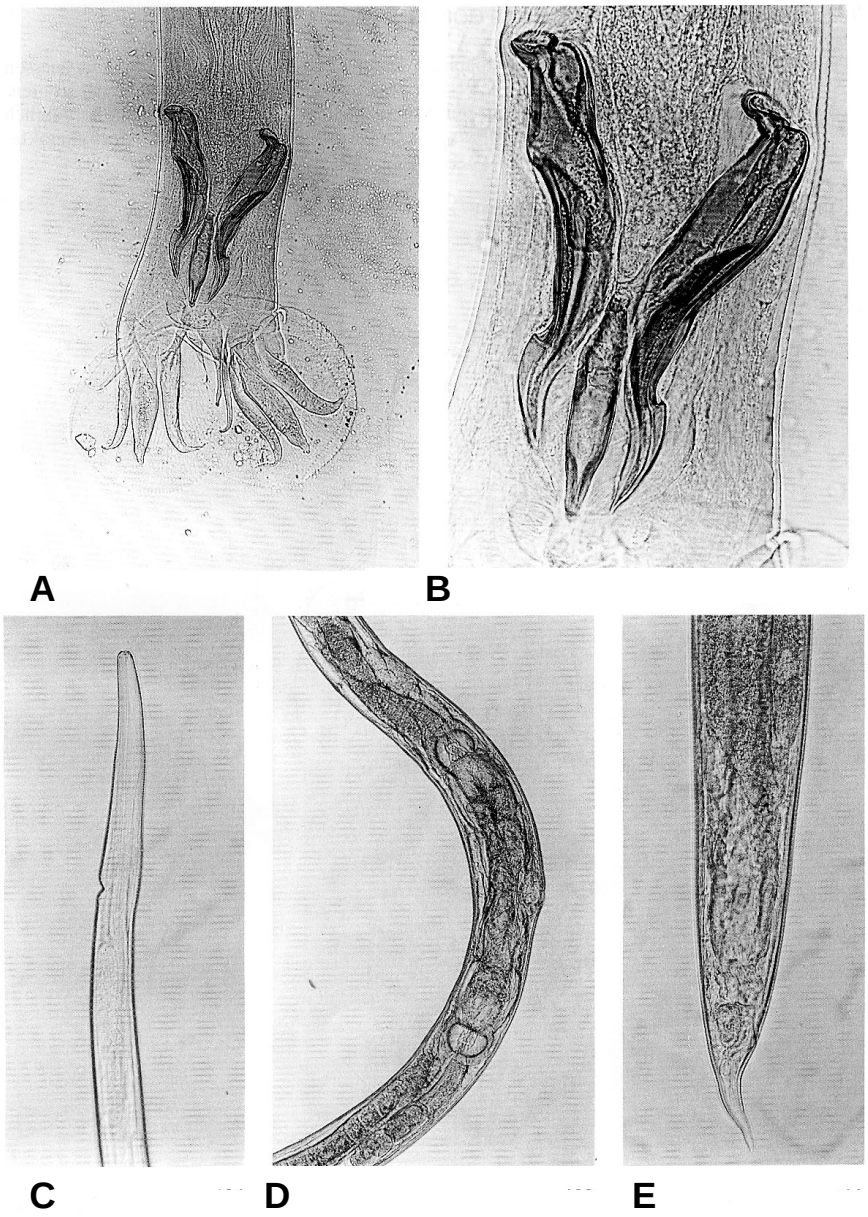



**Figure n°5 : Morphologie de *Trichostrongylus colubriformis.***

*A : Bourse caudale du mâle adulte, B : spicules, C : cavité buccale, D : Vulve de la femelle, E : extrémité caudale effilée de la femelle.*

## 4. Le pouvoir pathogène des trichostrongles.

Certaines infestations sont asymptomatiques surtout en ce qui concerne les strongles *T. circumcincta* et *T. colubriformis*. Néanmoins lors d'infestations importantes, les manifestations cliniques sont principalement un syndrome diarrhéique plus ou moins marqué. De plus, lors d'infestation par le strongle *H. contortus* la manifestation clinique la plus importante est un syndrome anémique du fait de son caractère hématophage.

### a. Strongylose gastro-intestinale des ruminants.

La présence des strongles perturbe les trois étapes principales de l'assimilation des aliments par l'hôte : l'ingestion, la digestion et la métabolisation (Hoste, 1997).

Les lésions des muqueuses digestives liées aux nématodes sont à relier à un effet mécanique. En effet, *H. contortus* présente une néoformation dentale qui lui permet de jouer un rôle majeur dans la nutrition. En parallèle avec cette action mécanique, un certain nombre de molécules chimiques participent à la genèse des perturbations physiopathologiques. Les trichostrongles vont émettre localement dans leur environnement des substances de nature chimique variée telles que des produits d'excrétion-sécrétion (Schallig *et al.*, 1996) ou des enzymes spécifiques des parasites (Jones DG & DP, 1990). Les enzymes les plus fréquemment retrouvées dans les produits d'excrétion-sécrétion sont les protéases et l'acétylcholinestérase. De manière générale, ces substances vont contribuer à assurer le développement, la survie et la reproduction du parasite chez son hôte (Lee, 1996).

### b. Le pouvoir pathogène d'*Haemonchus contortus* : l'haemonchose ovine.

L'Haemonchose ovine est une maladie qui peut atteindre des animaux de tous âges et qui se traduit essentiellement par un syndrome d'anémie dont l'évolution est rapidement mortelle en cas d'infestation massive (Chermette, 1982). En effet, *Haemonchus contortus* est hématophage à partir du stade L4 intra-muqueux ce qui va entraîner une altération de l'état de santé de l'animal qui aboutira à une diarrhée avec perte de poids, une laine de mauvaise qualité et une altération des capacités de reproduction (Poppi *et al.*, 1990).

Dans les pays tropicaux, cette maladie a un impact économique très important car la mortalité des animaux par l'haemonchose ovine peut atteindre jusque 40% (Vlassoff & McKenna, 1994).

Trois formes d'haemonchose ovine ont été décrites (Chermette, 1982) :

La forme suraigue : forme la plus rare d'haemonchose. Elle est consécutive à une infestation massive et va être la cause d'hémorragies gastriques multiples ce qui provoquera une anémie intense rapidement mortelle en moins d'une semaine.

La forme aigue : forme typique de l'haemonchose qui intervient suite à une infestation continue. Les animaux présentent des symptômes généraux comme une faiblesse générale, un essoufflement, un amaigrissement et une chute de laine. Les symptômes locaux vont être une pâleur intense des muqueuses conjonctives, buccales et vulvo-vaginales (**cf figure n°6**). Cette forme d'haemonchose est généralement fatale en 1 à 6 semaines.

La forme chronique : forme la plus répandue. Elle apparaît lors d'infestation discrète et évoluera de façon très progressive pour aboutir à un état général détérioré. L'haemonchose chronique est souvent mal diagnostiquée car l'anémie qu'elle entraîne est difficlement détectable. Les conséquences vont être une mauvaise croissance des jeunes, une baisse de la production lactée et un amaigrissement. La mort peut survenir en 2 à 6 mois.

L'état anémique de l'animal peut être évalué à l'aide d'un simple test visuel : le Famacha (**cf figure n°6**). Ce test permet en fonction de la couleur des muqueuses conjonctives de déterminer l'état d'anémie de l'animal et d'ainsi de décider de l'opportunité d'un traitement.




**Figure n°6 : Estimation de l'anémie par la technique de Famacha en observant les muqueuses conjonctivales.**

## 5. Les moyens de contrôle des trichostrongles.

Les moyens de lutte contre les strongles gastro-intestinaux peuvent être différenciés selon la phase du cycle parasitaire. Pendant la phase libre les moyens de lutte vont constitués par la gestion du pâturage (utilisation de prairies de fauche, alternance d'hôtes d'espèces différentes), la lutte biologique (utilisation de champignons nématophages).. En ce qui concerne la phase parasitaire, les axes vont s'orienter autour de la sélection d'hôtes résistants, la vaccination, la nutrition complémentée des hôtes mais également la lutte chimique avec l'utilisation des traitements anthelminthiques.

### a. Lutte chimique : les traitements anthelminthiques.

Le premier anthelminthique utilisé avec succès sur les nématodes parasites de ruminants fut la Phénothiazine en 1938 (Roberson, 1982). Elle a été progressivement remplacée par de nouvelles molécules, dont la conservation est aisée, plus faciles d'utilisation (mode d'administration), et surtout moins contraignantes pour les éleveurs avec des délais d'abattage après traitement réduits. A l'heure actuelle la lutte contre les strongles digestifs est basée sur l'utilisation de trois grandes familles d'anthelminthiques : les benzimidazoles, les lactones macrocycliques et les imidazothiazoles (Lanusse & Prichard, 1993) (**cf tableau n°2**).

On distingue deux modes d'action : tout d'abord les composés qui se fixent sur les canaux ioniques du parasite et ensuite ceux qui interagissent avec d'autres cibles du parasite (Martin, 1997).

| Famille de molécule | Cible | Noms génériques |
|---|---|---|
| Benzimidazoles et Probenzimidazoles | β-tubuline | Thiabendazole, Cambendazole, Oxibendazole, Albendazole, Fenbendazole, Oxfendazole, Mebendazole, Thiophanate, Febantel |
| Salicylanilides (actifs contre les strongles nématophages) | Protons ionophores | Closantel |
| Imidothiazoles/ Tetrahydropyrimidines | Récepteur à l'acétylcholine | Lévamisole, Tétramisole, Pyrantel |
| Lactones Macrocycliques | Canaux à chlore | Ivermectine, Abamectine, Doramectine, Moxidectine. |

**Tableau n°2 : Classification des anthelminthiques actifs chez les ovins en fonction de leur site d'action.**

• Les benzimidazoles ont pour cible la β-tubuline qui est un constituant essentiel du cytosquelette de la cellule. Les benzimidazoles modifient l'équilibre dynamique des microtubules entraînant un désordre pour la cellule qui perd son homéostasie et provoquent la mort du nématode (Martin, 1997).

• Les lactones macrocycliques sont des agonistes du récepteur de l'acide γ-aminobutyrique et du récepteur au glutamate. Elles entraînent une paralysie flasque du

nématode liée à l'augmentation de la perméabilité aux ions chlorures (Blackhall *et al.,* 2003; Cook *et al.*, 2006).

• Les imidazothiazoles et les tetrahydopyrimidines sont des agonistes du récepteur nicotinique à l'acétylcholine. Les imidazothiazoles paralysent le nématode en provoquant une contraction musculaire permanente (Martin *et al.*, 2005).

*i. La résistance aux anthelminthiques.*

L'efficacité de ces traitements est fréquemment remise en cause du fait de l'émergence d'isolats de strongles résistants à un ou plusieurs anthelminthiques (Sayers & Sweeney, 2005).

La résistance peut être définie comme étant une réduction héritable de la sensibilité d'une population de nématodes vis-à-vis de l'action d'un anthelminthique donné. Elle s'exprime par une baisse de fréquence des individus affectés après l'exposition au principe actif, en comparaison de la fréquence observée initialement dans la même population avant la première exposition (Conder & Campbell, 1995).

Plusieurs types de résistances ont été décrits selon la capacité d'un parasite à résister à une substance unique (résistance simple), à plusieurs substances ayant un mode d'action identique ou similaire (résistance de famille) ou enfin à des composés ayant des cibles et mécanismes d'actions différents (résistance multiple) (Beugnet F, 1997).

La sélection de la résistance peut être due à plusieurs facteurs :

- Elle peut être en relation avec l'emploi répété des anthelminthiques. Plus la fréquence d'utilisation d'un anthelminthique est élevée, plus la pression de sélection est importante. Le risque maximal est représenté par une utilisation à une fréquence correspondant à la période prépatente des strongles. Chaque génération va alors être soumise à un traitement (Beugnet F, 1997).

-L'utilisation de procédés rémanents comme les diffuseurs intra-ruminaux d'anthelminthiques peuvent induire une pression de sélection permanente, par rapport à des traitements discontinus. Le but étant de laisser des refuges aux parasites chimio-sensibles (Beugnet F, 1997; Borgsteede *et al.*, 1996).

*ii. Mesures permettant de limiter le contournement de la résistance.*

Il existe des mesures permettant de limiter la sélection d'individus chimio-résistants au sein de populations parasitaires (Beugnet *et al.*, 1994; Bjorn, 1994; Borgsteede *et al.*, 1996).

- La réduction de la fréquence de traitement permettrait un contrôle des parasites.
- Mettre en œuvre des traitements lorsque les infestations sont maximales.
- Prendre en compte la rémanence des produits employés.

- Mettre en place une posologie adaptée en calculant la dose en se référant aux animaux les plus lourds.
- Mettre en place des mesures zootechniques et agronomiques capables de diminuer le nombre de traitements antiparasitaires telles que la gestion de pâturage.

## b. Lutte biologique.

### *i. Les champignons nématophages.*

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'intérêt des champignons nématophages dans la réduction des larves au sein des cultures fécales. En effet, plus de 50 espèces de champignons nématophages sont capable de capturer et de tuer les nématodes (Siddiqui & Mahmood, 1996).

Parmi les champignons nématophages, *Duddingtonia flagrans* est l'un des plus étudiés et fait l'objet de nombreuses recherches (Chandrawathani *et al.*, 2002; Larsen, 1999; Larsen *et al.*, 1998; Waller *et al.*, 2001).

*D. flagrans* a la caractéristique de produire en quantité abondante des chlamydospores qui sont capables de survivre dans un environnement très hostile notamment lors du passage dans le tractus digestifs des ruminants (Larsen, 1999). De ce fait, ces chlamydospores peuvent être administrées aux ruminants lors de l'alimentation. Après le transit digestif, les chlamidospores se développent dans les matières fécales, immobilisent et tuent les larves avant qu'elles ne se dispersent dans le pâturage. Cette technique a permis de mettre en évidence une réduction de 80% de la charge de larves infestantes au niveau de la prairie (Larsen *et al.*, 1998; Waller *et al.*, 2001).

D'autres champignons nématophages sont également étudiés. Il s'agit d'*Arthrobotrys cladodes* var *macroides* (Eslami *et al.*, 2005), *Monacrosporium eudermatum, Arthrobotrys oligospora* et *Arthrobotrys robusta (Mendoza-De Gives & Vazquez-Prats, 1994)*. Le rôle de ces champignons est identique à celui de *D. flagrans*.

### *ii. Les bactéries.*

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie ubiquitaire gram-positive qui forme des spores contenant des cristaux protéiques ayant notamment un rôle insecticide. Les protéines cristallines sont activées dans le tube digestif de l'insecte et se lient aux récepteurs membranaires intestinaux, entraînant la formation de pores dans la membrane et la mort de l'insecte (Schnepf

*et al.*, 1998). Ces cristaux protéiques sont également connus pour avoir le même effet toxique sur certains nématodes (Feitelson *et al.*, 1992).

Deux souches de *B. thuringiensis* (IB16 et IB61) ont été identifiées comme ayant une activité significative d'inhibition sur le développement larvaire d'*H. contortus*, *T. colubriformis* et *T. circumcincta.* Ces souches sont également toxiques envers les nématodes adultes (Kotze *et al.*, 2005).

Des études plus récentes sont venues confirmer ces résultats. Cent pourcent de mortalité a été observée 5 jours après inoculation de la toxine soluble (Hernandez Linares *et al.*, 2008). La souche IB-16 a également été évaluée contre *H. contortus*. Les résultats ont montré que l'activité de *B. thuringiensis* est similaire à celle observée par les traitements anthelminthiques. De ce fait, l'utilisation de la toxine *B. thuringiensis* est envisagée comme méthode de lutte alternative aux traitements anthelminthiques (Lopez ME, 2006).

## c. Alternance des traitements.

### *i. La nutrition complémentée.*

L'hôte parasité présente de nombreuses modifications métaboliques et physiologiques liées à l'infestation par les strongles gastro-intestinaux. La nutrition complémentée permet de compenser les pertes en protéines au niveau du tractus digestif et d'azote dans les matières fécales (Holmes, 1985). Un complément nutritif en protéine favorise l'acquisition de l'immunité protectrice et augmente la résistance à la ré-infestation (Coop & Holmes, 1996). Des travaux ont montré que le complément azoté permet d'augmenter la digestibilité des fourrages pauvres en fibres. Les animaux complémentés ont un niveau de productivité plus élevé et contrôlent mieux les effets du parasitisme (Knox, 1996).

### *ii. La rotation des pâturages.*

La rotation du pâturage est un procédé intéressant car il est rapide à mettre en place et à un coût très limité pour l'éleveur. Il nécessite par contre une très bonne maitrise de l'utilisation des parcelles ce qui explique sa faible utilisation en réalité. Son principe consiste à placer les animaux sur des parcelles pas ou peu contaminées par les œufs des strongles digestifs. Plusieurs méthodes sont employées pour obtenir une parcelle saine, comme la mise en repos prolongé ou le retournement régulier (tous les deux ou trois ans) des prairies lors des labours. De même, la création d'un système de pâturage mixte ou alterné, par plusieurs espèces d'hôtes (ovins puis bovins par exemple) permet sous certaines conditions, de limiter l'infestation des pâturages. Ce dernier procédé nécessite une forte spécificité du parasite pour son hôte ce qui limite son

utilisation car certaines espèces comme *Trichostrongylus axei* infestent l'ensemble des herbivores domestiques. Le même principe de pâturages mixtes peut être proposé pour une seule espèce d'hôte, mais il nécessite de placer les jeunes ruminants « sensibles » avant les hôtes adultes « résistants » sur la parcelle saine.

### d. La vaccination.

#### *i. Généralités.*

Compte tenu des éléments ci-dessus, l'ensemble des traitements permettant de lutter efficacement contre les strongles digestifs reste limité et pose le problème de résistance aux anthelminthiques apparus ces dernières années au sein des populations de nématodes. Une alternative intéressante repose sur la mise en place de nouvelles stratégies de lutte basées sur une connaissance fine du dialogue moléculaire hôte-parasite. Parmi les différentes possibilités, les stratégies vaccinales offrent des perspectives intéressantes dans la mesure où elles permettraient à la fois de proposer de nouvelles méthodes de lutte, mais aussi de prendre en compte les demandes sociétales (alimentation exempte de résidus chimiques) en limitant l'utilisation de molécules chimiques. Actuellement, les vaccins antibactériens ou antiviraux sont très répandus, cependant, très peu de vaccins antiparasitaires sont disponibles (**cf tableau n°3**).

| Parasite | Hôte | Vaccins |
|---|---|---|
| *Eimeria spp.* | Volailles | Non atténués |
| *Eimeria spp* | Volailles | Atténués |
| *Eimeria maxima* | Volailles | Vaccins sous unité d'antigène de gamétocytes. |
| *Toxoplasma gondii* | Moutons | Atténués |
| *Neospora caninum* | Bovins | Tachyzoites tués |
| *Babesia canis* | Chiens | Antigènes provenant de surnageant de culture *in vitro* |
| *Babesia bovis et B.bigemia* | Bovins | Atténués |
| *Theileria parva* | Bovins | Non atténués souches sauvages |
| *Giarda duodenalis* | Chiens | Disrupted axenically cultured whole trophozoites |
| *Leishmania infantum* | Chiens | Vaccins sous unites |
| *Taenia ovis* | Moutons | Antigènes recombinants |
| *Dictyocaulus viviparus* | Bovins | Larves L3 irradiées |
| *Boophilus microplus* | Bovins | Antigènes recombinants (Bm86) |

**Tableau n°3 : Liste des vaccins antiparasitaires commercialisables et /ou fabriqués ou distribués par des organisations gouvernementales, d'après Vercruysse et al, 2007.**

Les moutons sont continuellement exposés aux infections par les nématodes et deviennent résistants au cours des ré-infestations (Stewart, 1948). Cette induction d'une immunité protectrice est un pré-requis primordial pour la conception de vaccin. De plus, une primo-infestation par *H. contortus* peut conférer une protection croisée vis-à-vis d'autres espèces de strongles tel *T. circumcincta* chez les ovins (Reinecke RK, 1982; Stankiewicz *et al.*, 2000). La recherche de candidats de vaccins permettant de contrôler l'infestation par les strongles semble donc pertinente.

Différents vaccins ont déjà été mis en place contre des nématodes, cestodes ou bien encore contre des helminthes.

Un vaccin dirigé contre le parasite pulmonaire des bovins, *Dictyocaulus viviparus*, a été le premier vaccin anti-métazoaire et il est de nos jours toujours utilisé en Europe (Ploeger, 2002). Le vaccin était à base de larves L3 irradiées atténuées (Smith & Angus, 1980; Urquhart *et al.*, 1966). Une approche similaire a été réalisée pour obtenir un vaccin dirigé contre le nématode intestinal *Ancylostoma caninum* (Miller, 1978). Les vaccins de larves atténuées

irradiées ont également été développés contre différents nématodes gastro-intestinaux mais ces vaccins ne protègent pas les jeunes animaux et de ce fait n'ont jamais été commercialisés (Bethony *et al.*, 2006; Knox & Redmond, 2006). De plus, ces vaccins sont difficiles à produire du fait de la difficulté à récolter le nombre suffisant de larves (Emery, 1996)

Des vaccins recombinants effectifs ont été développés contre les cestodes *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* et *Echinococcus granulosus*. Ces vaccins sont basés sur l'utilisation d'antigènes de stade parasitaire adhérant à la membrane intestinale de l'hôte. L'utilisation de ces antigènes pour la vaccination induit une bonne réponse immunitaire. Ainsi, les vaccins recombinants directement dirigés contre les cestodes du genre *Echinococcus* et *Taenia* ont montré un remarquable succès avec une protection supérieure à 92% dans le cas d'infestation avec *Taenia Ovis*, 45W (Johnson *et al.*, 1989; Lightowlers *et al.*, 2000).

Chez le trématode *Fasciola hepatica*, les cathepsines L1 et L2 sont les molécules majeures sécrétées par la douve du foie et sont impliquées dans d'importantes fonctions incluant la pénétration dans les tissus hôtes et l'évasion du système immunitaire (Dalton *et al.*, 2003). Différentes études utilisant la cathepsine L comme vaccin a démontré des fluctuations au niveau de l'excrétion d'œufs dans les matières fécales et de la charge parasitaire (Dalton *et al.*, 2003). Cette fluctuation peut être due à l'utilisation d'adjuvants différents comme le Quil A ou l'adjuvant complet de Freund.

Un vaccin efficace serait un vaccin dirigé contre les différentes espèces de strongles co-infestant les moutons soit en identifiant un antigène commun aux différentes espèces ou en développant un vaccin qui contiendrait différents antigènes spécifiques de chaque espèce.

Chez les strongles, des recherches sont en cours pour la production de vaccins efficaces contre les nématodes *H. contortus*, *T. circumcincta et T. colubriformis.*

*ii. La vaccination dirigée contre H. contortus.*

Lors d'une infestation par *H. contortus*, la réponse immunitaire observée est multifactorielle avec une production par les cellules immunitaires d'IgE, IgG1 et IgA (Kooyman *et al.*, 2000; Miller, 1978). L'efficacité de la réponse immune chez les ovins et caprins contre *H. contortus* est dépendante de l'âge. En effet, lors d'infestations les agneaux de moins de 6 mois favorisent une réponse de type Th2 (Schallig, 2000). De plus le système immunitaire du mouton est mature à la fin de sa première année de vie (Hein & Mackay, 1991; Watson & Gill, 1991). C'est pourquoi il est essentiel de vacciner les agneaux contre *H. contortus* avant l'âge de six mois (Bethony *et al.*, 2006).

Les premières générations de vaccins anti-nématodes testées ont été obtenues par atténuation des larves L3 après irradiation (Smith & Angus, 1980). Elles permettent de limiter l'installation des parasites et d'établir une immunité protectrice pour l'hôte. Pour *H. contortus*, une dose de $10^4$ larves L3 irradiées est nécessaire pour induire une immunité protectrice chez les moutons de plus de six mois. Le coût de production, de contrôle de qualité et la difficulté d'obtention d'un nombre suffisant de larves n'a pas permis la commercialisation de ce type de vaccin chez les strongles gastro-intestinaux des petits ruminants (Miller, 1978).

De nos jours, il existe deux classes principales de vaccins expérimentaux contre les nématodes gastro-intestinaux, fondées sur les antigènes dits cachés et les antigènes dits naturels (Newton & Meeusen, 2003).

♦ *Les antigènes cachés.*

Les antigènes cachés se trouvent au niveau de l'intestin des nématodes parasites et ne sont donc pas exposés au système immunitaire durant une infestation naturelle. Cependant, si ces nématodes sont hématophages, comme *H. contortus*, la surface intestinale du nématode peut être exposée aux immunoglobulines de l'hôte et donc potentiellement à des anticorps spécifiquement dirigés contre ses propres constituants (Knox *et al.*, 2003). De plus, les antigènes cachés permettent de ne pas avoir de pression de sélection pour l'évolution du parasite avec notamment des mécanismes d'évasion de la réponse immunitaire à ces antigènes. La plupart de ces antigènes ont été identifiés comme des enzymes impliqués dans la digestion du sang comme les aspartyl protéases (Trap & Boireau, 2000).

Chez *H. contortus*, l'antigène caché le plus étudié est une glycoprotéine de la membrane intestinale de 110 KDa (H11) correspondant à une aminopeptidase et exprimée uniquement au stade parasitaire (Smith *et al.*, 1993).

L'utilisation de la protéine native H11 dans des essais vaccins a permis de réduire de 90% la production d'œufs dans les matières fécales et une réduction de plus de 75% de la charge parasitaire. Le succès des premiers essais vaccinaux utilisant la protéine native H11 a été reporté dans la littérature en 1993 (Smith *et al.*, 1993). Ce vaccin n'a pas été commercialisé notamment à cause des problèmes d'obtention de la forme recombinante de l'antigène. En effet, un grand nombre de nématodes adultes est nécessaire pour obtenir au final une quantité minime d'antigène naturel. C'est pourquoi cette technique serait possible en obtenant les antigènes de manière artificielle c'est-à-dire en réalisant des protéines recombinantes or l'utilisation de protéine recombinantes ne fonctionne pas ce qui constitue la limite de cette approche (Murray *et al.*, 2007).

Le deuxième antigène caché largement étudié est H-gal-GP. Ce dernier dérive de la membrane intestinale du nématode *H. contortus* et induit un haut niveau de protection avec une réduction de production d'œufs de 80% et une diminution de la charge parasitaire supérieure à 60%.

Des produits d'excrétion/sécrétion ont été obtenus *in vitro* à partir d'adultes d'*Haemonchus contortus*. Ces produits contiennent de nombreuses protéases à cystéine avec la capacité de dégrader les protéines sanguines comme l'hémoglobine et l'albumine qui sont des composantes majeures du repas sanguin (Knox, 1993; Rhoads & Fetterer, 1995). La vaccination des moutons avec des protéases à cystéine permet une diminution de 77% d'excrétion des œufs dans les matières fécales et de 47% de la charge parasitaire (Knox & Smith, 2001). Les anticorps obtenus des moutons vaccinés avec des cystéines protéases natives a permis d'inhiber l'activité protéolytique des cystéines protéases *in vitro* (Knox & Smith, 2001).

♦ *Les antigènes naturels.*

Les antigènes naturels contrairement aux antigènes cachés sont reconnus durant l'infestation et sont généralement des produits d'excrétion/sécrétion ou des antigènes de surface. Ils ont donc l'avantage d'être potentiellement exposés au système immunitaire de l'hôte.

Des antigènes naturels issus des produits d'excrétion/sécrétion nommés ES15 et ES24 ont été identifiés chez le nématode *H. contortus*. Ces produits d'excrétion/sécrétion sont spécifiquement reconnus par le sérum de moutons immunisés contre *H. contortus* (Schallig *et al.*, 1994; Schallig *et al.*, 1995). L'immunisation des agneaux par ces antigènes a montré une réduction de l'excrétion fécale des œufs de 32 à 77%, ainsi qu'une diminution de 64 à 85% de la charge parasitaire (Schallig *et al.*, 1997). Des protéines recombinantes homologues des antigènes ES15 et ES24 ont été identifiées chez *T. colubriformis* et *Ancylostoma canis* (Schallig & Van Leeuwen, 1997). L'immunisation des agneaux par ces protéines n'a montré qu'une protection partielle (Vervelde *et al.*, 2002).

Un antigène de surface spécifique du stade L3 (Hc-sL3) a été identifié et correspond à une protéine de 70-83KDa (Bowles *et al.*, 1995; Raleigh *et al.*, 1996). La vaccination avec cet antigène natif a montré une réduction de l'excrétion fécale des œufs de 64-69% et une réduction de la charge parasitaire de 45-55%.

♦ *Le mucus.*

*H.contortus* est un nématode qui se localise au niveau de la surface abomasale du mouton et se trouve donc au contact du mucus de l'hôte.

Dans ce contexte, les échantillons de mucus provenant de moutons infestés possèdent des concentrations élevées d'anticorps spécifiques aux parasites (Harrison *et al.*, 1998).

Cependant, les anticorps présents dans le sérum semblent également jouer un rôle dans l'immunité des nématodes gastro-intestinaux. De plus, il a été décrit que la population d'anticorps dans le mucus peut différer par rapport à la population présente au niveau du sérum (Balic *et al.*, 2003; Bowles *et al.*, 1995).

*iii. Les limites de la vaccination.*

Malgré les différentes réductions d'excrétion fécale et de charge parasitaire observées dans les paragraphes précédents, aucun vaccin n'est commercialisable à l'heure actuelle.

Le principal obstacle à l'obtention de vaccins est la reproduction de ces effets naturels avec des antigènes issus de productions de protéines recombinantes. Ces échecs peuvent être dus par exemple à des glycosylations inappropriées ou encore à des différences de modifications post-traductionnelles liés au système de production.

Une autre difficulté peut être due à la capacité de l'antigène étudié à conférer une protection croisée contre les trois principales espèces de strongles digestifs. En effet, en condition d'élevage, l'infestation est multi-spécifique. Dans ce contexte, la protection contre une seule espèce ne peut donc suffir pour une gestion durable de la population parasitaire.

De ce fait, plus les connaissances du dialogue moléculaire au niveau de la réponse hôte/parasite sera élevée, meilleure seront les possibilités d'identifier de nouveaux vaccins potentiels.

## 6. Objectifs de la thèse.

L'analyse de l'expression différentielle entre le stade pré-parasitaire et le stade précoce parasitaire (5dpi) d'*H. contortus* permet de mettre en évidence les gènes potentiellement impliqués dans le parasitisme ainsi que dans les étapes décisives du développement du parasite.

Notre objectif a donc été de rechercher et de caractériser des gènes dont les transcrits chez le nématode *H. contortus* étaient spécifiquement exprimés ou sur-exprimés au stade parasitaire. Pour cela, nous avons développé une approche basée sur la technique de SSH en couplant 2 enzymes de restrictions différentes et une amplification des transcrits avec les séquences SL1 ou SL2, séquences présentes sur la majorité des transcrits. Cette approche novatrice de la technique permet une validation croisée des résultats obtenus et de ce fait d'accélerer la validation des résultats. Les candidats obtenus seront ensuite été criblés par Dot-blot et validés par RT-PCR.

Pour certains candidats une étude beaucoup plus approfondie sera réalisée. La recherche de leurs éventuels homologues chez les deux autres espèces de strongles gastro-intestinaux nous permettra d'évaluer leur degré de conservation. L'étude de leur éventuel pouvoir immunogène sera également étudiée.

### a. Stratégie générale de la techniqe SSH.

Les facteurs de virulence, impliqués dans l'installation des nématodes ainsi que dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte, constituent des cibles privilégiées pour la mise au point de nouvelles méthodes de lutte.

Une des stratégies de lutte envisagée repose sur le blocage des nématodes lors de la phase parasitaire que ce soit précoce (dans les phases de pénétration et d'installation) ou dans les phases plus tardives (au cours du maintien au sein de son hôte). Même si les gènes impliqués dans ces processus sont mal connus, ils constituent des cibles de choix pour le développement de méthodes de lutte alternatives (thérapeutiques ou vaccinales). Ainsi, nous avons cherché à mettre en évidence les gènes spécifiquement exprimés au stade parasitaire. Plus précisément, dans la cadre de mon travail ce sont les ARNm spécifiques du stade L4 (5 jours après infestation) qui seront sélectionnés en comparaison avec le stade libre (L3). Ces derniers correspondent aux gènes dont la transcription est stimulée lors du passage de la phase pré-parasitaire à la phase parasitaire. Pour y parvenir, nous avons mis en place la technique d'hybridation soustractive et suppressive (SSH).

En effet, la technique SSH est une technique d'analyse du transcriptome qui permet de comparer deux populations d'ARNm. C'est une technique basée sur la soustraction de fragments d'ADNc communs à deux échantillons (population testée « tester » et population contrôle « driver ») suivi d'une amplification exponentielle de fragments d'ADNc spécifiquement présents dans l'un des échantillons. Cette technique décrite par Diatchenko *et al* (1996), a été employée avec succès pour identifier des gènes différentiellement exprimés à un stade donné au sein de différentes espèces de nématodes (Datu *et al.*, 2008; Diatchenko *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1999; Dubreuil *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Mak *et al.*, 2001; Nisbet *et al.*, 2007)

### b. Choix du stade.

Afin d'identifier des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène du nématode, nous avons décidé de travailler avec des larves L4 obtenues 5 jours après infestation en comparaison avec le stade libre L3. Ces larves L4 récoltées 5 jours après infestations sont les premières auxquelles nous pouvons avoir accès *in vivo*. Elles constituent donc la phase précoce de

l'invasion parasitaire. En effet, à ce stade les larves ont pénétré la muqueuse intestinale et sont en cours de migration. Elles ont donc déployé un arsenal de gènes leur permettant de réaliser ces étapes parasitaires précoces et possèdent déjà les ARN messagers correspondant à des gènes potentiellement impliqués dans le pouvoir pathogène.

Nous avons cherché à mettre en évidence les gènes spécifiquement exprimés à ce stade en comparant le transcriptome des larves L4 avec celui des larves L3 qui n'ont pas été en contact avec l'hôte et qui n'ont donc potentiellement pas encore exprimé les gènes impliqués dans leur installation.

# Deuxième partie

# Résultats

# II Résultats.

## 1. Obtention des banques d’ADNc par la technique de SSH.

Après rétro transcription des ARNm en ADNc, les ADNc des deux populations (L4 5dpi et L3) ont été digérés par une enzyme de restriction puis ligués à deux types d’adaptateurs différents. Les ADNc des deux populations sont ensuite dénaturés et mélangés afin que les séquences communes aux deux échantillons s’hybrident. Une fois les séquences double brin éliminées, les ADNc demeurant non hybridés correspondent aux gènes qui sont exprimés soit en plus grande quantité, soit spécifiquement dans la population d’ARNm testée. Ces gènes ont alors été sélectionnés par PCR grâce à un jeu d’amorces spécifiques car seuls les fragments ayant les deux types d’adaptateurs pourront être amplifiés par PCR de manière exponentielle (**cf figure n°7**).

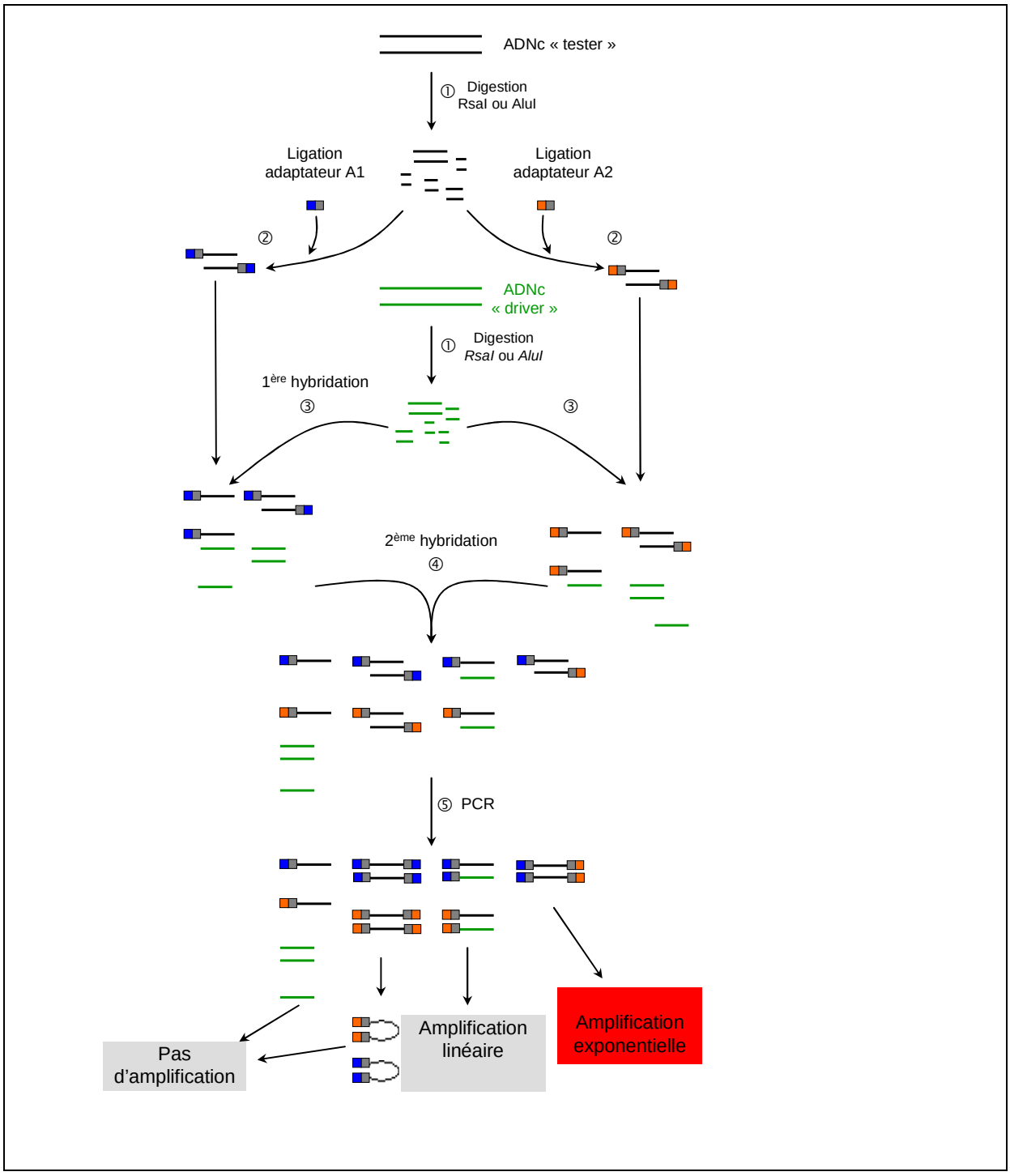



**Figure n°7 : Représentation schématique de la technique SSH.**

*Représentation de toutes les étapes nécessaires à la réalisation de la technique SSH 1 : digestion des ADNc double brin par l'enzyme de restriction RsaI ou AluI, 2 : ligation des adaptateurs, 3 : 1ère hybridation avec dénaturation au préalable, 4 : 2ème hybridation sans dénaturation, 5 : amplification par PCR.*

Nous avons réalisé la technique de SSH avec deux enzymes de restriction différentes que sont *RsaI* et *AluI*. Ce sont deux enzymes qui ont une fréquence de coupure toutes les 256

paires de base. Lors de la synthèse de premier brin, nous avons inclus à l'oligodT la présence de ces deux enzymes de restriction (**cf annexe n°2**). De ce fait, la présence d'un seul des sites dans l'ADNc permet à générer le fragment par la présence du 2ème site au niveau de l'oligodT et permet d'optimiser la représentation des transcrits. Dans un premier temps, l'utilisation de ces deux enzymes a permis de valider certains de nos candidats en validation croisée (obtenues dans les différentes banques) ou dans un second temps d'identifier d'autres candidats possédant spécifiquement soit le site *RsaI* ou le site *AluI* (présent dans une seule des banques). La représentation de la validation croisée est représentée sur la **figure n°8.**

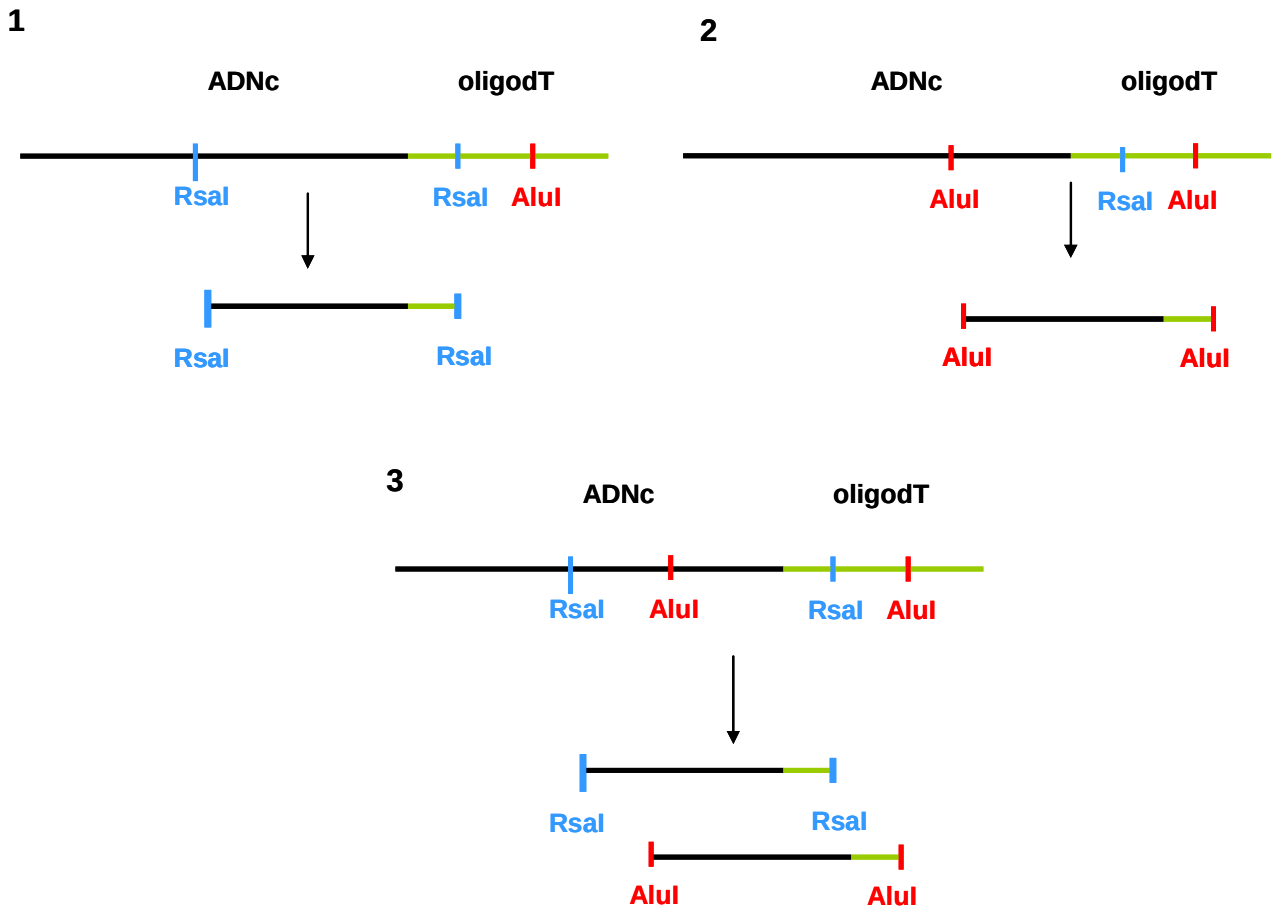



**Figure n°8 : Représentation schématique de l'optimisation de la couverture du transcriptome.**

*1 : ADNc double brin ne possède qu'un seul site RsaI, 2 : ADNc double brin ne possède qu'un seul site AluI, 3 : ADNc double brin possède le site RsaI et AluI ce qui permet la réalisation d'une validation croisée.*

L'utilisation de la technique SSH requiert une quantité suffisante de matériel biologique. Dans ce contexte, la pré-amplification des ARN messagers a été réalisée par PCR avec la séquence leader SL1 ou la séquence leader SL2 en utilisant également une amorce spécifique de

l'oligodT nommée OUT (**cf annexe n°1**). L'utilisation de ces deux séquences leaders a permis de couvrir une plus grande partie du transcriptome. En effet, SL1 et SL2 sont des séquences d'épissage alternatif que l'on retrouve sur la majorité des transcrits de nématode (Guiliano & Blaxter, 2006).

## 2. Résultats obtenus par la technique SSH.

### a. Obtention des banques soustraites.

Les différents profils obtenus au cours de la réalisation de la technique SSH sont présentés sur la **figure n°9**.

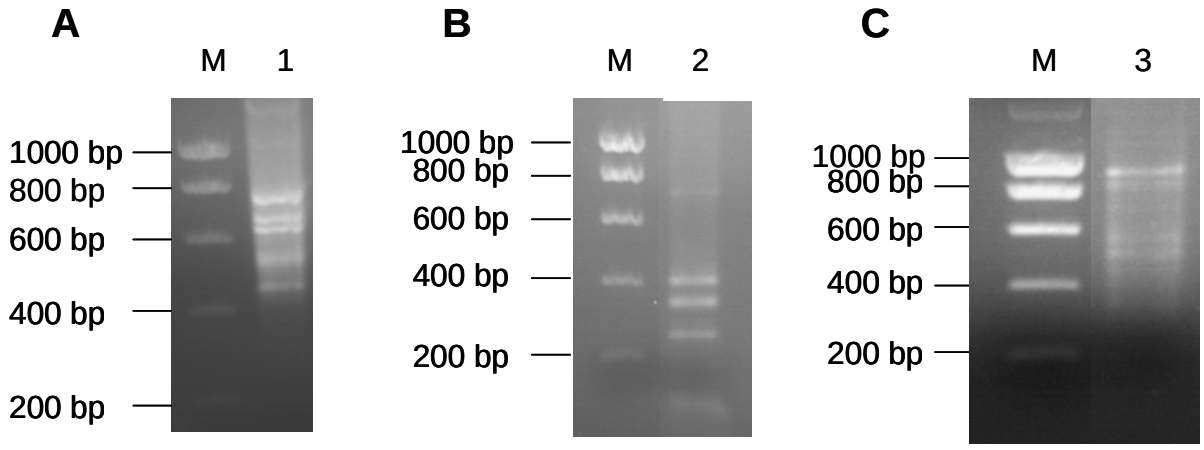



**Figure n°9 : profils de migration des différentes étapes de la technique SSH.**

*A : profil de migration obtenu par PCR SL1/OUT sur les ADNc du stade L4 (5 jours après infestation). B : Digestion de l'amplification SL1/OUT par l'enzyme de restriction RsaI. C : témoin de ligation des adaptateurs.*

Les produits obtenus ont été amplifiés par un jeu d'amorces spécifiques à chaque adaptateur afin d'obtenir les quatre banques soustraites que l'on peut visualiser sur la **figure n°10**.

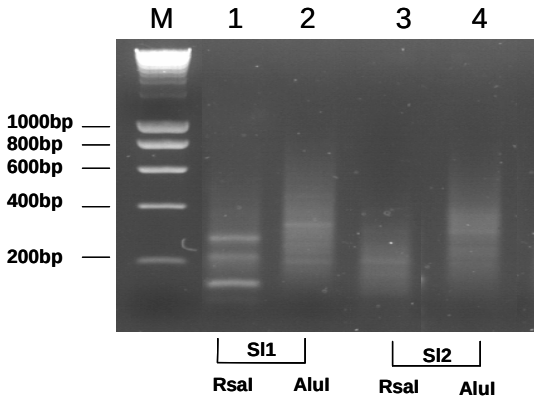



**Figure n°10 : Visualisation des 4 banques soustraites obtenues par la technique de SSH.**

*Pistes 1 et 2 : ADNc obtenu après hybridation suppressive soustractive amplifié préalablement par SL1 puis digéré soit par RsaI ou AluI.*

*Pistes 3 et 4 : ADNc obtenu après hybridation suppressive soustractive amplifié préalablement par SL2 puis digéré soit par RsaI ou AluI*

### b. Clonage et séquençage des fragments de la banque soustraite enrichie au stade L4.

Les produits PCR ont ensuite été clonés dans le vecteur pGEM-T et soumis à l'analyse par dot-blot afin de sélectionner les clones correspondant aux gènes différentiellement exprimés au stade parasitaire par rapport au stade pré-parasitaire.

Les sondes utilisées pour le criblage par dot-blot correspondent soit aux d'ADNc issue de la soustraction des ADNc du stade L4 (5 jours après infestation) par ceux du stade L3 (soustraction L4/L3) soit aux ADNc du stade L3 (ADNc non soustrait).

Pour chaque banque, 100 clones ont été sélectionnés aléatoirement. Sur ces 400 clones, 180 ont présenté un signal d'hybridation plus intense avec la sonde issue de la banque d'ADNc enrichie au stade L4 (5 jours après infestation) qu'avec la sonde correspondant aux ADNc du stade L3 non soustraits. La visualisation de ces clones est représentée sur la **figure n°11**.

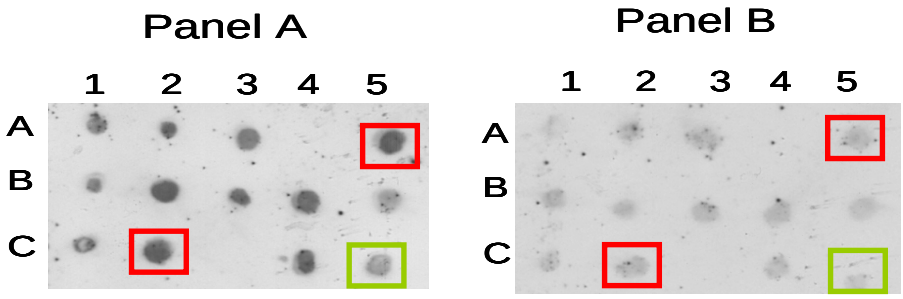



**Figure n°11 : Résultat du criblage par dot-blot.**

*Panel A : Dot-blot de la banque d'ADNc enrichie au stade L4 (5dpi) par rapport au stade L3 marqués avec une sonde correspondant aux ADNc de la banque enrichie au stade L4(5dpi)*

*Panel B : Dot-blot de la banque d'ADNc enrichie au stade L4(5dpi) par rapport au stade L3 marqués avec une sonde correspondant aux ADNc du stade L3*

*Les sondes sont marquées à la digoxygénine. Les carrés rouges représentent les clones sur-exprimés au stade L4 (5dpi) par rapport au stade libre L3. Le carré vert représente le gène de ménage GAPDH.*

Ces 180 clones ont été séquencés. La comparaison de ces séquences avec celles répertoriées dans les banques de données a révélé une importante redondance dans les fragments obtenus. En effet, 40% des clones analysés (72) correspondent à des ADNc codant pour des protéines ribosomales pour lesquelles les expériences de RT-PCR n'ont pas mis en évidence de différence d'expression entre le stade parasitaire et le stade pré parasitaire. Ces candidats ainsi que de nombreux autres clones n'ont également pas été validés par RT-PCR et de ce fait correspondent à des faux positifs.

Parmi les autres clones, l'assemblage des séquences a permis d'identifier 10 contigs d'ADNc distincts. Ces contigs ont été obtenus grâce au logiciel d'assemblage de séquence CAP (Huang & Madan, 1999). Les résultats de cette analyse sont présentés dans le **tableau n°4**. La nomenclature pour identifier les différents contigs correspond au code des initiales du nématode (Hco : *H. contortus*) suivi du stade de la larve puis du numéro chronologique de sa découverte.

| Nom | Contig | Fragment SSH | banques | | | | Nombre total de clones |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Sl1 *RsaI* | Sl1 *AluI* | Sl2 *RsaI* | Sl2 *AluI* | |
| Hco-L4-1 | contig | 308 | 13 | 1 | - | - | 14 |
| Hco-L4-2 | Contig | 218 | 4 | - | - | 1 | 5 |
| Hco-L4-3 | Contig | 192 | - | 1 | - | 1 | 2 |
| Hco-L4-4 | Contig | 414 | 1 | 1 | - | - | 2 |
| Hco-L4-5 | Contig | 198 | 3 | - | - | - | 3 |
| Hco-L4-6 | Contig | 284 | - | 9 | - | - | 9 |
| Hco-L4-7 | Contig | 325 | - | 2 | 2 | - | 4 |
| Hco-L4-8 | Contig | 434 | 1 | 8 | 1 | 2 | 2 |
| Hco-L4-9 | Contig | 223 | - | 4 | - | - | *4* |
| Hco-L4-10 | Contig | 227 | 3 | - | 3 | - | 6 |

**Tableau n°4 : Résumé des candidats obtenus par les 4 banques soustraites.**

Nous avons obtenu 25 fragments d'intérêts avec la banque SSH pré amplifiée SL1 et digérée *RsaI*, 22 fragments avec la banque pré amplifiée SL1 et digérée par *AluI*, 5 fragments avec la banque pré amplifiée SL2 et digérée *RsaI* et enfin 4 fragments avec la banque SL2 et digérée *AluI*. Certains candidats comme Hco-L4-8 sont retrouvés au niveau des quatre banques soustraites. Par contre, d'autres candidats ne sont présents que dans les banques digérées par l'enzyme de restriction *RsaI,* comme Hco-L4-10, ou par *AluI* pour Hco-L4-3. D'autres candidats, comme Hco-L4-4 ne sont retrouvés que dans les banques préamplifiées avec SL1. Les autres candidats sont quant à eux retrouvés aléatoirement dans l'une ou l'autre des banques. Ceci montre l'intérêt de l'utilisation d'une deuxième enzyme de restriction ainsi que de la pré-amplification du pool d'ARNm par la séquence leader SL1 ou SL2 pour optimiser l'identification de nouveaux fragments de transcrits.

## 3. Analyse des fragments obtenus par la technique SSH.

### a. Analyse des banques d'ESTs.

Les séquences des 10 contigs obtenues par la technique SSH ont été comparées aux banques d'ESTs en utilisant le logiciels BlastN (Altschul *et al.*, 1990). Les résultats de cette analyse sont représentés dans le **tableau n°5.**

| Nom | Contig | Fragment SSH (pb) | Blast n | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Meilleur Homologue | e-value |
| Hco-L4-1 | contig | 308 | Hc_d11_39B10_SKPL *H. contortus* | 0 |
| Hco-L4-2 | Contig | 218 | Hc_ad_19G09_SKPL *H. contortus* | 0 |
| Hco-L4-3 | Contig | 192 | Hc_ad_33B02_SKPL *H. contortus* | 0 |
| Hco-L4-4 | Contig | 414 | AM744611 *T. circumcincta* | 9e-114 |
| Hco-L4-5 | Contig | 198 | BJ801684 *C. elegans* | 0.003 |
| Hco-L4-6 | Contig | 284 | Hc_d11_48F04_SKPL *H. contortus* | 0 |
| Hco-L4-7 | Contig | 325 | Px64g09.y1 *H. contortus* | 1e-71 |
| Hco-L4-8 | Contig | 434 | HC_d11_53E12_SKPL *H. contortus* | 1e-108 |
| Hco-L4-9 | Contig | 223 | Hc_d11_39F07_SKPL *H. contortus* | 0 |
| Hco-L4-10 | Contig | 227 | Hc_gut_09H08_SKPL *H.contortus* | 0 |

**Tableau n°5 : Résumé de l'analyse des banques ESTs par les candidats obtenus par la technique SSH.**

Cette recherche d'homologies dans les banques d'ESTs nous a permis de montrer une similarité avec des gènes de nématode pour chaque candidat. Ce résultat nous assure a priori l'absence de transcrits de l'hôte. En effet, notre étude porte sur des larves isolées au niveau de la muqueuse digestive et ayant commencées à s'alimenter, il existe donc un risque de contamination par des ARNm de l'hôte.

### b. Cinétique d'expression des gènes candidats au cours des stades libres et parasitaires.

Des expériences de RT-PCR ont été réalisées afin de vérifier l'expression spécifique ou la sur expression des gènes candidats au stade parasitaire (L4 5dpi) par rapport au stade préparasitaire (L3). Pour cela, des amorces ont été définies à partir des séquences de chaque contig (**cf annexe n°3**). Les RT-PCR ont été réalisées sur le stade libre L3 et le stade parasitaire 5 jours après infestation (L4 5dpi).

Toutes les amplifications ont été effectuées avec de l'ADNc simple brin synthétisé à partir d'ARNm issus d'extractions indépendantes de celles réalisées pour les expérimentations de SSH. La cinétique d'expression des 10 gènes est représentée **figure n°12**. Les séquences des amorces utilisées lors de la validation par RT-PCR sont reportées en **annexe n°3**.

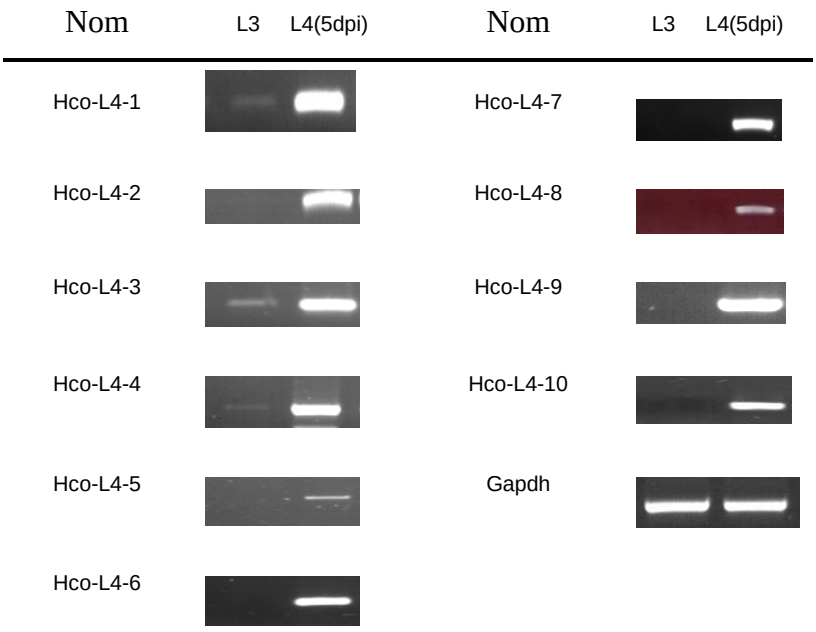



**Figure n°12 : Validation des candidats par RT-PCR obtenus par la technique SSH.**

*Cinétiques d'expression des gènes Hco-L4-1, Hco-L4-2, Hco-L4-3, Hco-L4-4, Hco-L4-5, Hco-L4-6, Hco-L4-7, Hco-L4-8, Hco-L4-9 et Hco-L4-10.obtenues par RT-PCR semi quantitative. Les différents stades étudiés sont le stade libre (L3) et le stade parasitaire L4 (5 jours après infestation).*

L'analyse de la cinétique d'expression des gènes candidats permet de mettre en évidence des profils d'expression révélant des différences quantitatives et qualitatives. Pour Hco-L4-1, Hco-L4-3 et Hco-L4-4 on observe une sur-expression à partir du stade L4 (5 jours après infestation) avec une expression faible au niveau du stade L3, ce profil correspondant à une différence d'expression quantitative. Le deuxième profil est une expression qualitative et concerne tous les autres candidats. En effet, nous avons observé une expression spécifique des

candidats à partir du stade parasitaire L4 (5dpi) et l'absence d'un produit d'amplification chez le stade libre L3.

Le témoin utilisé correspond au gène de ménage GAPDH dont l'expression est identique au cours des stades libres et parasitaires.

Ce résultat nous permet de montrer que la technique SSH peut mettre en évidence des différences transcriptomiques qualitatives mais aussi quantitatives.

## 4. Obtention des ADNc complets.

Les techniques 5' et 3' RACE PCR ont permis d'obtenir les ADNc complets pour tous les candidats à l'exception de Hco-L4-7 et Hco-L4-8 pour lesquels les séquences d'ADNc complet sont déjà disponibles sous les numéros d'accession respectif AM040235 et AM040236.

### a. Analyse des banques protéiques

Les séquences pleines longueurs obtenues ont été comparées aux banques de données protéiques en utilisant le programme BlastX (Altschul *et al.*, 1990). L'obtention de la partie 5' de l'ADNc a également permis de prédire la présence (ou non) d'un peptide signal de sécrétion par l'utilisation du programme signalP (Nielsen *et al.*, 1997). Ces données sont présentées dans le **tableau n°6** :

| Nom | Numéro d'accession | Contig | TDF/ADNc pleine longueur (pb) | Homologue | Blast x | | Peptide signal |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Espèces | e-value | |
| Hco-L4-1 Hco-FAR-1 | | contig | 308/739 | Putative ES protein F7 Fatty acid and retinol binding (FAR 1) | *O.ostertagi* | 1e-77 | Oui |
| Hco-L4-2 Hco-TTL-1 | HM003621 | Contig | 218/505 | Precursor transthyretin like protein 1(TTL) | *O.ostertagi* | 3e-58 | Oui |
| Hco-L4-3 Hco-SLP-1 | HM003623 | Contig | 192/409 | SaPosin like protein 1 | *A.caninum* | 6e-05 | Oui |
| Hco-L4-4 Hco-LON-1 | HM003624 | Singleton | 414/1163 | LONg family member (lon-1) | *C.elegans* | 6e-100 | Oui |
| Hco-L4-5 Hco-LIP-1 | HM003626 | Contig | 198/1041 | Hypothetical protein CBG09691 | *C.briggsae* | 8e-77 | Oui |
| Hco-L4-6 Hco-PSSP-1 | HM003628 | Contig | 284/783 | Hypothetical protein *Angiostrongylus cantonensis* | *A.cantonensis* | 1e-32 | Oui |
| Hco-L4-7 Hco-NIM-1 | AM040235 | Contig | 325 | Nim1-protein | *H.contortus* | 9e-06 | Oui |
| Hco-L4-8 Hco-NIM-2 | AM040236 | Contig | 434 | Nim-2 protein | *H.contortus* | 4e-32 | Oui |
| Hco-L4-9 Hco-COL-166 | HM003630 | Contig | 223/1064 | Collagen family member (col-166) | *C.elegans* | 2e-36 | Non |
| Hco-L4-10 Hco-PSSP-2 | HM003631 | Contig | 227/492 | Hypothetical protein R02C2.7 | *C.elegans* | 3e-09 | Non |

**Tableau n°6 : Résumé des candidats validés par RT-PCR analysés par les banques protéiques et détermination des ADNc complets.**

Parmi les candidats obtenus, 8 possèdent un peptide signal de sécrétion et semblent donc intéressants du fait de leur interaction potentielle avec l'hôte et en particulier avec son système immunitaire.

Parmi ces séquences, 6 candidats présentent une homologie avec des protéines ayant une fonction connue. Le fragment Hco-L4-1 présente une homologie avec la protéine FAR1 pour « Fatty Acid and Retinol binding protein » d'*O. ostertagi* mais également avec une protéine FAR recemment identifiée chez *H. contortus*. D'autres candidats tels que Hco-L4-3 et Hco-L4-5 présentent de fortes homologies avec des protéines codant pour une « saposin-like protein » d'*A. caninum* et une protéine possédant un domaine « Lipase-3 » respectivement.

Le candidat Hco-L4-2 présente une forte homologie pour une « transthyretin like-1 » d'*O. ostertagi*.

Le candidat Hco-L4-4 possède une homologie avec la protéine LON-1 du nématode libre *C. elegans* et Hco-L4-9 présente une homologie avec la protéine col-166 de *C. elegans*.

Les 4 autres séquences, Hco-L4-6, Hco-L4-7, Hco-L4-8 et Hco-L4-10 présentent des homologies avec des protéines hypothétiques d'*A. cantonensis*, *H. contortus*, *C. elegans* et *C. briggsae* respectivement.

### b. Cinétique d'expression des gènes candidats au cours des stades du cycle parasitaire.

L'étude de l'expression  au cours du développement d'*H. contortus* a été réalisée pour l'ensemble des gènes candidats par RT-PCR en utilisant les mêmes amorces internes qu'utilisées précédemment **(cf annexe n°3)**. Des ADNc issus du stade œufs, stade libre L3, L3 dégainé (xL3), L4 5jours après infestation (L4 5dpi), adulte immature 10 jours après infestation mâle et femelle (IA 10dpi ♂ et ♀) et enfin les stades adultes mâles et femelles (♂ et ♀) ont été utilisés. Le gène de ménage GAPDH est utilisé comme référent. Les résultats des RT-PCR sont représentés sur la **figure n°13**.

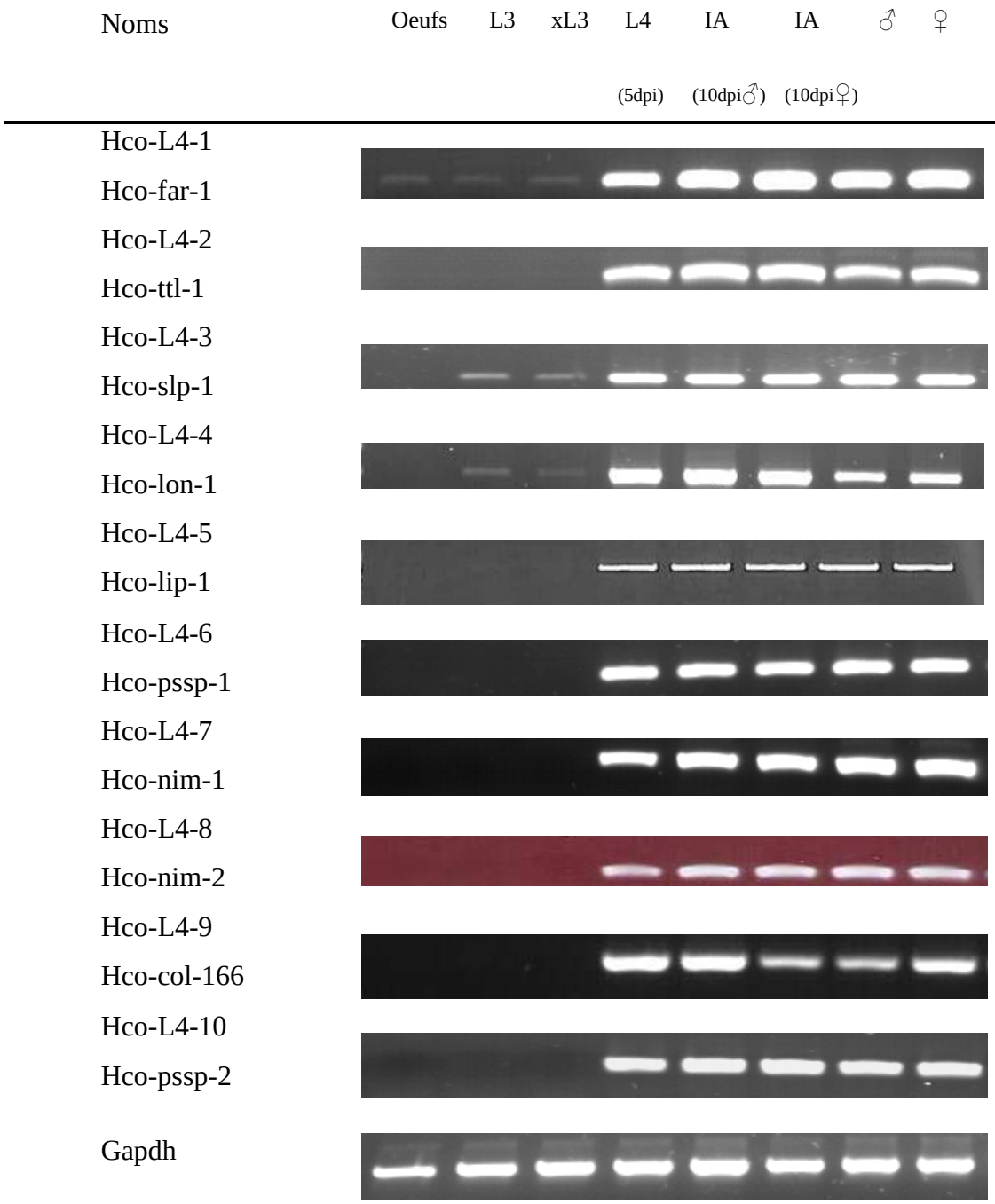



**Figure n°13 : Cinétique d'expression des gènes candidats sur tous les stades d'un cycle parasitaire.**

*Cinétiques d'expression des gènes Hco-L4-1, Hco-L4-2, Hco-L4-3, Hco-L4-4, Hco-L4-5, Hco-L4-6, Hco-L4-7, Hco-L4-8, Hco-L4-9 et Hco-L4-10.obtenues par RT-PCR semi quantitative. Les différents stades étudiés sont les stades libres (œufs, L3 et xL3) et les stades parasitaires L4 (5 et 10 jours après infestation males et femelles) et les stades adultes males et femelles.*

Pour *Hco-ttl-1*, *Hco-lip-1*, *Hco-pssp-1*, *Hco-nim-1*, *Hco-nim-2*, *Hco-col-166 et Hco-pssp-2* les transcrits sont détectés à partir du stade parasitaire L4 5 jours après infestation alors qu'aucune amplification n'est observée dans les stades œufs, L3 et xL3. Par contre, le transcrit

d'*Hco-far-1* est observé dans tous les stades de développement avec une quantité de transcrit plus importante au niveau des stades parasitaires. Pour les transcrits *Hco-lon-1* et *Hco-slp-1* on observe également leur présence à tous les stades de développement avec une abondance de transcrits plus importante aux stades parasitaires mais une absence de transcrits au stade œufs.

L'utilisation du stade xL3 nous permet de mimer de manière artificielle le premier stade de pénétration avec l'obtention de la larve dégainée. De ce fait, lors de la validation de l'expression différentielle des gènes obtenus par la technique SSH, l'expression au cours de ce stade a été confirmée pour *Hco-far-1*, *Hco-slp-1* et *Hco-lon-1*.

## 5. Caractérisation des candidats.

### a. Caractérisation d'Hco-FAR-1.

L'ADNc complet d'*Hco-far-1* comprend 746 paires de bases, code pour une protéine de 180 aa avec une masse moléculaire de 19.83 KDa et un point isoélectrique théorique de 8.8. La séquence en acides aminés a été analysée à l'aide du programme de recherche de peptide signal (SignalP) qui indique la présence d'un peptide signal de sécrétion avec un site de clivage situé entre les aa 17 et 18 (ALA-AP). La recherche de domaines conservés par le programme SMART montre la présence d'un domaine Gp-FAR-1 (pfam: PF05823). La recherche d'homologies dans les banques de données à l'aide du programme BLASTX montre que Hco-FAR-1 présente une forte homologie avec des « Fatty Acid and Retinol binding proteins » (FAR) d'autres nématodes. *Hco-far-1* présente une haute similarité avec la putative ES protein F7 d'*Ostertagia ostertagi* (CAD20464.1, E value : $1^{e}$-77, 95% d'identité) et la protéine FAR 1 d'*H. contortus* (ACR48265.1, E value : $5^{e}$-58, 100% d'identité). Les alignements de ces séquences avec la séquence obtenue chez *H. contortus* est représentée sur la **figure n°14.**

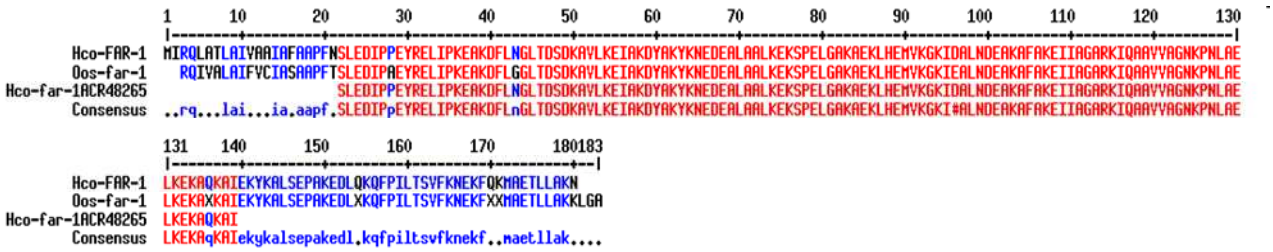



**Figure n°14 : Alignement d'Hco-FAR-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank.**

*Alignement d'Hco-FAR-1 avec ses homologues Ostertagia ostertagi : Oos-FAR-1 (CAD20464.1) et la séquence partielle d'Haemonchus contortus : Hc-FAR-1 (ACR48265.1).*

L'analyse des banques d'EST a permis de mettre en évidence des homologues d'*Hco-far-1* chez d'autres espèces de strongles notamment avec les nématodes *Ancylostama ceylanicum* ou encore *Nipostrongylus brasiliensis.*

## b. Caractérisation d'Hco-TTL-1.

L'ADNc complet codant d'*Hco-ttl-1* possède 505 paires de bases, codant pour une protéine de 137 aa et avec un point isoélectrique théorique de 6.36. Hco-TTL-1 possède un peptide signal avec un site de clivage entre les aa 15 et 16 (CLA-IG).

L'analyse de la séquence protéique révèle la présence d'un domaine transthyretin like (pfam DUF290, E value: 8.20e-62) partagé par les membres de la famille protéique des nématodes tranthyretin like (TTL).

Au sein des banques de données protéiques, de fortes similarités ont été trouvées avec la protéine TTL-1 d'*O. ostertagi* (CAP45649, E value 3e-58, 81% d'identité) et de la protéine TTR-51 de *C. briggsae* (XP_002634232, E value 2e-50, 71% d'identité). De plus, une recherche dans les banques d'EST a révélé que plusieurs séquences codent pour des séquences complètes de protéine TTL d' *H. contortus, T. circumcincta* et *O. ostertagi*. L'alignement d'Hco-TTL-1 avec d'autres séquences de TTL d'*H. contortus, O. ostertagi* et *C. briggsae* a révélé un haut degré de conservation avec un pourcentage de similarité compris entre 78 et 89% représenté sur la **figure n°15.** L'analyse des banques d'EST a permis de mettre en évidence des homologues d'*Hco-ttl-1* chez le nématode libre *C. elegans.*

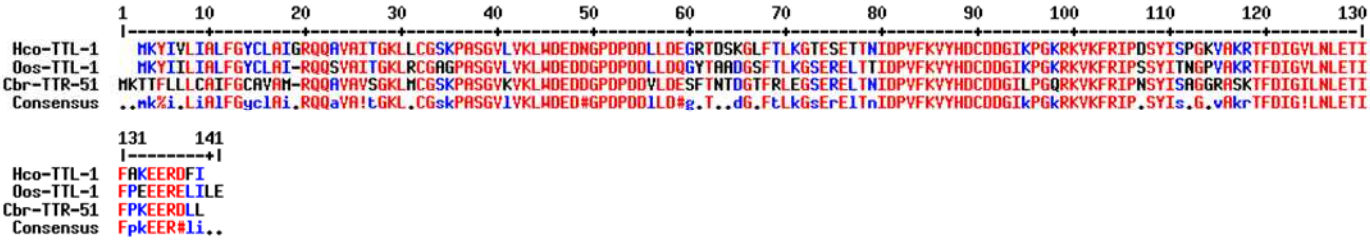



**Figure n°15 : Alignement d'Hco-TTL-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank.**

*Alignement d'Hco-TTL-1(HM003621) avec ses homologues Ostertagia ostertagi : Oos-TTL-1 (CAP45649.1) et Caenorhabditis briggsae : Cbr-TTR-51 (XP_002634232.1).*

## c. Caractérisation d' Hco-SLP-1.

L'ADNc complet d'*Hco-slp-1* possède 409 paires de bases et code pour une protéine de 105 aa avec une masse moléculaire de 11.79 KDa et un point isolélectrique de 5.31. La protéine possède un peptide signal de sécrétion avec un site de clivage situé entre les aa 17 and 18

(AYT-EP). L'analyse de la séquence protéique d'Hco-SLP-1 a permis de mettre en évidence la présence d'un domaine saposine B (smart SM00741, E value: 6.35e-07) propre à la famille des protéines saposin like (SAPLIPs). La recherche dans les banques de données protéiques a permis d'identifier une protéine de nématodes « saposin like » possédant un taux de similarité réduit. Cette protéine est la protéine SLP 1 d'*Ancylostoma caninum* (ABH88210, E value: 6e-05, 36% d'identité). La recherche dans les banques d'EST a permis de mettre en évidence une EST codant pour une saposin like protein complète chez le nématode *A. caninum* (ABH88210.1).

L'alignement de la séquence protéique d'*A. caninum* et la protéine Hco-SLP-1 démontre une faible conservation entre les séquences mis à part la présence de six cystéines caractéristique des protéines possédant un domaine saposine comme démontré sur la **figure n°16**.

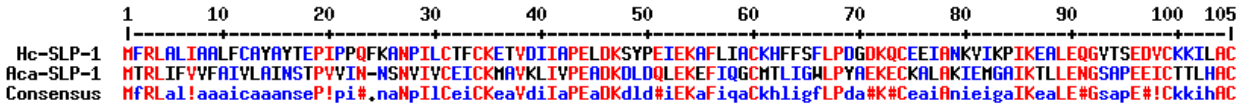



**Figure n°16 : Alignement d'Hco-SLP-1 avec son plus proche homologue identifié dans GenBank.**

*Alignement d'Hco-SLP-1(HM003623) avec son homologue Ancylostoma caninum : Aca-SLP-1 (ABH88210).*

## d. Caractérisation d'Hco-LON-1.

L'ADNc pleine longueur d'*Hco-lon-1* possède 1163 paires de base, code pour une protéine de 297 aa et possède un peptide signal de sécrétion avec un site de clivage compris entre les aa 14 et 15 (IVA-FS). Cette protéine contient un motif Sperm Coating Protein /Tpx-1/Ag5/Pr-1/Sc7 (SCP) (smart SM00198) qui est retrouvé dans les superfamilles CRISP qui sont des protéines sécrétées et riche en cystéines (Kratzschmar *et al.*, 1996). Parmi cette grande famille de protéine, *Hco-lon-1* a démontré une forte similarité avec la protéine LON-1 de *C. elegans* (NP_498166.1, E value: 6e-100 68% d'identité) et la protéine LON-1 de *C. brigssae* (XP_002641281.1, E value: 2e-97, 67% d'identité). Un alignement de ces séquences a été réalisé avec la séquence homologue de Ce-LON-1. Cet alignement nous permet de constater une forte conservation des aa entre les positions 82 et 226 avec un pourcentage d'identité compris entre 70 et 88%. En revanche, les parties N et C terminales sont beaucoup moins conservées entre les différentes espèces (**cf figure n°17).** L'analyse des banques d'EST a

permis de mettre en évidence des homologues d'*Hco-lon-1* chez les strongles *T. circumcincta* et *O. ostertagi.*

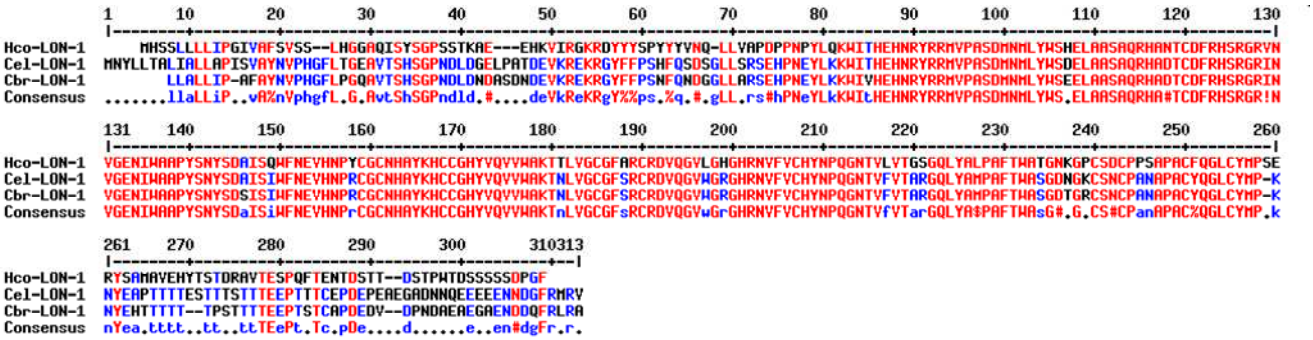



**Figure n°17 : Alignement d'Hco-LON-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank.**

*Alignement d'Hco-LON-1(HM003624) avec ses homologues Caenorhabitis elegans : Cel-LON-1 (NP_498166.1) et Caenorhabditis briggsae : Cbr-LON-1 (XP_002641281.1).*

## e. Caractérisation d'Hco-LIP-1.

L'ADNc complet d'*Hco-lip-1* possède 1041 paires de base, code pour une protéine de 301 aa avec une masse moléculaire de 33.68 KDa et un point isoélectrique de 7.22. La protéine possède un peptide signal de sécrétion avec un site de clivage situé entre les aa 16 and 17 (TTS-SP). L'analyse de la séquence protéique d'Hco-LIP-1 montre la présence d'un domaine Lipase-3 (pfam PF01764, E value: 7.30e-48). Les plus importantes similarités avec cette séquence ont été trouvées avec la protéine hypothétique de *C .brigssae* CBG09691 (XP_002637173, E value: 8e-77, 54% d'identité) et la protéine hypothétique de *C. elegans* F28H7.3 (NP_505743, E value: 9e-76, 53% d'identité) qui possèdent également un domaine Lipase-3. L'alignement de ces séquences est représenté sur la **figure n°18**. L'analyse des banques d'EST n'a mis en évidence la présence d'homologue d'*Hco-lip-1* que chez *C. elegans*.

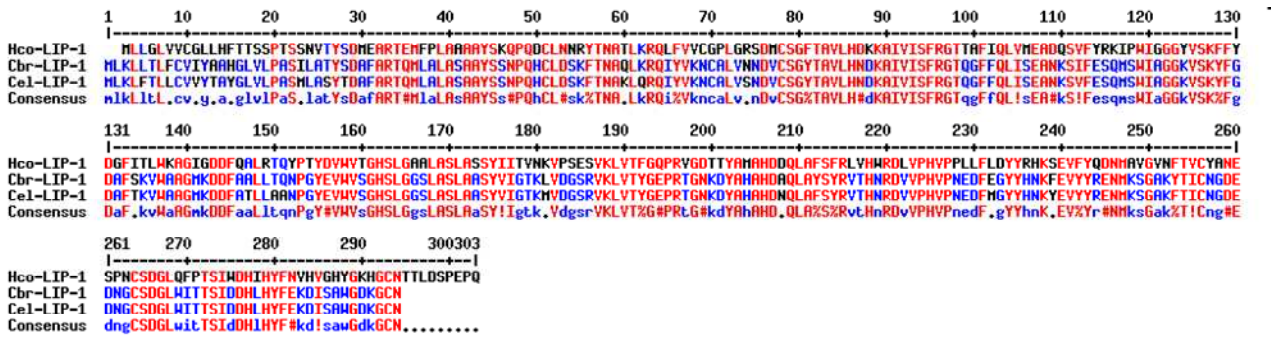



**Figure n°18 : Alignement d'Hco-LIP-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank.**

*Alignement d'Hco-LIP-1(HM003626) avec ses homologues Caenorhabditis briggsae : Cbr-LIP-1 (XP_002637173) et Caenorhabitis elegans : Cel-LIP-1 (NP_505743).*

## f. Caractérisation d'Hco-PSSP-1.

L'ADNc pleine longueur correspondent à *Hco-pssp-1* possède 783 paires de base et code pour une protéine de 223 aa. La masse moléculaire théorique de la protéine est de 24.34 KDa et son point isoélélectrique est de 8.85. La protéine possède un peptide signal de sécrétion avec un site de clivage compris entre les aa 14 et 15 (AYA-AP). Aucun domaine protéique conservé n'a été détecté par l'analyse de la séquence protéique. La recherche au niveau des banques protéiques a permis de déterminer que les plus hautes similarités correspondent à la protéine hypothétique d'*Angiostrongylus cantonensis* (CAR63559.1, E value: 1e-32, 43% d'identité) et à la protéine hypothétique de *C. briggsae* CBG02759 (XP 002631007.1, E value: 1e-10, 27% d'identité). Il faut noter que le pourcentage de similarités entre les séquences reste peu important (29% à 43%) (**cf figure n°19**).

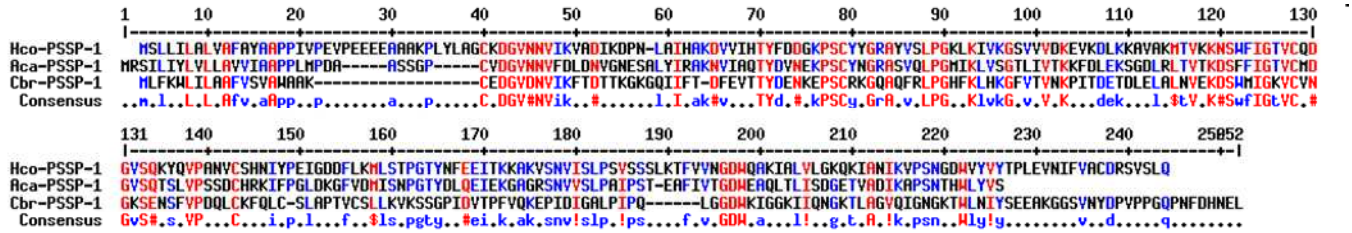



**Figure n°19 : Alignement d'Hco-PSSP-1 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank.**

*Alignement d'Hco-PSSP-1(HM003628) avec ses homologues Angiostrongylus cantonensis : Aca-PSSP-1 (CAR63559.1) et Caenorhabditis briggsae : Cbr-PSSP-1 (XP 002631007.1).*

L'analyse des banques d'EST a permis de mettre en évidence des homologues de Hco-PSSP-1 chez d'autres espèces de strongles notamment avec les nématodes *O. ostertagi*, *T.*

*circumcincta*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *A. caninum*, *Ancylostoma ceylanicum* et *Dictyocaulus viviparus.*

## g. Caractérisation d'Hco-COL-166.

L'ADNc complet se compose de 1064 paires de base et code pour une protéine de 302 aa. La masse moléculaire de la protéine est de 29,24 KDa et le point isoélectrique théorique est de 4,8. L'analyse de la séquence protéique d'Hco-COL-166 a permis de mettre en évidence l'absence de peptide signal de sécrétion et la présence d'un domaine « nématode cuticule collagène N-terminale » (pfam01484, Evalue : $1^{e}$-15). On retrouve une forte similarité de cette séquence avec un membre de la famille de collagène de *C. elegans* : col-166 (NP-001024894 .1, E value : $2^{e}$-36, 89% d'identité) et la protéine hypothétique de *C. briggsae* CBG05029 (XP-001676889, E value : $7^{e}$-36, 91% d'identité) (**cf figure n°20).**

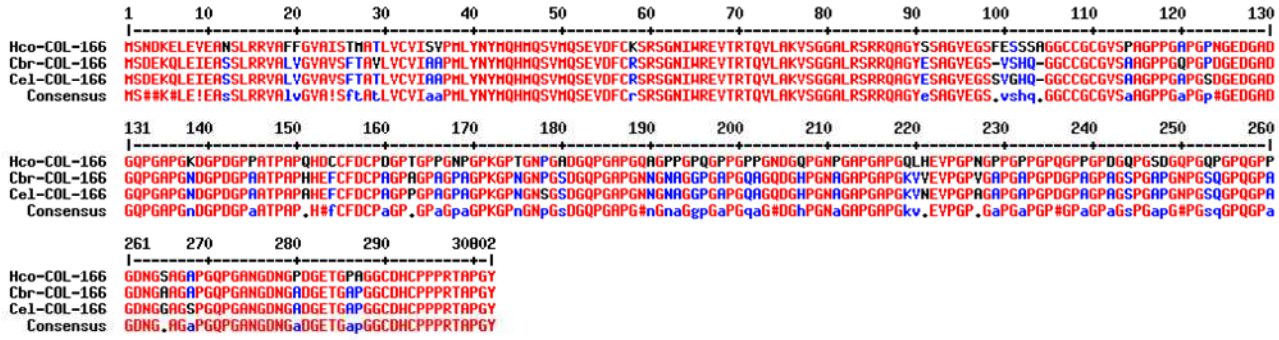



**Figure n°20 : Alignement d'Hco-COL-166 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank.**

*Alignement d'Hco-COL-166(HM003630) avec ses homologues Caenorhabditis briggsae : Cbr-COL-166 (XP-001676889) et Caenorhabditis elegans : Cel –PSSP-1 (NP-001024894 .1).*

L'analyse des banques d'EST traduites a permis de mettre en évidence des homologues de Hco-col-166 chez d'autres espèces de strongles notamment chez *C. elegans*, *C. briggsae*, *Wuchereria bancrofti*, et *B. malayi*.

## h. Caractérisation d'Hco-PSSP-2.

L'ADNc pleine longueur d'*Hco-pssp-2* possède 492 paires de base et code pour une protéine de 123 aa. La masse moléculaire de la protéine est 14,44KDa et le point isoélectrique théorique est de 8,26. L'analyse de la séquence protéique n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un peptide signal de sécrétion ni d'un domaine conservé au sein de la protéine. Cependant, la recherche au niveau des banques protéiques a permis de déterminer que la plus

haute similarité correspondait à une protéine hypothétique R02C2.7 de *C. elegans* (NP_001024064.1, E-value : $3^{e}$-09, 31% d'identité). L'étude des banques d'EST a permis de démontrer la présence d'homologues de Hco-PSSP-2 chez d'autres espèces de strongles comme *C. elegans* et *C. briggsae*. L'alignement de ces séquences est représenté sur la **figure n°21**.

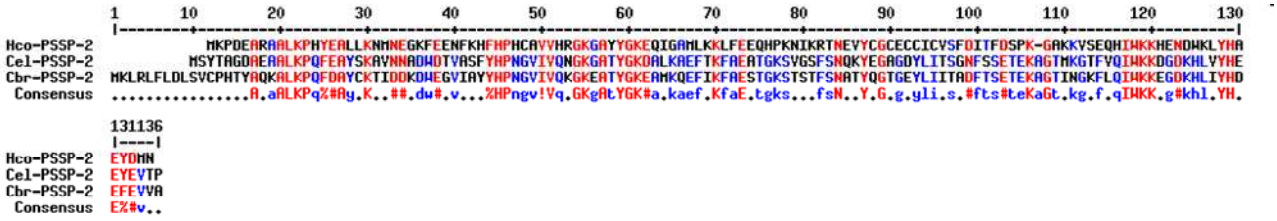



**Figure n°21 : Alignement d'Hco-PSSP-2 avec ses homologues proches identifiés dans GenBank.**

*Alignement d'Hco-PSSP-2(HM003631) avec ses homologues Caenorhabditis briggsae : Cbr-PSSP-2 (XP_001674254.1) et Caenorhabditis elegans : Cel-PSSP-2 (NP_001024064.1).*

## *6.* Recherche et caractérisation des candidats chez *T. circumcincta* et *T. colubriformis.*

Des études ont montré la présence de protection croisée notamment entre *H. contortus* et *T. circumcincta* (Stankiewicz *et al.*, 2000). C'est pourquoi nous avons recherché des homologues de certains candidats déterminés chez *H. contortus* chez les deux autres espèces de strongles gastro-intestinaux.

Nous avons donc recherché des homologues des transcrits *Hco-far-1*, *Hco-ttl-1*, *Hco-slp-1*, *Hco-lon-1*, *Hco-lip-1, Hco-nim-1, Hco-nim-2* et *Hco-pssp-1* chez les deux autres espèces de strongles digestifs. Pour cela, les techniques de 5' et 3' RACE-PCR ont été utilisées avec des amorces internes définies dans les séquences d'*H. contortus* ou bien à partir d'EST de *T. circumcincta* ou *T. colubriformis* quand celles-ci étaient disponibles dans les banques (**cf annexe n°3**).

Les réactions de 5'-PCR ont été réalisées à l'aide de la séquence SL1 (spliced leader 1) en association avec des amorces internes des gènes d'intérêts étudiés **(cf annexes n°1 et 3)**. Les réactions de 3'PCR ont été réalisées comme décrit précedemment pour *H. contortus.*

La nomenclature des homologues chez *T. circumcincta* et *T. colubriformis* est basée sur l'utilisation des trois premières lettres de l'espèce (*T. circumcincta* : Tci et *T. colubriformis* : Tco)

Les ADNc complets correspondant aux homologues de *Hco-far-1*, *Hco-ttl-1*, *Hco-lon-1* ont été obtenus chez les nématodes *T. circumcincta* et *T. colubriformis*. Pour les candidats *Hco-*

*pssp-1* et *Hco-lip-1*, des homologues chez le nématode *T. circumcincta* ont été identifiés alors que la recherche d'homologue d'*Hco-slp-1*, *Hco-nim-1 et Hco-nim-2* est restée infructueuse chez les nématodes *T.colubriformis* et *T. circumcincta.*

La caractérisation des homologues est résumée dans le **tableau n°7.**

| Nom | ADNc complet (pb)/ nbr aa | | MM (KDa) | | PI | | Présence d'un pepttide signal de sécrétion | | % d'identité *Tci/Tco* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Tci* | *Tco* | *Tci* | *Tco* | *Tci* | *Tco* | *Tci* | *Tco* | |
| Far-1 | 756bp 180aa | 765bp 180aa | 19.8 | 19.7 | 8.43 | 8.43 | Oui | Oui | 92% / 93% |
| Ttl-1 | 512bp 136aa | 498bp 136aa | 15.1 | 14.9 | 5.38 | 5.82 | Oui | Oui | 78% / 77% |
| Slp-1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lon-1 | 1184bp 302aa | 1186bp 303aa | 33.8 | 33.7 | 6.95 | 7.13 | Oui | Oui | 79% / 76% |
| Lip-1 | 976bp 292aa | - | 32 | - | 6.78 | - | Oui | - | 57% |
| Nim-1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Nim 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pssp-1 | 757bp 213aa | - | 22.9 | - | 7.69 | - | Oui | - | 60% |

**Tableau n°7 : synthèse des homologues obtenus chez *Tci* (*T. circumcincta*) et *Tco* (*T. colubriformis*). MM : masse moléculaire, PI : point isoélectrique.**

## a. Conservation des séquences entre espèces.

Une fois les séquences pleines longueurs obtenues, des alignements des séquences issues des différentes espèces de strongles ont été réalisées par le logiciel Multalin (**cf figures n°22 à n°26**).

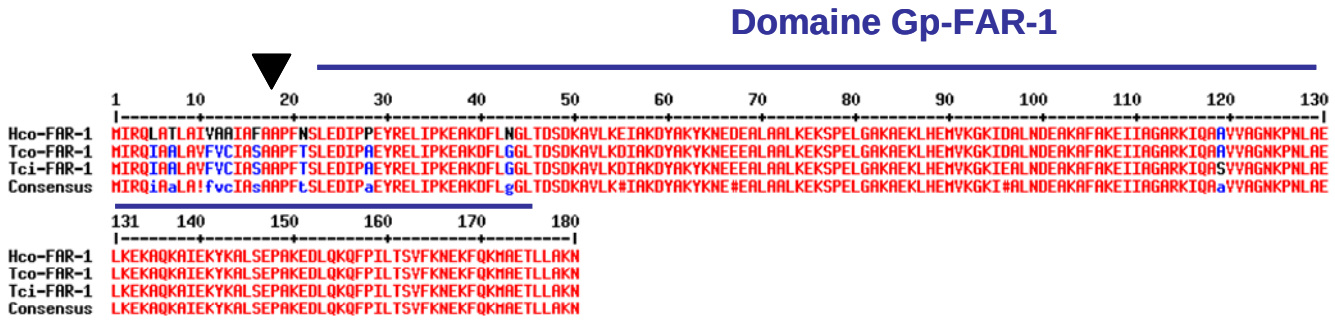



**Figure n°22 : Alignement de la séquence Hco-FAR-1 avec les homologues déterminés chez *T. colubriformis* (Tco) et *T. circumcincta* (Tci).**

*Alignement d'Hco-FAR-1 avec ses homologues T. circimcincta : Tci-FAR-1 et T. colubriformis : Tco-FAR-1. La flèche noire correspond au site de clivage du peptide signal de sécrétion.*

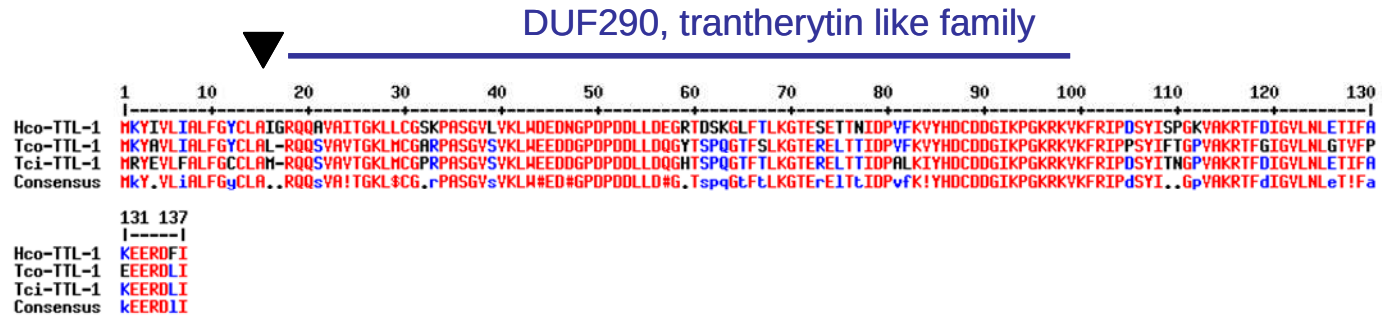



**Figure n°23 : Alignement de la séquence Hco-TTL-1 avec les homologues déterminés chez *T. colubriformis* (Tco) et *T. circumcincta* (Tci).**

*Alignement d'Hco-TTL-1(HM003621) avec ses homologues T. circumcincta : Tci-TTL-1 (HM003622) et T. colubriformis : Tco-TTL-1. La flèche noire correspond au site de clivage du peptide signal de sécrétion.*

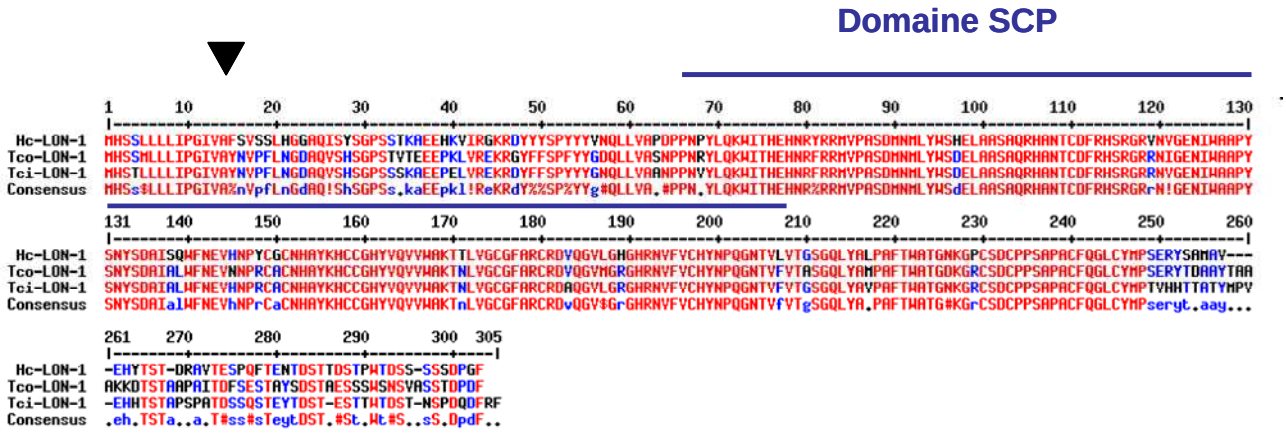



**Figure n°24 : Alignement de la séquence Hco-LON-1 avec les homologues déterminés chez *T. colubriformis* (Tco) et *T. circumcincta* (Tci).**

*Alignement d'Hco-LON-1(HM003624) avec ses homologues T. circimcincta : Tci-LON-1 (HM003625) et T. colubriformis : Tco-LON-1. La flèche noire correspond au site de clivage du peptide signal de sécrétion.*

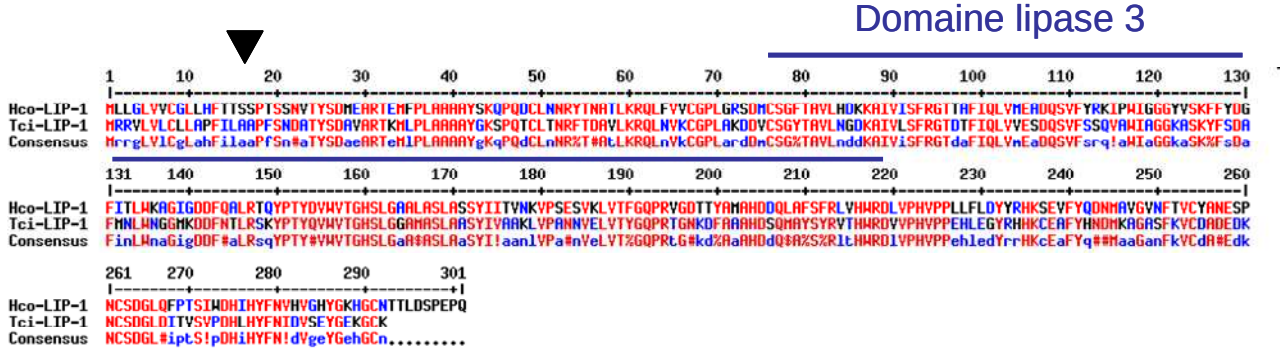



**Figure n°25 : Alignement de la séquence Hco-LIP-1 avec les homologues déterminés chez *T. circumcincta* (Tci).**

*Alignement d'Hco-LIP-1(HM003626) avec son homologue T. circimcincta : Tci-FAR-1 (HM003627). La flèche noire correspond au site de clivage du peptide signal de sécrétion.*

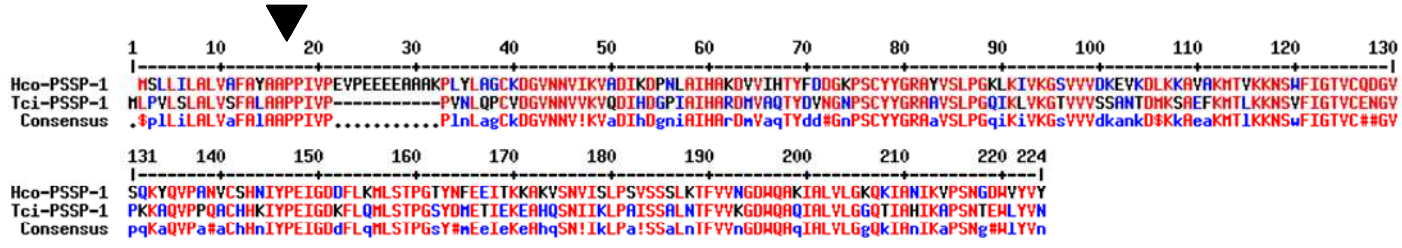



**Figure n°26 : Alignement de la séquence Hco-PSSP-1 avec les homologues déterminés chez *T. circumcincta* (Tci).**

*Alignement d'Hco-PSSP-1(HM003628) avec son homologue T. circimcincta : Tci-PSSP-1 (HM003629). La flèche noire correspond au site de clivage du peptide signal de sécrétion.*

Ces alignements nous ont permis de mettre en évidence un haut degré de similarités entre les séquences protéiques d'Hco-FAR-1, d'Hco-TTL-1 et Hco-LON-1 et leurs homologues déterminés chez *T. circumcincta* et *T. colubriformis* **(cf figures n°22, 23 et 24).**

Pour Hco-LIP-1 et Hco-PSSP-1 l'alignement des séquences obtenues chez *T. circumcincta* montre un taux de similarité peu important (73% et 62%) **(cf figures n°25 et 26).**

La divergence retrouvée entre les séquences pour les candidats Hco-LIP-1 et Hco-PSSP-1 met en évidence la difficulté à déterminer des amorces dans des zones conservées afin de pouvoir trouver leurs homologues chez *T. colubriformis*.

## 7. Production des protéines recombinantes.

Parmi les 10 contigs par la technique SSH, 8 se sont révélés particulièrement intéressants par la présence d'un peptide signal de sécrétion.

Parmi ces 8 candidats, *Hco-nim-1* et *Hco-nim-2* ont déjà été caractérisés et n'ont pas été décrits comme ayant une fonction connue. De ce fait ces deux candidats ne font pas partie de l'étude suivante.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux candidats *Hco-far-1*, *Hco-ttl-1*, *Hco-slp-1*, *Hco-lon-1* et *Hco-lip-1*. Le but a été d'obtenir les protéines recombinantes correspondant à ces candidats.

Pour cela, l'ADNc codant les protéines étudiées a été introduit dans le vecteur pET-22b(+) en phase avec une séquence de six histidines à l'extrémité C-terminale. Les inserts ont été obtenus par PCR avec des amorces spécifiques de chaque gène d'intérêt. Les amorces possèdent les sites d'enzyme de restriction *NdeI* en 5' pour l'amorce sens et *NotI* en 3' pour l'amorce anti-sens. L'insertion du fragment d'intérêt entre ces deux sites de restriction permet d'enlever le signal pelB leader qui est un signal d'adressage au périplasme (**cf annexe n°5**).

Des produits d'expression ont été détectés à l'aide d'anticorps anti-Histidine pour tous les candidats à l'exception de la protéine codant pour *Hco-lip-1* **(cf figure n°27)**.

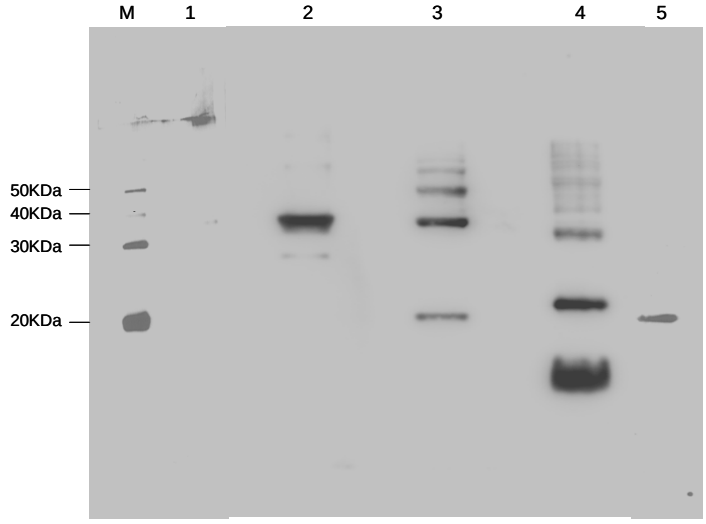



**Figure n°27 : Révélation des protéines recombinantes par l'anticorps anti-HIS.**

*M : poids moléculaire, 1 : bactérie bL21 vide, 2 : Hco-LON-1 (33KDa), 3 : Hco-TTL-1 (15KDa), 4 : Hco-SLP-1(11,5KDa), 5 : Hco-FAR-1 (19,5KDa).*

La protéine recombinante d'Hco-FAR-1 se situe aux environs de 19,5 KDa, d'Hco-SLP-1 à 11,5 KDa, d'Hco-TTL-1 à 15 KDa et d'Hco-LON-1 à 33 KDa.

L'analyse du western blot permet de mettre en évidence deux particularités. Pour Hco-TTL-1 et Hco-SLP-1, on peut visualiser la présence respectivement d'un tétramère et d'un trimère correspondant à des multiples de la taille du monomère. Par exemple, le monomère d'Hco-TTL-1 se situe à 15 KDa et on peut visualiser le dimère à 30 KDa, le trimère aux environ de 45 KDa et le tetramère aux environ de 60 KDa **(cf figure n°27)**. Ce résultat corrsepond à la littérature. En effet, il est décrit que la forme native de TTR (homologue de TTL chez les vertébrés) est un homotétramère (Eneqvist *et al.*, 2003; Jacob *et al.*, 2007; Saverwyns *et al.*, 2008) et que saposine est sous une forme dimérique ou trimèrique (Bruhn, 2005) afin de pouvoir lyser les érythrocytes.

L'analyse des différentes fractions solubles et insolubles des lysats bactériens nous ont permis de montrer que seule la protéine Hco-FAR-1 est retrouvée dans la fraction soluble. Toutes les autres protéines obtenues sont probablement sous forme de corps d'inclusion.

Dans le but de tester leur éventuel pouvoir immunogène, des études sont actuellement en cours au sein du laboratoire. Des moutons sont infestés avec le mix des protéines recombinantes en présence ou non d'adjuvant. Cette infestation est répétée à 1 mois d'intervalle. Le mouton est ensuite infesté 15 jours plus tard par des larves L3 de la souche ISE d'*H. contortus* (Roos *et al.*, 2004). Des études de coproculture permettront de mettre en évidence ou non la présence d'un éventuel pouvoir protecteur de ces protéines envers les strongles digestifs puis d'étudier la

présence des adultes après autopsie des moutons. Ces résultats sont actuellement en cours au laboratoire et seront discutés plus en détails dans la partie perspective.

# Troisième partie

# Discussion

# III Discussion.

## 1. Stratégie générale.

Pour les strongles gastro-intestinaux, le passage de la vie libre à la vie parasitaire implique de nombreux changements physiologiques permettant l'évasion du système immunitaire, des changements au niveau de la nutrition et du métabolisme mais également des modifications au niveau de la croissance et de la maturation sexuelle. C'est à partir de ces données que nous avons émis l'hypothèse que les gènes impliqués dans ces changements physiologiques peuvent représenter des cibles potentielles afin de mettre au point de nouvelles techniques de lutte contre les strongles gastro-intestinaux.

Dans le but d'identifier certains de ces gènes chez le nématode *H. contortus*, nous avons développé une stratégie basée sur la technique SSH. En effet, cette technique permet de détecter des gènes spécifiquement exprimés ou sur exprimés à un stade de développement donné. Dans le but d'accélérer la validation des candidats, nous avons généré 4 banques d'ADNc enrichies en transcrits du stade L4 (5dpi) par rapport au stade L3. Pour cela, les ADNc ont été amplifiés à l'aide des séquences leader SL1 ou SL2. Ce sont des séquences d'épissage alternatif présentes sur 75 à 85% des transcrits des nématodes en fonction des espèces (Guiliano et Blaxter, 2006). Par la suite, les ADNc pré-amplifiés par SL1 ou SL2 ont été digérés par l'enzyme de restriction *RsaI* ou par l'enzyme de restriction *AluI*. Nous avons pu ainsi obtenir à partir de ces banques différents fragments de transcrits correspondant au même gène. De plus, certains fragments n'ont été identifiés que dans l'une des quatre banques étudiées. Ces résultats montrent l'intérêt d'utiliser 2 enzymes de restriction différentes ainsi que deux techniques de pré amplification afin d'accélérer la validation de certains candidats mais également, en même temps, de pouvoir en valider d'autres par une validation croisée.

Le criblage des banques par dot blot a révélé une importante redondance des clones. Parmi les 10 contigs obtenus, 4 correspondent à des transcrits fortement exprimés chez *H. contortus* (Geldhof *et al.*, 2005). Ces candidats sont *Hco-nim-1*, *Hco-nim-2*, *Hco-pssp-1* et *Hco-pssp-2* (Geldhof *et al.*, 2005). Ce résultat montre que la redondance obtenue pour certains fragments lors de la réalisation de la technique SSH peut correspondre à des transcrits extrêmement représentés au stade parasitaire L4 (5dpi) ce qui démontre la robustesse de notre stratégie.

Pour les candidats possédant un peptide signal de sécrétion, des homologues ont été recherchés chez les deux autres principales espèces de strongles gastro-intestinaux (*T.*

*circumcincta* et *T. colubriformis*) dans le but d'évaluer leur degré de conservation entre espèces. En effet, l'hôte étant généralement infesté simultanément par plusieurs espèces de parasites. Il est donc important de déterminer si les candidats identifiés chez *H. contortus* possèdent des homologues chez les deux autres espèces de strongles gastro-intestinaux.

Enfin, l'intérêt de ce travail est de déterminer des gènes spécifiquement exprimés ou sur-exprimés au stade parasitaire par rapport au stade pré-parasitaire. L'identification de ces gènes nous a permis de comprendre un peu plus en détail le dialogue moléculaire lors de l'interaction hôte-parasite. Cette compréhension va ainsi nous permettre de proposer de nouvelles méthodes de lutte (thérapeutiques ou vaccinales) basées sur les gènes clés du parasitisme.

Dans le cadre de cette discussion, je détaillerai les éventuels rôles des candidats déterminés avant de discuter l'intérêt de ces candidats en tant que nouvelles cibles potentielles pour controler les parasites.

## 2. Les gènes candidats.

Les recherches dans les banques de données protéiques ont permis de trouver des homologues chez d'autres espèces de nématodes. Leur similarité avec ces homologues, nous a permis d'émettre des hypothèses quant aux fonctions des candidats identifiés. Ainsi, nous avons pu classer nos gènes candidats en 3 groupes : les gènes codant pour des protéines ayant une interaction avec les lipides, puis les gènes codant pour des protéines impliquées au niveau du développement du nématode et enfin les gènes codant pour des protéines n'ayant pas de fonction connue.

### a. Gènes codant pour des protéines ayant une interaction avec les lipides.

Les nématodes ne sont pas capables de synthétiser tous les lipides nécessaires à leur métabolisme. C'est pourquoi la captation des lipides de l'hôte est nécessaire à leur développement, à leur production d'énergie et donc à leur survie. Parmi les candidats retrouvés trois peuvent avoir une interaction avec les lipides. Il s'agit des candidats *Hco-far-1*, *Hco-slp-1* et *Hco-lip-1*.

#### *i. Hco-far-1.*

Les protéines FAR (Fatty Acid and Retinol binding) sont présentes aussi bien chez les mammifères (Sweetser *et al.*, 1987) que chez les nématodes parasites humains (Bradley *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 1997; Mpagi *et al.*, 2000), parasites de plantes (Prior *et al.*, 2001) ou parasites d'animaux (Basavaraju *et al.*, 2003; Kuang *et al.*, 2009; Mei *et al.*, 1997). Ces

protéines jouent un rôle essentiel dans la capture des longues chaines d'acides gras et du rétinol de l'hôte (Garofalo *et al.*, 2002; Garofalo *et al.*, 2003b ; Kennedy *et al.*, 1997 ; Sturchler *et al.*, 1981)

La première protéine FAR identifiée chez un nématode parasite est Ov-FAR-1, protéine *d'Onchocerca volvulus*. *O. volvulus* est un nématode parasite de type filaire responsable de l'onchocerchose chez l'homme induisant une cécité (Kennedy *et al.*, 1997; Tree *et al.*, 1995). Ov-FAR-1 est un antigène majeur d'*O. volvulus* et la protéine est exprimée tout au long du cycle parasitaire. De plus, cette protéine a été retrouvée dans les produits d'excrétion-sécrétion du nématode (Garofalo *et al.*, 2002; Tree *et al.*, 1995). La protéine Ov-FAR-1 est impliquée dans la capture des acides gras et du rétinol de l'hôte. En effet, une concentration en rétinol 8 huit fois supérieure dans les nodules induits par *O. volvulus* par rapport aux tissus de l'hôte a été décrite (Sturchler *et al.*, 1981). Des études ont également montré un rôle important du rétinol dans la croissance des parasites, la différentiation et l'embryogénèse (Storey, 1982).

Ainsi, les protéines FAR ont un rôle important dans la déplétion des lipides et du rétinol de l'hôte (Kennedy *et al.*, 1997) en facilitant la prise, le transport et la distribution des acides gras et du rétinol au niveau des tissus cibles spécifiques (Garofalo *et al.*, 2002; Garofalo *et al.*, 2003b).

Les conséquences de ce détournement de ressources peuvent être importantes pour l'hôte. En effet, la déficience en rétinol peut altérer sa réponse immunitaire (Semba *et al.*, 1993) et ainsi favoriser la colonisation de l'hôte par différents agents pathogènes et faciliter leur survie. Chez les nématodes gastro-intestinaux, FAR-1 pourrait ainsi favoriser l'installation et le maintien du nématode dans les tissus hôtes (Carman *et al.*, 1992; Nikawa *et al.*, 1999).

De manière intéressante, chez les nématodes phytoparasites, une protéine FAR-1 a également été identifiée chez *Globodera pallida* (Gp-FAR-1). La caractérisation biochimique de cette protéine a mis en évidence sa capacité à fixer les lipides impliqués dans la signalisation moléculaire de la réponse protectrice de la plante (Prior *et al.*, 2001).

De plus, la protéine FAR-1 appartient à une grande famille multigénique. En effet, il a été décrit 7 protéines FAR différentes chez *C. elegans* (Garofalo *et al.*, 2003b) et au moins 6 copies du gène FAR ont été identifiés à partir des séquences du génome partiel d'*H. contortus* (Kuang *et al.*, 2009).

Hco-FAR-1 possède 95% d'identité avec la protéine FAR d'*Ostertagia ostertagi*. Ces protéines possèdent toutes deux un domaine Gp-FAR-1. De plus, chez *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, nous avons pu montrer un taux de similarité de 95% entre les séquences protéiques FAR-1. Ceci indique la présence d'une grande conservation entre les protéines FAR

des strongles et laisse supposer qu'Hco-FAR-1 possède les mêmes fonctions que chez les autres nématodes.

*ii. Hco-slp-1.*

*Hco-slp-1* fait partie de la famille des saposine like protein « SAPLIPs ». Cette famille est présente dans de nombreux organismes depuis les eukaryotes jusqu'aux mammifères (Munford *et al.*, 1995). Chez les nématodes, le génome de *C. elegans* contient différents gènes de la famille des Saposin-like protein « SAPLIP ». Certaines SAPLIPs sont similaires aux protéines présentes chez les amibes *Entamoeba histolytica* (Banyai & Patthy, 1998) qui ont une activité antibactérienne et cytotoxique du fait de leur capacité à former des pores dans les cellules des membranes de l'hôte. Cette famille de protéines a aussi été identifiée chez le nématode *A. caninum* (*Ac-slp-1* et *Ac-slp-2*) où il a été suggéré un rôle dans la lyse des cellules hôtes durant la migration tissulaire (Don *et al.*, 2007). En effet, les SAPLIPs ont été décrites comme étant impliquées dans de nombreuses fonctions telles que des activités antimicrobiennes, la réponse immunitaire innée ou bien encore le métabolisme lipidique (Bruhn, 2005). Leur caractéristique majeure est la présence de six cystéines leur permettant de former des ponts di-sulfures.

*Hco-slp-1* code pour une protéine « saposine-like » (SAPLIP). Lors de la validation de ce candidat par RT-PCR, nous avons pu observer une augmentation de la transcription à partir du stade L4 (5dpi) par rapport au stade L3. La comparaison des séquences obtenues chez *H. contortus* avec la séquence d'*A. caninum* présente dans les banques de données protéiques a permis de vérifier la présence des six cystéines caractéristiques des protéines SAPLIP même si le reste des séquences présente un faible taux de similarité (36%). Cette faible conservation entre espèces peut expliquer la difficulté à trouver ses homologues chez les espèces *T. circumcincta* et *T. colubriformis*.

Nous avons également produit la protéine recombinante d'Hco-SLP-1 et nous avons pu observer par western blot la présence du dimère de cette protéine. Ce résultat est particulièrement intéressant car c'est la forme dimérique qui est impliquée dans la formation de pores dans les cellules de l'hôte (Leippe *et al.*, 1992; Patthy, 1991).

*iii. Hco-lip-1.*

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides à longues chaînes d'acides gras en glycérol et en acides gras correspondants. Ces enzymes ont été mises en évidence, dès 1901, chez des bactéries telles que *Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginasa* et *Pseudomonas fluorescens* (Eijkmann, 1901).

Les lipases existent aussi chez les végétaux (Beisson *et al.,* 2001) et chez les mammifères (Baba *et al.,* 1991). Contrairement aux lipases de mammifères, les lipases identifiées chez les nématodes sont très peu connues et très peu caractérisées.

Les lipases sont reparties en trois classes. Tout d'abord, les lipases de classe 1 et 2 sont caractérisées par la présence d'un domaine conservé spécifique de chaque groupe. En l'absence de l'un des deux domaines, l'enzyme est classée dans les lipases de classe 3.

Le gène *Hco-lip-1* code pour une lipase de classe 3 et sa transcription commence à partir du stade L4 (5dpi). La séquence d'Hco-LIP-1 et la séquence homologue déterminée chez *T. circumcincta* montrent une similarité de 73% et sont à notre connaissance les premières lipases de classe 3 déterminées chez des espèces de strongles.

Comme cité précédemment les nématodes parasites ne peuvent pas synthétiser eux-mêmes tous les lipides nécessaires à leur métabolisme, c'est pourquoi nous pouvons émettre l'hypothèse du rôle des lipases de classe 3 dans la captation des lipides de l'hôte.

## b. Gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement.

Lors du passage de la vie libre à la vie parasitaire, le nématode subit de nombreux changements morphologiques notamment au niveau de sa taille mais également par les mues successives qu'il réalise. En effet, une larve de stade L3 mesure de 650 à 850µm pour atteindre 1 à 3 cm au stade adulte (Veglia, 1916 ). Parmi les candidats identifiés, deux sont potentiellement impliqués dans le développement du nématode, il s'agit d'*Hco-lon-1* et d'*Hco-col-166*.

### *i. Hco-lon-1*.

Lors de l'analyse dans les banques de données protéiques, l'homologue le plus proche du candidat *Hco-lon-1* était la protéine LON-1 identifiée chez *C. elegans*.

Le nom de la protéine LON-1 a été attribué par rapport à sa fonction déterminée. En effet, une surexpression du gène lon-1 chez *C. elegans* confère un phénotype anormalement petit. Au contraire, lorsque que le gène lon-1 est invalidé, les nématodes présentent une taille anormalement grande (Morita *et al.,* 2002). Ce gène a donc un rôle dans la régulation de la taille des vers.

Des études récentes ont mis en évidence que la régulation de l'expression du gène lon-1 est dépendante de la voie des TGF-β. Cette voie est régulée par le facteur de transcription DAF-16 au cours de la diapause du nématode. Elle est impliquée dans la mise en place de défense suite à un stress, dans la réponse immunitaire innée ainsi que dans la régulation de la taille du nématode *via* la protéine LON-1 (Maduzia *et al.,* 2002; Morita *et al.,* 2002)

*Hco-lon-1* possède un pourcentage d'identité de 68% avec le gène *Cel-lon-1* du nématode *C. elegans* au niveau de la forme pleine longueur. Par contre lorsque l'on compare les parties centrales des séquences, on observe plus de 80% d'identité. De plus, lors de l'analyse des alignements de séquence, nous avons pu constater un haut degré de conservation entre les séquences d'*H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis*, *C. elegans* et *C. briggsae*. Ces résultats laissent supposer que cette protéine est relativement bien conservée au sein des nématodes. De ce fait, la protéine LON-1 identifiée chez *H. contortus* pourrait également être impliquée dans le développement de taille du nématode.

Les protéines Hco-LON-1 ainsi que Cel-LON-1 possèdent un domaine SCP/Tpx-1/ag5/ PR-1 SC7. La présence de ce domaine est également retrouvée chez des protéines de nématodes parasites que l'on nomme des « activation associated secreted proteins » (ASP). Ces protéines ont été décrites chez de nombreuses espèces de nématodes parasites comme *Cooperia punctata* (Yatsuda *et al.*, 2002), *O. ostertagi* (Geldhof *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2008), *A. caninum* (Hawdon *et al.*, 1999), *B. malayi* (Murray *et al.*, 2001) et *H. contortus* (Schallig & Van Leeuwen, 1997; Schallig *et al.*, 1997). Les protéines ASP sont largement présentes chez des espèces de nématodes parasites mais leur fonction reste à élucider.

*ii. Hco-col-166.*

Le collagène est l'un des constituants principaux de la cuticule du nématode et se situe à l'interface entre le nématode et son environnement. De ce fait c'est une protéine extrêmement étudiée au niveau biochimique, biologique et immunologique (Fetterer & Rhoads, 1993). C'est également une protéine pour laquelle il existe une famille multigénique comprenant plus de 160 gènes chez *C. elegans.*

Le collagène de différentes espèces de nématodes a fait l'objet de nombreuses études. Par exemple des études ont été réalisées chez le nématode *Trichinella spiralis* (Fu et al., 2005), mais également chez le nématode libre *C. elegans* (Johnstone, 2000), ou encore chez des strongles tels que *H. contortus* (Shamansky et al.,1989) ou *T. circumcincta* (Johnstone *et al.*, 1996) pour n'en citer que quelques uns.

Par ailleurs, des études ont permis de mettre en évidence que le collagène est spécifiquement exprimé au stade parasitaire notamment chez la nématode parasite *T. spiralis* (Fu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007), chez le strongle *T. circumcincta* (Nisbet *et al.*, 2007) ou encore chez *H. contortus* (Fetterer & Rhoads, 1993). Ceci coïncide avec les résultats que nous avons obtenus et laisse supposer l'importance du collagène dans la croissance du nématode au cours de la transition entre la phase libre et la phase parasitaire.

## c. Gènes codant pour des protéines n'ayant pas de fonction connue.

Cinq candidats déterminés au cours de ce travail n'ont pas révélés de fonction déterminée. Néanmoins, l'analyse dans les banques de données d'EST nous a permis de mettre en évidence que ces nouveaux gènes sont spécifiques aux nématodes et de ce fait peuvent avoir un rôle important dans l'installation du parasite chez son hôte.

### *i. Hco-ttl-1.*

Le nom TTL pour « tranthyretin like » a été défini en fonction de son homologie avec les protéines présentes chez les vertébrés que l'on nomme TTR « tranthyretin ».

Les protéines TTR sont des protéines homotétramériques retrouvées chez les vertébrés et qui sont impliquées dans le transport des hormones thyroïdiennes (Sonnhammer & Durbin, 1997). Elles ne sont retrouvées que chez les vertébrés contrairement aux protéines TRP « transthyretin related protein » qui sont présentes quant à elles chez de nombreuses espèces telles que les bactéries, les plantes, les animaux vertébrés et invertébrés (Eneqvist *et al.*, 2003). Contrairement aux TTR et aux TRP, les TTL ne peuvent pas fixer les hormones thyroïdiennes.

Les protéines TTL ont été pour la première fois identifiées chez le nématode libre *C. elegans* (Sonnhammer & Durbin, 1997). Les homologues de TTL sont retrouvés chez des nématodes parasites de plantes tel que *Xiphinema index* (Furlanetto *et al.*, 2005), *Heterodera glycines (Gao et al., 2003), Meloidogyne incognita* (McCarter *et al.*, 2003) et plus récemment chez *Radopholus similis* (Jacob *et al.*, 2007).

L'homologue le plus proche d'Hco-TTL-1 déterminé dans les banques de données protéiques correspond à la séquence d'*Ostertagia ostertagi* « Oos-TTL-1 ». L'analyse de la famille du gène *ttl* a permis de mettre en évidence une grande diversité des séquences de TTL (Saverwyns *et al.*, 2008). L'étude de la transcription entre le stade pré-parasitaire et parasitaire a été réalisée sur 18 gènes codant pour la protéine TTL. Une expression spécifique au niveau du stade parasitaire n'a été observée que pour deux d'entre eux incluant le gène *Oos-ttl-1* (Saverwyns *et al.*, 2008). Cette expression similaire ainsi que le haut degré de conservation entre ces deux séquences peuvent laisser supposer un rôle de la protéine TTL dans l'interaction hôte-parasite.

De plus, lors de la recherche des homologues d'Hco-TTL-1 chez *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, l'analyse des séquences a révélé un pourcentage de similarité de 86% entre les séquences des trichostrongles. Il existe donc une grande conservation des séquences entre les différentes espèces de strongles.

Lors de la production de la protéine recombinante du candidat Hco-TTL-1, l'analyse par western-blot a permis de visualiser l'obtention de la forme tetramérique qui pourrait correspondre à la forme active de la protéine comme décrit par (Wojtczak *et al.*, 1996).

Des études ont été réalisées afin d'étudier le pouvoir immunogène des protéines TTL notamment chez le nématode *H. contortus*. Une analyse par western blot des produits d'excrétion-sécrétion, a été réalisée en utilisant du sérum de moutons ayant développé une réponse immune protectrice. Ceci a permis d'identifier la protéine TTL, confirmant la sécrétion de cette protéine (Yatsuda *et al.*, 2003). D'autres études ont également permis de mettre en évidence la présence des protéines TTL dans les produits d'excrétion-sécrétion chez *A. caninum* (Hotez *et al.*, 2003)*O. ostertagi* (Vercauteren *et al.*, 2003) ou encore *B. malayi* (Hewitson *et al.*, 2008) Des études plus récentes ont également permis de montrer que les protéines TTL font partie des produits d'excrétion-sécrétion les plus représentés chez les nématodes parasites (Nagaraj *et al.*, 2008)

*ii. Hco-nim-1 et Hco-nim-2.*

*Hco-nim-1* et *Hco-nim-2* codent pour des transcrits de nématodes exprimés spécifiquement à partir du stade L4 chez le nématode *H. contortus* (Geldhof *et al.*, 2005). Les séquences d'ADNc complètes de ces deux candidats sont déjà disponibles dans les banques de données sous les numéros d'accession AM040235 et AM040236 (Geldhof *et al.*, 2005). L'analyse des fragments obtenus par la technique SSH a permis de montrer qu'ils correspondent respectivement à ces deux gènes.

De plus, ces candidats ont également été déterminés comme étant les transcrits les plus abondamment représentés dans les banques d'EST chez *H. contortus* (Geldhof *et al.*, 2005). De manière intéressante, ce résultat correspond aux données obtenues par les banques SSH lors de notre étude. En effet, *Hco-nim-1* et *Hco-nim-2* sont les deux candidats les plus abondamment retrouvés au sein des banques soustraites et de ce fait nous permettent de valider le résultat des banques SSH.

La recherche d'homologues de ces candidats a été réalisée par bio-informatique et par des techniques de biologies moléculaires chez les strongles *T. circumcincta* et *T. colubriformis.* Ils n'ont pas été retrouvés ce qui suggère un rôle spécifique à *H. contortus* et pour cette raison n'ont pas fait l'objet d'une production en système hétérologue.

*iii. Hco-pssp-1.*

Lors de l'analyse dans les banques de données protéiques du candidat *Hco-pssp-1*, l'homologue le plus proche correspond à une protéine hypothétique du strongle

*Angiostrongylus cantonensis* pour lequel une augmentation de la transcription lors du passage de la vie libre à la vie parasitaire a été démontré (Datu *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009).

De manière intéressante, une étude a permis de montrer que le candidat *Hco-pssp-1* fait partie des transcrits les plus représentés au stade parasitaire L4 chez le strongle *H. contortus* (Geldhof *et al.*, 2005).

Nous avons pu identifier un homologue d'*Hco-pssp-1* chez le nématode *T. circumcincta* (*Tci-pssp-1*) avec 74% de similarité entre les deux séquences protéiques. Ce résultat suggère une forte conservation de cette protéine entre les deux espèces de strongles.

*iv. Hco-pssp-2.*

L'analyse de la séquence du candidat *Hco-pssp-2* dans les banques de données protéiques ne nous a pas permis de mettre en évidence d'homologie significative. Cette nouvelle protéine reste néanmoins intéressante puisque le transcrit correspondant a été décrit comme étant l'un des plus exprimés au stade parasitaire chez *H. contortus* comme pour les candidats *Hco-nim-1*, *Hco-nim-2* et *Hco-pssp-1* (Geldhof *et al.*, 2005) et qu'il est spécifiquement exprimé au stade parasitaire par rapport au stade pré-parasitaire.

## 3. Cibles potentielles ?

Les gènes cibles pour la chimiothérapie et la vaccination doivent répondre à certains critères. Tout d'abord, une cible potentielle doit être spécifique aux nématodes puis être conservée entre les espèces et enfin avoir un rôle essentiel pour la survie et/ou le développement du parasite (Lizotte-Waniewski *et al.*, 2000). Ces critères étant remplis pour plusieurs de nos candidats, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces derniers représentent donc des cibles intéressantes pour la mise au point de nouvelles méthodes de lutte. En effet, des études récentes ont montré que des vaccinations contre des helminthes étaient réalisables notamment avec la mise en évidence de candidats vaccins comme la cathepsin L du trématode *Fasciola hepatica* (Dalton *et al.*, 2003) ou l'aminopeptidase d'*H. contortus* (Smith et al., 1993). De manière générale, les vaccins potentiels sont des protéines retrouvées dans les produits d'excrétion-sécrétion impliquées dans le processus biologique vital et la régulation de la réponse immunitaire (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003).

Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur les candidats possédant un peptide signal de sécrétion et de ce fait pouvant avoir d'éventuelles interactions avec leur hôte. Nous avons donc axé notre étude sur les protéines Hco-FAR-1, Hco-TTL-1, Hco-SLP-1 et Hco-LON-1.

Les protéines FAR 1 et TTL-1 ont été décrites comme faisant partie des protéines sécrétées (Garofalo *et al.*, 2002; Hewitson *et al.*, 2008; Mulvenna *et al.*, 2009; Nagaraj *et al.*, 2008; Tree *et al.*, 1995; Vercauteren *et al.*, 2003) et nous avons pu mettre en évidence un haut pourcentage de similarité entre les espèces. Le rôle prédominant de la protéine FAR 1 dans la survie des nématodes parasites a également été largement décrit (Garofalo *et al.*, 2003a; Garofalo *et al.*, 2002; Kennedy *et al.*, 1997). Quant à la protéine TTL, elle a déjà été reconnue comme étant hautement immunogène (Yatsuda *et al.*, 2003). De plus, lors de la production de la protéine recombinante, nous avons pu obtenir une forme tétramérique ce qui nous laisse envisager la présence de la forme active de la protéine.

La protéine Hco-SLP-1 possède également un peptide signal de sécrétion même si aucune étude n'a permis de déterminer sa présence au sein des produits d'excrétion-sécrétion. Néanmoins, ce candidat est d'autant plus intéressant que l'efficacité de la saposine comme candidat vaccin, notamment chez l'espèce *F. hepatica*, a déjà été approuvée. En effet, la vaccination de lapins avec la protéine recombinante FhSAP2 a permis de mettre en évidence une protection contre l'infection par *F. hepatica* par la production de dimère de la protéine et donc de son activité cytolytique (Espino & Hillyer, 2003). De plus, lors de la production de la protéine recombinante d'Hco-SLP-1, nous avons obtenu un dimère correspondant donc potentiellement à la forme active de la protéine.

La protéine Hco-LON-1 possède un peptide signal de sécrétion, est spécifique aux nématodes et possède un haut degré de similarité entre espèces. Chez *C. elegans*, la protéine LON-1 a clairement été définie comme jouant un rôle dans la régulation de la taille du nématode. Dans ce contexte, l'altération de la fonction de la protéine Hco-LON-1 pourrait avoir un effet délétere sur la croissance du ver. Cependant, le pouvoir immunogène de la protéine LON-1 reste à évaluer.

# Quatrième partie

# Perspectives et Conclusion

# IV Perspectives.

De nos jours, le contrôle des populations parasitaires est essentiellement basé sur l'utilisation de traitements anthelminthiques dont l'efficacité est fréquemment remise en cause par l'émergence de parasites résistants. Dans ce contexte, il est important d'envisager de nouvelles méthodes de lutte afin de controler durablement les populations de parasites. Une meilleure compréhension du dialogue moléculaire hôte-parasite est essentielle à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques ou vaccinales.

De ce fait, il est envisagé dans des perspectives proches de réaliser des caractérisations beaucoup plus poussées sur les candidats que nous avons identifiés afin de comprendre plus en détails leur fonction mais également de tester leur pouvoir immunogène.

## 1. Immuno-localisation et test de l'activité des candidats.

Dans un objectif fondamental, une des perspectives sera de réaliser l'immuno-localisation de ces candidats afin de savoir si les protéines possédant un peptide signal de sécrétion sont sécrétées. Une caractérisation biochimique est également envisagée afin de comprendre plus en détail leur fonction.

Le but est d'obtenir des anticorps spécifiques qui seront utilisés pour des expériences d'immuno-localisation chez le nématode. Ces expériences nous permettraient dans un premier temps de déterminer la localisation de ces protéines chez le nématode et dans un second temps de confirmer par western blot la présence des protéines dans les produits d'excrétion-sécrétion.

De plus, de nombreuses caractérisations biochimiques peuvent être envisagées notamment sur les candidats ayant une interaction avec les lipides. Dans le cas de la protéine Hco-FAR-1 présente chez *H. contortus* le but serait de vérifier si elle est également capable de fixer des acides gras comme celles retrouvées chez d'autres nématodes tels qu'*O. volvulus* (Garofalo *et al.*, 2002; Kennedy *et al.*, 1997), *C. elegans* (Garofalo *et al.*, 2003b), *A. caninum* (Basavaraju *et al.*, 2003) et *G. pallida (Prior et al., 2001).*

Pour Hco-SLP-1, l'intérêt est l'obtention de la forme dimérique de la protéine afin de tester si cette forme représente bien la forme active de la protéine. Pour cela des tests de lyse d'érythrocytes pourraient être effectués comme ceux réalisés chez *A. caninum*. (Don *et al.*, 2007).

Enfin pour les lipases de classe 3, des études plus approfondies restent à réaliser afin de comprendre le rôle spécifique des lipases dans l'interaction hôte-parasite.

## 2. Validation de l’implication des candidats dans les mécanismes d’invasion.

Dans le but de valider le rôle des candidats dans l’installation du nématode chez son hôte, une des perspectives serait d’inhiber les transcrits de gènes par ARN interference (RNAi). En effet, la transformation stable chez les strongles de ruminants est une technique non maitrisée c’est pourquoi la technique du RNAi semble être une bonne technique alternative. C’est une approche de génétique inverse qui permet de dégrader les transcrits d’un gène en les mettant en présence d’ARN double brin correspondant à ses transcrits. L’observation du phénotype mutant permet alors de déduire la fonction du gène.

Chez *C. elegans*, cette technique est utilisée à haut débit afin de déterminer la fonction de tous les gènes codant potentiellement pour des protéines (Kamath & Ahringer, 2003; Maeda *et al.*, 2001). La technique de RNAi a également déjà été testée avec succès chez le nématode parasite *Nippostrogylus brasiliensis* (Hussein *et al.*, 2002), chez les nématodes à kystes *Heterodera glycines* et *Globodera pallida* (Dalzell *et al.*, 2010; Urwin *et al.*, 2002) ainsi que chez *Meloidogyne incognita* (Dalzell *et al.*, 2010; Rosso *et al.*, 2005)

Cependant, la technique de RNAi semble difficile à réaliser et à reproduire chez *H. contortus* (Geldhof *et al.*, 2006). Des études sont actuellement en cours au laboratoire afin d’optimiser cette technique. Dans ce contexte, nous envisageons d’utiliser la technique de RNAi sur les gènes transcrits à partir du stade L3. Il s'agirait d’infester les moutons avec les larves L3 dont les gènes d'intérêts seront « silencés » et d'évaluer le taux d'installation des larves lors de l'autopsie de l'animal.

## 3. Essais vaccinaux.

A l’heure actuelle, 4 protéines recombinantes sont déjà à disposition au sein du laboratoire (Hco-FAR-1, Hco-SLP-1, Hco-TTL-1 et Hco-LON-1).

Dans le but de tester leur pouvoir protecteur en tant que candidats vaccins, une étude préliminaire est actuellement en cours de réalisation au laboratoire. Les quantités de protéines et le protocole d’immunisationseront basés sur des études d’essai de vaccination ayant conduit à une réduction du nombre d’œufs émis ainsi qu’à une diminuation de la charge parasitaire.

Pour cela, trois moutons ont fait l’objet de cette étude. Tous les moutons vont subir une première injection qui permettra la stimulation du système immunitaire de l’hôte puis une seconde injection à un mois d’intervalle afin d’augmenter la réponse immunitaire. Puis les

moutons seront infestés 15 jours après avec des larves infestantes d'*H. contortus* pour tester la capacité d'installation.

Au mouton témoin, une solution bactéries bl21 sans plasmide de production sera administrée, supplémentée avec de l'adjuvant de Freund complet lors de la première injection et de l'adjuvant de Freund incomplet lors de la deuxième injection.

Un deuxième mouton a été infesté à deux reprise avec un mix des 4 protéines recombinantes (50µg chacune) sans adjuvant.

Le dernier mouton  a également été infesté avec un mix des 4 protéines recombinantes. Lors de la première injection, le mix était supplémenté avec de l'adjuvant de Freund complet et lors de la deuxième injection avec de l'adjuvant de Freund incomplet.

Tous les moutons ont ensuite été infestés 15 jours après la deuxième injection par 15000 larves L3 de la souche ISE d'*H. contortus* (Roos *et al.*, 2004) dans un premier temps et en fonction des résultats obtenus seront également infestés par les deux autres espèces de strongles gastro-intestinaux. Le but est ensuite de réaliser des coprocultures afin de visualiser le taux de développement des larves avant de réaliser le comptage des vers adultes après autopsie. Ceci permettra de définir l'impact d'une stimulation du système immunitaire de l'hôte par les protéines recombinantes candidates sur le taux d'installation de larves d' *H. contortus*.

# V Conclusion.

L’objectif de mon travail de thèse était de déterminer des gènes spécifiquement exprimés ou sur exprimés au cours de l’installation du strongle *Haemonchus contortus* chez son hôte par une approche transcriptomique. La réalisation de la technique SSH en comparant le stade parasitaire L4 (5dpi) par rapport au stade libre L3, nous a permis de découvrir 10 candidats spécifiquement exprimés ou sur exprimés à partir du stade parasitaire.

Parmi ces candidats certains, notamment ceux possédant un peptide signal de sécrétion, ont fait l'objet d'une caractérisation plus poussée telle que rechercher leurs homologues chez les deux autres espèces principales de strongles gastro-intestinaux et réaliser la production de protéines recombinantes.

Au cours de nos travaux, nous avons montré que les gènes identifiés chez *H. contortus* possèdent des homologues chez des strongles d’intérêt vétérinaires ou agronomiques. De plus, la plupart des candidats possède une très faible variabilité interspécifique. La grande conservation des séquences protéiques suggère ainsi que les épitopes potentiellement reconnus par le système immunitaire hôte dans les stratégies vaccinales seraient également conservés. Ainsi, une vaccination basée sur l’utilisation de ces candidats comme cibles pour inhiber l'installation ou le développement des nématodes permettrait de cibler l’ensemble des nématodes gastro-intestinaux d’ovins et de caprins puis de nous affranchir d’une variabilité de réponse entre les différentes espèces de nématodes. En effet, rappelons qu’en condition naturelle d’élevage, les ovins sont le plus souvent sujets à des infestations plurispécifiques.

Dans ce contexte, il est envisagé de tester le pouvoir immunogène de nos candidats les plus pertinents par des tests vaccinaux. La visualisation d’une éventuelle protection contre *H. contortus* nous encouragerait à tester leur efficacité et à protéger également l'hôte contre les deux autres espèces de strongles gastro-intestinaux.

Ces études ont donc été menées dans un premier temps sur les candidats qui nous paraissaient les plus pertinents. Néanmoins, les autres candidats, notamment ceux dont la fonction n’est pas encore connue, restent de potentielles pistes à étudier. Les mêmes approches seront développées sur ces candidats afin d'étudier leur implication dans le parasitisme.

Toutes ces données nous permettent donc de comprendre un peu plus en détail les mécanismes mis en place par le nématode afin d’échapper au système immunitaire de l’hôte et donc de réussir à le parasiter. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes, avec la découverte de nouveaux candidats impliqués dans le parasitisme, pour la mise au point de nouvelles méthodes de lutte afin de pallier aux problèmes de résistance aux anthelminthiques.

# Quatrième partie

# Matériels et Méthodes

# VI Matériels et methodes.

## 1. Matériels biologiques.

### a. Extraction des œufs.

Les matières fécales de moutons infestés émises depuis moins de deux heures sont délitées dans l'eau à 15°C pendant 15 minutes. Le mélange est versé sur trois tamis de mailles décroissantes : 2mm, 125µm et 20µm. Les œufs sont récupérés sur le tamis de 20µm puis centrifugé 10 minutes à 2000g. Le culot est repris dans 45ml d'une solution de sulfate de magnésium d'une densité de 1,8. La suspension obtenue est alors centrifugée à 2000g pendant 4 minutes. Le surnageant est récupéré dans une solution de sucrose à (30%, 4°C) et centrifugé à 2000g pendant 2 minutes. Les œufs sont récupérés en surface et dilués dans 45ml d'eau stérile. La dilution est centrifugée à 2000g à 4°C pendant 3 minutes et le culot est repris dans 50µl d'eau puis conservé à -80°C.

### b. Récupération des larves L3 et xL3.

Les matières fécales contenant les œufs de parasites sont placées dans des bacs maintenus dans des chambres de culture aux températures de 20-23°C avec un taux d'humidité de 60 à 80% pendant 10 jours environ. Les œufs évoluent ainsi en larves infestantes (stade L3). La technique de Baerman qui permet d'extraire ces larves des fèces est ensuite réalisée (Rossanigo & Gruner, 1991). Les matières fécales sont placées dans l'eau sur un support (grille) avec un papier filtre pendant 24 à 48 heures afin que les larves infestantes migrent par géotropisme. Les larves sont récupérées dans un tube à hémolyse puis sont dégainées artificiellement dans une solution d'hypochlorite avec concentration finale de 0.16% pendant 30 minutes. Les larves L3 dégainées (xL3) sont ensuite rincées avec du PBS 1X et congelées à -80°C.

### c. Récupération des larves L4 et adultes.

Des moutons sont infestés avec une dose de 10000 larves infestantes (larves L3) d'*H. contortus* de la souche ISE (Roos *et al.*, 2004). Les animaux sont abattus au bout de 5, 10 et 28 jours après infestation. Après l'abattage, la caillette est rapidement prélevée puis rincée afin de collecter les parasites manuellement. On récupère donc les stades à 5 jours après infestations, 1à jours après infestation mâles et femelles et les stades adultes mâles et femelles.

### d. Récupération du mucus.

Après autopsie du mouton, la caillette est extraite puis lavée à l'eau claire. La muqueuse est ensuite grattée avec une lame de verre au niveau fundique et pylorique. En fonction du volume de mucus récupéré, 1 volume de PBS est ajouté puis broyé à l'aide d'un sonicateur pendant 1 minute. Le tout est centrifugé pendant 15 minutes à 4000g. Le surnageant est récupéré et stocké à -20°C.

### e. Récupération des ganglions lymphatiques abomasaux.

Lors de l'autopsie, les ganglions lymphatiques sont récoltés et mis dans une solution de RPMI, SVF 10% et streptomycine/penicilline 1%. Les ganglions sont piqués à l'aide d'une seringue afin de rejeter dans le milieu extérieur les anticorps présents au niveau des nœuds lymphatiques. Les milieux sont mis en culture pendant 2 jours dans une étuve à 37°C et 5% de $CO_2$. Une centrifugation de 15 minutes à 4000g est alors réalisée afin de récupérer le surnageant. Un volume égal de sulfate d'ammonium est ajouté et le mélange est incubé 4 heures à 4°C sous agitation. Le culot est obtenu après une centrifugation de 15 minutes à 9000g puis est resuspendu dans 2 ml de PBS. Une dialyse est ensuite réalisée avec du PBS via le système Slide-A-Lyzer Dialysys® Cassettes (Thermo Scientific).

### f. Récupération des sera.

Une prise de sang sur tube sec est réalisée au niveau de la jugulaire du mouton. Le tube est laissé 1h à température ambiante puis 1h à 4°C. Une centrifugation est ensuite réalisée pendant 10 minutes à 3000 rpm. Le surnageant est récupéré et stocké à -20°C.

## 2. Manipulation des acides nucléiques.

### a. Extraction des ARN totaux.

Les ARN totaux sont extraits à partir des œufs, des larves L3, xL3, L4 (5dpi), L4 (10dpi mâles et femelles) et adultes mâles et femelles. Les différents stades sont broyés dans 50µl de TRIzol®. Après avoir complété le volume de TRIzol® à 1ml, l'homogénéisation de la solution est réalisée à l'aide d'une seringue de 5ml munie d'une aiguille de 0.8mm de diamètre par 10 cycles d'aspiration/refoulement. Après 5 minutes à température ambiante, 200µl de chloroforme sont ajoutés puis le tube est agité vigoureusement pendant 15 secondes. L'échantillon est ensuite laissé 3 minutes à température ambiante puis centrifugé à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse est récupérée, et les ARN totaux sont précipités avec 500µl d'isopropanol puis culottés par centrifugation à 12000g pendant 10 minutes à 4°C.

Après élimination du surnageant, le culot d'ARN totaux est lavé avec 1ml d'éthanol 75% et centrifugé à 7500g pendant 5min à 4°C. Une fois le surnageant éliminé, le culot est séché à température ambiante. Les ARN ainsi purifiés sont resuspendus dans 50µl de RNAsecure™ (Ambion) et sont chauffés pendant 10 minutes à 60°C afin d'éliminer toute trace de RNases.

### b. Dosage des ARN.

Le dosage des ARN totaux se fait par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 260nm. Une unité de densité optique correspond à environ 40µg d'ARN/ml. La qualité des ARN est évaluée par le rapport d'absorbance $A_{260/280}$, qui informe sur une éventuelle contamination protéique.

## 3. Hybridation Suppressive Soustractive (SSH).

La technique d'hybridation suppressive soustractive permet de comparer deux populations d'ARNm. Dans notre étude, cette technique a pour objectif de sélectionner des clones correspondant à des gènes dont la transcription est stimulée lors du passage de la phase libre ou pré-parasitaire à la phase parasitaire. (**cf figure n°28**) Après rétro-transcription des ARNm en ADNc, les ADNc dénaturés des deux populations sont mélangés (population testée « tester » et population contrôle « driver »), afin que s'hybrident les séquences communes aux deux échantillons. Une fois les séquences double brin éliminées, les ADNc demeurant non hybridés correspondent aux gènes qui sont exprimés soit en plus grande quantité, soit spécifiquement dans la population d'ARNm testée. Ces gènes sont alors sélectionnés par PCR grâce à un jeu d'amorces spécifiques, et analysés. L'hybridation suppressive soustractive est réalisée selon le protocole du kit PCR-Select cDNA Subtraction (Clontech) avec des modifications qui vont être décrites dans le paragraphe suivant.

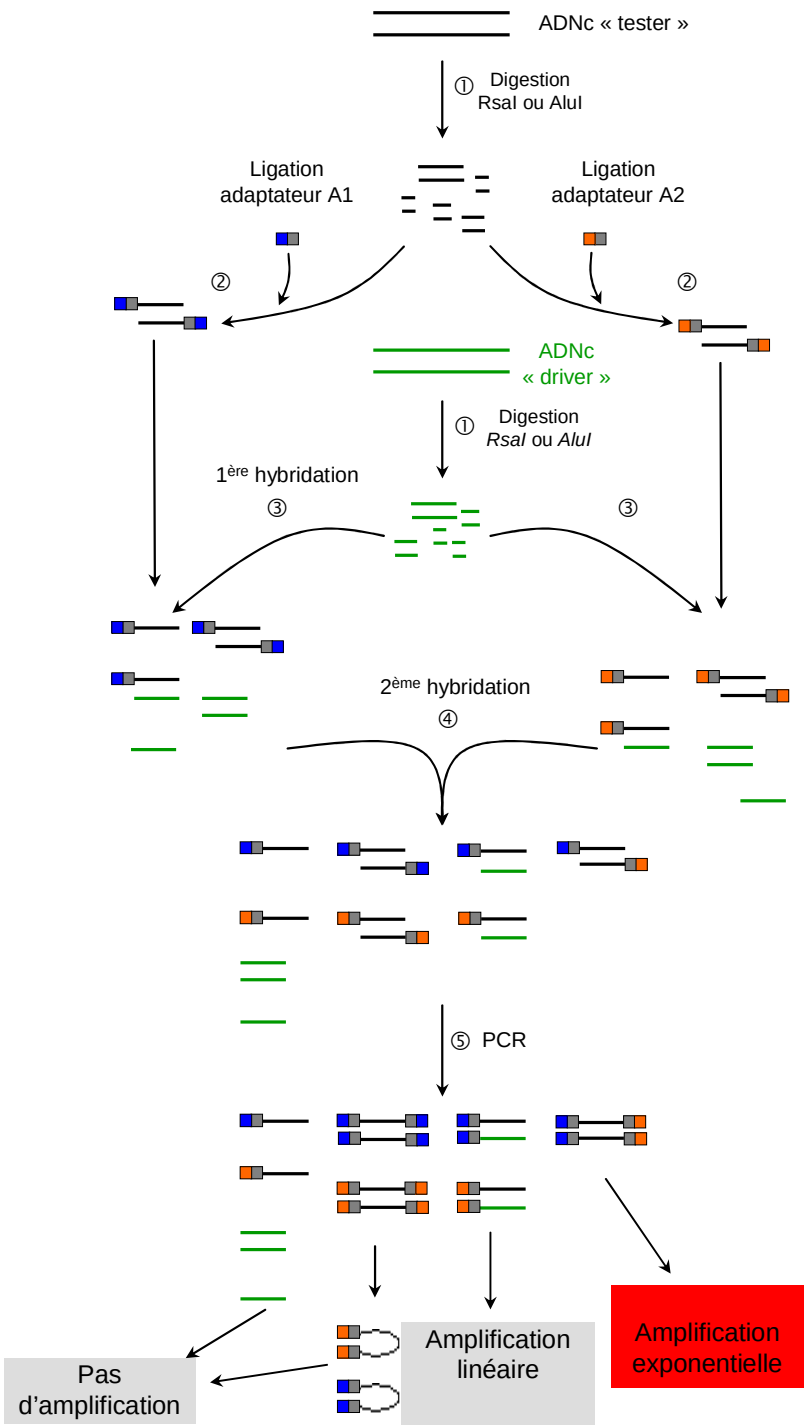



**Figure n°28 : Représentation schématique de la technique SSH.**

*Représentation de toutes les étapes nécessaires à la réalisation de la technique SSH 1 : digestion des ADNc double brin par l'enzyme de restriction RsaI ou AluI, 2 : ligation des adaptateurs, 3 : 1ère hybridation avec dénaturation au préalable, 4 : 2ème hybridation sans dénaturation, 5 : amplification par PCR.*

### a. Synthèse des ADNc.

Les brins complémentaires des ARNm sont synthétisés selon le protocole du kit « First strand cDNA synthesis KIT » (Invitrogen). La synthèse est réalisée à l'aide de la reverse transcriptase SUPERSCRIPT$^{TM}$ III (40U/µg d'ARN) ( Invitrogen) à partir de 5µg d'ARN totaux, en utilisant 1µl d'amorce Oligo(dT)VN (Invitrogen) à 500ng/µl (**cf annexe n°1**) pendant 1h30 à 50°C dans un volume réactionnel final de 20µl. La reverse transcriptase est ensuite inactivée à 70°C pendant 15min. L'amorce Oligo(dT)VN possède en 5' les sites d'enzymes de restriction *RsaI* et *AluI*.

### b. Amplification des ADNc.

Pour chaque réaction, 10ng d'ADNc sont amplifiés dans un volume réactionnel de 20µl contenant 1U de GoTaq® DNA polymérase (Proméga), du tampon GoTaq® 1X Colorless Flexi Buffer, 5mM de chaque désoxynucléotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1,5mM de $MgCl_2$ et 10pmoles de l'amorce SL1 (Spliced Leader 1) ou SL2 (Spliced Leader 2) qui correspond à une séquence d'épissage alternatif présente sur , 75 à 85% des transcrits des nématodes en fonction des espèces (Guiliano et Blaxter, 2006) et de l'amorce OUT définie à partir du site de la séquence d'ancrage ajouté après l'oligo-dT utilisé pour la synthèse du 1$^{er}$ brin d'ADNc. (**cf annexe n°1**). La PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur TRIO-thermoblock$^{TM}$ T3000 (Biometra). Le cycle de PCR programmé est le suivant : dénaturation initiale pendant 3 minutes à 94°C puis 30 cycles de 45 secondes à 94°C, hybridation des amorces à 55°C pendant 45 secondes et 2 minutes d'élongation à 72°C et une élongation finale de 72°C pendant 7 minutes. Les produits de PCR sont visualisés sur gel d'agarose à 1.5%.

### c. Préparation des ADNc pour la soustraction.

Les ADNc nouvellement synthétisés des populations testées et contrôles sont d'abord digérés par *RsaI*, 15 unités/µl (Roche Diagnostics, GmbH) ou par *Alu*I, 15 unités/µl (Roche Diagnostics, GmbH) dans leur tampon de digestion et dans un volume final de 50µl. La digestion est réalisée pendant 2 heures à 37°C. L'enzyme est inactivée à 65°C pendant 15 minutes. Ces digestions génèrent des fragments d'ADNc à bouts francs, qui sont ensuite purifiés par passage sur colonne avec le kit « MinElute® Reaction Cleanup Kit » (Qiagen). Les ADNc sont repris dans 10µl d'eau stérile.

### d. Ligation des adaptateurs.

L'étape suivante est la ligation des adaptateurs en 5' des ADNc testés. Ces adaptateurs sont de deux types, nommés A1 et A2. Les ADNc testés sont répartis en deux portions, chacune

étant mise en ligation avec un type d'adaptateur, créant deux populations d'ADNc testées. La partie de séquence des deux adaptateurs identique est indispensable à l'hybridation de l'amorce de PCR lors de la soustraction. Les ADNc sont, à cette étape, prêts pour l'hybridation soustractive.

La réaction est effectuée dans un volume final de 10µl contenant 50 unités de T4 DNA Ligase (Ozyme), 2µM d'adaptateur A1 ou A2 (**cf figure n°28**) et 100ng de la population ADNc testée. Un tube témoin est réalisé en mélangeant les populations testées A1 et A2. Les tubes sont incubés toute la nuit à 16°C. La ligase est inactivée en chauffant 10 minutes à 70°C.

### e. Hybridation soustractive.

Deux hybridations sont alors réalisées **(cf figure n°28)**. Pour la première hybridation, un excès de la population ADNc contrôle est ajouté à chaque échantillon d'ADNc testé ; les échantillons sont ensuite dénaturés par la chaleur à 98°C pendant 1,30min et hybridés à 68°C pendant 8 heures. La réaction est réalisée dans un volume final de 20µl en tampon d'hybridation 4X (50mM Hepes pH 8,3; 0,5M NaCl ; 0,02mM EDTA pH 8 ; 10%PEG 8000). Les ADNc différentiellement exprimés, faiblement représentés dans le milieu, restent sous forme simple brin, ce qui permet un enrichissement relatif de ces séquences. La seconde hybridation a lieu pendant une nuit à 68°C, les deux échantillons de la première hybridation sont mélangés sans dénaturation préalable, permettant l'association entre eux des ADNc testés simple brin. De cette étape, en résultent des molécules doubles brins spécifiques du lot d'ADNc testés, dont les terminaisons, simple brin, diffèrent de par la présence des deux types d'adaptateurs A1 et A2. Ces terminaisons sont mises sous forme double brin par l'action de la DNA polymérase.

### f. Amplification par PCR.

Des PCR nichées sont réalisées avec des amorces spécifiques des séquences des deux adaptateurs. Les séquences sans adaptateurs (homo-hybride contrôle/contrôle) ne sont donc pas amplifiées. Les hétéro-hybrides (testée/contrôle) sont amplifiées de façon linéaire. Les homo-hybrides (testée1/testée1 et testée2/testée2) tombent sous l'effet suppresseur de la PCR due à la présence de séquences complémentaires aux deux extrémités des ADNc. Seul les hétéro-hybrides (testée1/testée2) sont amplifiés exponentiellement.

La première PCR est effectuée à partir d'1µl de chaque soustraction dans un volume réactionnel de 20µl contenant 1U de GoTaq®, 5µM de chaque dNTP, 1,5mM de $MgCl_2$ et 1µM de l'amorce P1 (séquence similaire aux deux adaptateurs) **(cf annexe n°2)**. Les conditions d'amplification sont : 10 minutes à 70°C, 3 minutes à 94°C puis 34 cycles de 45 secondes à

95°C, 45 secondes à 66°C et 1 minute 30 à 72°C. Une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes. Ces produits d'amplification (1µl) sont utilisés comme matrice pour la seconde PCR réalisée avec 1µM des amorces PN1 et PN2 (spécifiques de chaque adaptateur). **(cf figure n°29)**. Les conditions sont identiques mise à part la température d'hybridation qui est à 68°C. Les produits PCR sont visualisés par migration sur gel d'agarose 1%.

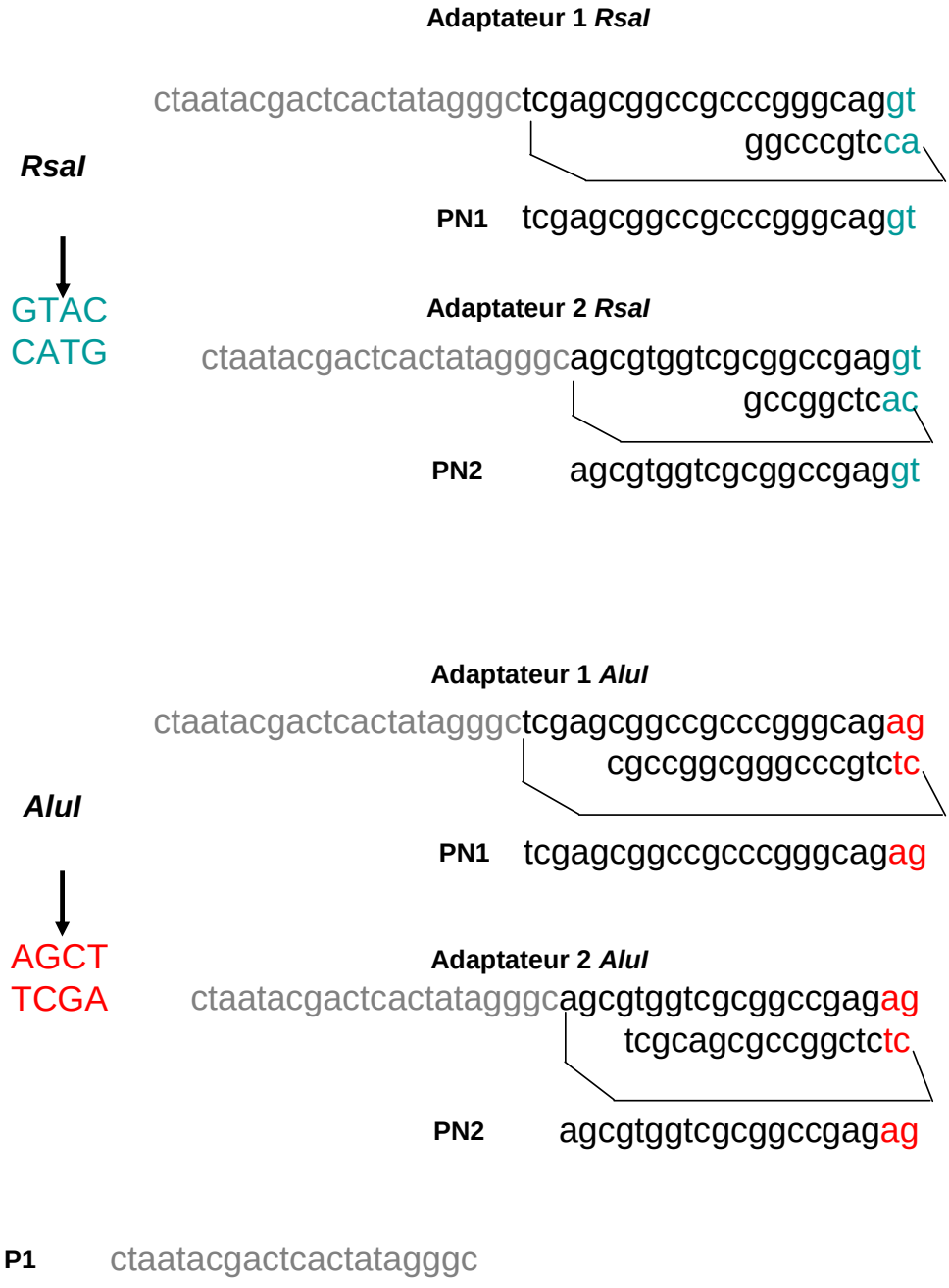



**Figure n°29 : Représentation du jeu d'amorces lors de la réalisation de la technique SSH.**

## 4. Clonage moléculaire.

### a. Ligation.

Les ADNc sélectionnés par hybridation suppressive soustractive sont purifiés à l'aide du kit « MinElute Reaction cleanup » (Qiagen). Ils sont ensuite ligués dans le vecteur plasmidique pGEM-T en utilisant le kit « pGEM-T Vector Systems » (Promega). La ligation est effectuée dans un volume total de 5µl contenant 25ng de vecteur, 1,5U de T4 DNA ligase (Promega), du tampon de ligation 2X rapid ligation buffer (Promega) et l'insert dans un rapport molaire insert/vecteur de 3/1. La réaction se déroule à 4°C pendant 16 heures.

### b. Transformation bactérienne.

Les bactéries utilisées sont des *Escherichia coli* souche DG1 (Invitrogen) thermocompétentes. Après décongélation des bactéries compétentes, 50 µl sont mélangés au produit de ligation et incubés dans la glace pendant 15 minutes. Le choc thermique est ensuite réalisé en incubant les bactéries à 42°C pendant 1 minute 30 pour être ensuite remis dans la glace pendant 1 minute. Les bactéries sont mises en culture dans 700µl de milieu LB liquide pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Deux cent microlitres de milieu bactérien sont ensuite étalés sur des boîtes de milieu LB additionné d'ampicilline (100µg/L) et contenant 40µg/ml d'X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside) et 0,1mM d'IPTG (isopropyl β D-thiogalactoside) et incubés sur la nuit à 37°C afin de sélectionner les colonies transformées par un plasmide. La présence de l'insert est contrôlée par PCR en utilisant des amorces flanquantes localisées sur le plasmide **(cf annexe n°1).**

## 5. Criblage par dot blot.

### a. Transfert des colonies et fixation de l'ADN.

Chaque clone issu des banques soustraites est repiqué deux fois sur gélose LB contenant de l'ampicilline (100µg/l). Un témoin négatif est également repiqué, il s'agit d'un clone possédant un fragment de gène de ménage *gapdh*. Les cultures gélosées sont incubées à 37°C sur la nuit.

Une membrane de nitrocellulose (Hybond N+, Amersham) est déposée sur les colonies pendant 1 minute. La membrane est ensuite placée face opposée aux colonies sur papier Whatman imbibé de solution dénaturante (1,5M NaCl ; 0,5N NaOH) pendant 4 minutes. Après dénaturation, la membrane est rapidement séchée sur papier Whatman puis placée face opposée aux colonies sur papier Whatman imbibé de solution de neutralisation (1,5M NaCl ; 0,5M Tris-

HCl pH8) pendant 3 minutes. Elle est de nouveau séchée rapidement puis lavée avec du tampon 2X SSC pendant 1 minute.

### b. Marquage des sondes.

Les sondes correspondent soit à une sous population d'ADNc issus de la soustraction des ADNc du stade L4 (5 jours après infestation) par ceux du stade L3 (soustraction L4/L3) soit aux ADNc du stade L3 (ADNc non soustrait).

Les sondes issues de la soustraction L4/L3 ont été obtenues par PCR nichée. Une étape de digestion par *RsaI* ou *AluI* a été effectuée pour éliminer les adaptateurs présents aux extrémités des ADNc et ce afin d'éliminer le bruit de fond. Les sondes d'ADNc ont ensuite été dosées et 1µg de chaque sonde est marqué à la digoxygénine en utilisant le kit « Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II » (Roche Diagnostics, GmbH). Les sondes ainsi marquées sont dosées puis diluées pour obtenir une concentration finale de 25ng/ml dans un volume final de 50µl.

### c. Hybridation des membranes, lavages et détection.

Les membranes sont hybridées selon le protocole « Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II » (roche Diagnostics, GmbH). Brièvement, les membranes sont préhybridées dans une solution « DIG Easy Hyb » (Roche) pendant 30 minutes à 50°C dans un four à hybridation. Les sondes sont dénaturées par ébullition et sont ajoutées à une solution fraîche d'hybridation pour une hybridation sur la nuit à 50°C sous agitation constante. Les membranes sont ensuite lavées avec une solution de faible stringence (2 fois 5 minutes avec 2X SSC, 0,1% SDS à température ambiante) puis avec une solution de haute stringence (2 fois 15 minutes avec 0,5X SSC, 0,1% SDS 65°C). Les membranes sont révélées selon le protocole « DIG wash and Block Buffer Set » (Roche). Elles sont incubées avec une solution de blocage pendant 30 minutes avant de les mettre en contact avec l'anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/10000 pendant 30 minutes à 37°C. La révélation des membranes est effectuée par chimioluminescence en chambre noire. La réaction de chimioluminescence est activée par l'ajout de CSPD (3-(4-methoxyspirol[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricycle[3.3.1.1(3,7)]decan]-4-yl)). Après 10 minutes d'incubation à 37°C, les membranes sont exposées à des films autoradiographiques « KODAK® BioMax Light Film ».

## 6. Identification des ADNc complets.

### a. 3’ RACE PCR.

La technique d’amplification PCR de type 3’ RACE permet d’isoler l’extrémité 3’ d’ADNc correspondant à des ARN même faiblement exprimés. Elle consiste à créer, à l’une des extrémités de l’ADNc, un point d’ancrage artificiel permettant une amplification avec une amorce interne de l’ADNc **(cf figure n°30)** et une amorce correspondant au site d’ancrage.

Les réactions de 3’RACE ont été réalisées à l’aide du kit « GeneRacer » (Invitrogen). Les ADNc premiers brins sont synthétisés à partir d’ARN totaux (5µg) en utilisant 1µl d’amorce interne au gène étudié en association avec l’amorce externe OUT ou IN située sur l’oligo(dT)VN **(cf annexe n°1)**.

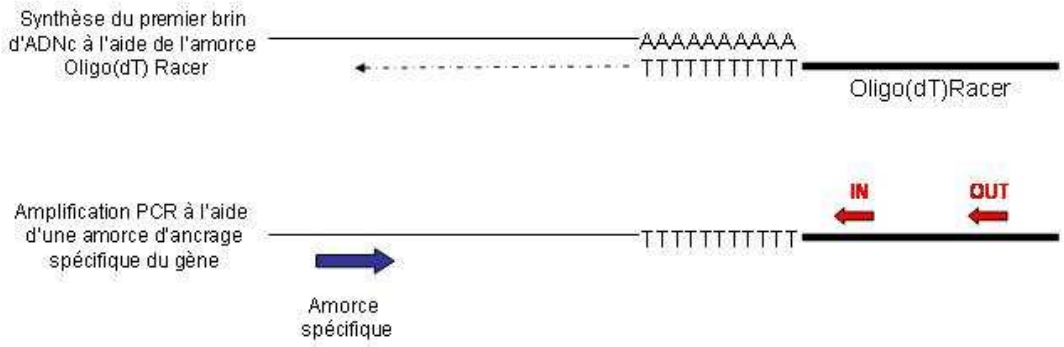



**Figure n°30 : Représentation schématique de la technique 3’RACE.**

### b. SL1-PCR.

Les réactions de 5’-PCR ont été réalisées à l’aide de la séquence SL1 (Spliced Leader 1), qui est une séquence d’épissage alternatif que l’on retrouve sur de nombreux gènes de nématode (Guiliano et Blaxter, 2006) en association avec des amorces internes des gènes d’intérêts étudiés **(cf annexe n°3)**. Les conditions d’amplification sont les mêmes que celles décrite II.3.b.

## 7. Séquençage et analyse des séquences nucléotidiques et protéiques.

Le séquençage des inserts est réalisé à l’aide d’un séquenceur automatique par la société GATC Biotech (Marseille, France). Le programme de recherche BLAST est utilisé pour effectuer les comparaisons dans les banques de données génomiques, d’ESTs (blastn) et

protéiques au Centre National d'Informations sur la Biotechnologie (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Les alignements de séquences contiguës sont effectués à l'aide du logiciel CAP3 (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php). La traduction des séquences nucléotidiques a été réalisée à l'aide du logiciel Translator (http://www.fr33.net/translator.php). Les alignements de séquences multiples sont réalisés à l'aide du logiciel Multalin sur le site de l'INRA de Toulouse (http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/). L'estimation de masse moléculaire de la protéine a été réalisée à l'aide du logiciel Compute pI/Mw tool http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html. La recherche de la présence et l'emplacement du peptide signal de sécrétion des protéines a été réalisée avec le logiciel SignalP 3.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). La recherche de domaine protéique conservé a été effectuée à l'aide du programme PFAM (http://pfam.sanger.ac.uk/search) ou SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/). La recherche de famille multigénique a été effectuée à l'aide du programme (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/h_contortus). .

## 8. Production de protéines recombinantes.

### a. Vecteur d'expression en bactérie.

Les ADNc codant les protéines étudiées ont été introduits dans le vecteur pET-22b(+) (Novagen) (**cf figure n°31**).

Ce vecteur permet d'exprimer la protéine d'intérêt en fusion avec une séquence de six histidines à l'extrémité C-terminale. La séquence polyhistidine permet la purification sur colonne de nickel. Le vecteur a été introduit par choc thermique (cf II.4.b) dans la souche BL21 (DE3) d'*Escherichia coli*. C'est une souche classique pour l'expression de gènes sous contrôle du promoteur T7.

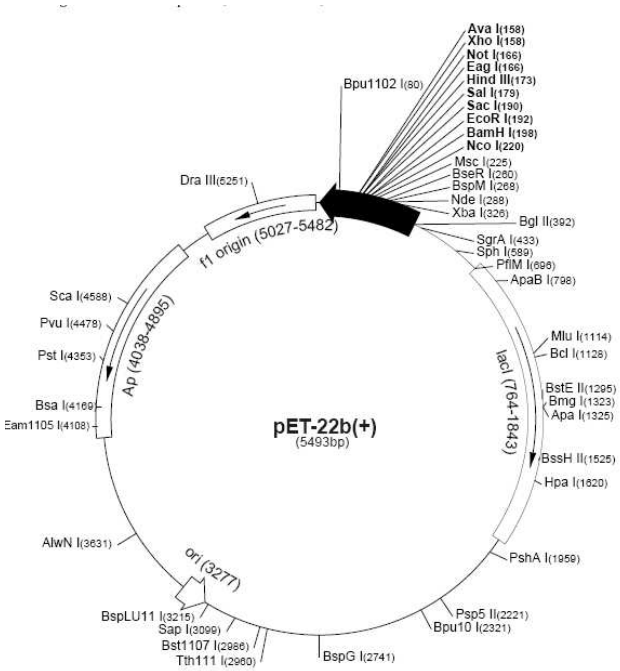



**Figure n°31 : Carte du vecteur pET-22b(+) de chez Novagène**

## b. Amplification et purification des plasmides.

Les inserts ont été obtenus par PCR (cf II.3.b) avec des amorces spécifiques de chaque gène d'intérêt. Les amorces possèdent les sites d'enzyme de restriction *NdeI* en 5' pour l'amorce sens et *NotI* en 3' pour l'amorce anti-sens **(cf annexen °5)**. L'insertion du fragment d'intérêt entre ces deux sites de restriction permet d'enlever le signal pelB leader qui est un signal d'adressage au périplasme.

L'insert a d'abord été introduit dans le vecteur pGEM-T Vector Systems (Promega) puis transformé dans des bactéries DG1 (cf II.4). Le plasmide a ensuite été purifié sur colonne avec le kit QIAprep® Miniprep (Qiagen).

Le vecteur pET22b(+) ainsi que les inserts sont digérés par *NdeI* (15 unités/µl) (Promega) et par *Not I* (15 unités/µl) (Promega) dans leur tampon de digestion pendant 3h à 37°C dans un volume final de 50µl. La ligation entre le vecteur et les inserts digérés est effectuée dans un volume total de 5µl contenant 25ng de vecteur, 1,5 U de T4 DNA ligase, du tampon de ligation 2X rapid ligation buffer et l'insert dans un rapport molaire insert/vecteur de 3/1. La réaction se déroule à 4°C pendant 16 heures.

## c. Transformation bactérienne.

Les bactéries utilisées sont des *Escherichia coli* de souche Bl21 (DE3) pLysS (Lucigen) (Invitrogen) thermocompétentes. Après décongélation des bactéries compétentes, 50µl sont

mélangés au produit de ligation et incubées dans la glace pendant 15 minutes. Le choc thermique est ensuite réalisé en incubant le tube à 42°C pendant 1 minute 30 puis remis dans la glace pendant 1 minute. Les bactéries sont mises en culture dans 700µl de milieu LB liquide pendant 1h à 37°C sous agitation. Deux cent microlitres de milieu bactérien sont ensuite étalés sur des boîtes de milieu LB additionné d'ampicilline (100µg/L) et incubées sur la nuit à 37°C. Les colonies positives sont vérifiées par PCR en utilisant les amorces spécifiques des gènes étudiés. **(cf annexe).**

## 9. Expression des protéines recombinantes.

Une pré-culture est réalisée à partir des clones positifs. Pour cela, un clone positif est mis dans 10ml de LB additionné d'ampicilline à 100µg/ml et incubé toute la nuit à 37° sous agitation constante. Des cultures de 500ml de milieu LB additionné d'ampicilline à 100µg/ml ont été ensemencées par 5ml de ces pré-cultures et placées à 37°C avec une agitation de 500 rpm. Lorsque la DO atteint 0,5-0,6, l'induction de la production de protéines recombinantes est réalisée avec 1mM d'IPTG pendant 5h à 37°C sous agitation à 500 rpm.

### a. Purification des protéines de fusion.

Les cultures sont centrifugées à 4°C pendant 10 minutes à 16000g. Les culots bactériens sont resuspendus dans 100 µL de tampon de charge (20 % Glycérol (v/v), 4 % SDS (m/v), 0,0001 % bleu de bromophénol (m/v) et 0,2 % bêta-mercaptoéthanol) et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse sur gel SDS-PAGE.

Les culots bactériens ont également été lysés par la solution BugBuster (Novagen). Pour cela 100µl de solution est ajouté au culot de 1 ml de culture et incubé 1 heure sous agitation constante à température ambiante. Une centrifugation de 30 minutes à 16000g à 4°C est réalisée afin de séparer les phases solubles et non solubles.

La phase soluble est purifiée selon les recommandations du au kit « Vivapure mini et maxiprepMC » (Sartorius).

L'extrait protéique total, la phase soluble et la phase non soluble ont ensuite été étudiés sur gel SDS-PAGE.

### b. Electrophorèse en condition dénaturante sur gel de polyacrylamide.

Les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15% en présence de SDS (SDS-PAGE 15%). Le gel de séparation est composé d'acrylamide 40% (v/v), bis-acrylamide 5% (v/v), Tris-HCl 1,5M à pH 8.8, SDS 0,1% (v/v), TEMED 0,1% (v/v) et persulfate d'ammonium 0,1% (m/v). Le gel de concentration est composé d'acrylamide 40%

(v/v), bis-acrylamide 0,5% (v/v), Tris-HCl 0,5 M à pH 6,8, SDS 0,1% (v/v), TEMED 0,1% (v/v) et persulfate d'ammonium 0,1% (m/v). La migration est effectuée dans du tampon migration (Tris 2mM, glycine 0,192M, SDS 0,1% (m/v)) à 150V. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le Broad-Way Prestained Protein Marker (iNtRON Biotechnology).

### c. Coloration au bleu de Coomassie.

Le gel est incubé dans une solution de bleu de Coomassie (50% méthanol, 10% acide acétique et 0,1% de bleu de Coomassie brillant R250) pendant 1heure. Le gel est ensuite transféré dans des bains successifs de décoloration (10% de méthanol, 20% d'acide acétique) afin de visualiser la présence ou non des protéines recombinantes.

### d. Western blot.

Les gels SDS-PAGE obtenus sont transférés sur une membrane de PVDF (Hybond-P, Amersham, Biosciences). Les transferts sont effectués dans les cuves Biorad. La membrane est préalablement humidifiée dans le tampon de transfert (25mM Tris base, 0,2M glycine, 20% éthanol, pH 8,5). Le transfert est réalisé en chambre froide à un voltage constant de 100V pendant 1 heure. La membrane est ensuite séchée 30 min à 37°C pour fixer les protéines et réduire le bruit de fond.

#### *i. Révélation de la production des protéines recombinantes par un anticorps anti-HIS.*

La membrane est saturée sur la nuit en agitation constante à température ambiante avec une solution de blocage TBS (Tris-base 0,01M, NaCl 0,13M), Tween 0,1% (Sigma), BSA 3% (Sigma). La membrane est ensuite lavée 5 minutes dans du tampon TBS-Tween 0,1% pendant 5 minutes sous agitation puis incubée 1 heure sous agitation avec un anticorps monoclonal de souris spécifiques des motifs 6-histidines (Eurogentec, ref. MMS-156P) dilué au 1/20000 dans 10 mL de TBS-Tween 0,1%, BSA 1%, puis lavée 3 fois successivement pendant 5 min dans du TBS-tween 0,1 %. La membrane est ensuite incubée 2h sous agitation avec un anticorps anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxydase (Sigma, ref. A4416) dilué au 1/10000 puis lavée 3 fois successivement pendant 5 min dans du TBS-tween 0,1 %.

La révélation des protéines reconnues par l'anticorps 6-His a été effectuée à l'aide du kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) selon les instructions du fournisseur. Les « stable peroxyde solution » et « luminol enhancer solution » sont mélangées en quantité égale. Le mélange est déposé sur la membrane à raison de 60 µL/cm$^2$ de membrane. Le mélange contient du luminol qui, en présence de $H_2O_2$, va émettre des photons après

transformation par la peroxydase. Cette émission de photons est captée par la caméra CCD d'un appareil à chemoluminescence, Chemi-Smart 5000 (Vilber Lourmat).

*ii. Révélation de l'immunogénicité des protéines recombinantes.*

Après migration des protéines sur un gel à 15% puis transfert, la membrane est saturée sur la nuit en agitation constante à température ambiante avec une solution de blocage TBS (Tris-base 0,01M, NaCl 0,13M), Tween 0,1% (Sigma), BSA 3% (Sigma). La membrane est ensuite lavée 5 minutes dans du tampon TBS-Tween 0,1% pendant 5 minutes sous agitation puis incubée 1 heure sous agitation avec du sérum de moutons infestés, ou du mucus de moutons infestés, ou des anticorps récupérés au niveau des nœuds abomasaux. Toutes ces solutions correspondent à l'anticorps primaire et seront diluées au 1/100 dans 10 ml de TBS-T (0,1%). La membrane est ensuite lavée 3 fois successivement pendant 5 minutes dans du TBS-T (0,1%) puis incubée pendant 2h sous agitation constante à température ambiante avec un anticorps anti-mouton couplée à la peroxydase dilué au 1/10000 dans du tampon TBS-T (0,1%). La membrane est ensuite lavée dans 3 bains successifs de 5 minutes dans du tampon TBS-T (0,1%) puis révélée de manière identique avec le kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) (cf II.9.d.ii).

## 10. Essai de vaccination.

Les protéines recombinantes pour l'évaluation des essais de vaccination ont été réalisées selon la technique de Rothel *et al* (Rothel *et al.*, 1997) avec quelques modifications. Brièvement, 1 ml de culture bactérienne induite pour chaque protéine recombinante réalisée (cf II.8.a) est culoté par centrifugation puis les cellules sont re-suspendues dans 1ml de 50mM de tampon borate, pH 9, 2mM EDTA, 1mM DTT et 9M urée. Les protéines sont solubilisées par rotation à température ambiante pendant 45 minutes. Les protéines insolubles sont ensuite enlevées par filtration grâce à un filtre 0,2µM. Avant la vaccination les protéines sont diluées au 1/10$^{ème}$ afin d'obtenir une concentration finale de 0,9M d'urée et 0,1 mM de DTT.

Les essais de vaccination ont été réalisés sur trois groupes de moutons. Tous les moutons ont reçu 2 immunisations à 1 mois d'intervalle puis ils ont été infestés avec 15 000 larves L3 d'*H. contortus* 3 semaines plus tard. Les animaux ont été immunisés avec 50µg de protéines soit un total de 200µg par immunisation. Les antigènes ont été mélangés avec 1ml d'adjuvant de Freund complet pour la 1$^{ère}$ immunisation et 1ml d'adjuvant de Freund incomplet lors de la seconde immunisation. Le volume est ensuite ajusté à 2ml avec du PBS froid. Une prise de sang a été réalisée avant la première immunisation, 2 semaines plus tard, avant la

deuxième immunisation, avant l'infestation puis avant autopsie. Le sérum est stocké à -20°C. Les coproscopies sont réalisées après infestation afin de suivre la ponte des œufs.

Cette étude se réalisera sur 3 moutons.

Au mouton témoin, une solution bactéries bl21 sans plasmide de production a été administrée, supplémentée avec de l'adjuvant de Freund complet lors de la première injection et de l'adjuvant de Freund incomplet lors de la deuxième injection.

Un deuxième mouton a été infesté à deux reprise avec un mix des 4 protéines recombinantes (50µg chacune) sans adjuvant.

Le dernier mouton  a également été infesté avec un mix des 4 protéines recombinantes. Lors de la première injection, le mix était supplémenté avec de l'adjuvant de Freund complet et lors de la deuxième injection avec de l'adjuvant de Freund incomplet.

Tous les moutons ont ensuite été infestés 15 jours après la deuxième injection par 15000 larves L3 de la souche ISE d'*H. contortus* (Roos *et al.*, 2004). Le but est ensuite de réaliser au départ des coprocultures afin de visualiser le taux de développement des larves avant de réaliser le comptage des vers adultes après autopsie.

# ARTICLE

**A suite of genes expressed during transition to parasitism in the trichostrongylid parasitic nematode *Haemonchus contortus* encode secreted proteins conserved in *Teladorsagia circumcincta***

Alexia Delannoy-Normand, Jacques Cortet, Jacques Cabaret and Cédric Neveu.

French National Institute for Agricultural Research (INRA), UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France

Correspondance to Dr. Cédric NEVEU, PhD, INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France. Tel : +33 (0) 247427674; fax: +33 (0) 247427774;

e-mail: cedric.neveu@tours.inra.fr

**SUMMARY**

The control of gastro-intestinal nematodes remains largely based on anthelminthic treatments, however spreading of anthelmintic resistance has reduced their efficacy. The genes involved in the transition to parasitism could constitute targets of interest to develop alternative control strategies. In the trichostrongylid nematode *Haemonchus contortus*, we have used a SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) based approach to generate two distinct subtracted cDNA libraries specifically enriched in cDNA expressed during the early parasitic fourth stage larvae L4 (five days post infection). A total of 200 clones were subjected to dot blot experiments and 46 clones were selected for further characterization. The 46 corresponding expressed sequence tags (EST) were found to cluster into 9 contigs. The corresponding full-length cDNA were obtained for all candidates. The genes encoding potentially secreted proteins were investigated in more detail. RT-PCR experiments confirmed their specific expression or over-expression during the early parasitic phase of the nematode and search for homologs in the trichostrongylid species *T. circumcincta* was performed in order to investigate whether they may be novel cross-specific targets.

**Key words: *Haemonchus contortus, Teladorsagia circumcincta*, SSH, stage-specific, lipase, saposin-like protein, transthyretin-like protein, LON-1.**

## INTRODUCTION

Gastro-intestinal nematodes (GIN) have a major impact on health of small ruminants world-wide. Currently, the control of infections remains largely based on anthelmintic treatments, but increasing anthelmintic resistance (Gilleard, 2006; Sangster, 1999; Wolstenholme *et al.*, 2004) has reduced their efficacy. Moreover, consumer health and environmental concerns regarding the intensive use of nematicidal compounds have driven research efforts for the development of alternative sustainable approaches for the control of GIN populations. Among these approaches, vaccination appeared to be a promising solution (Bethony *et al.*, 2006; Knox *et al.*, 2003; Redmond & Knox, 2006; Smith, 1999).

Among the most pathogenic and prevalent GIN of small ruminants, the abomasal species *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta* share a similar life cycle including a free-living and a parasitic phase in a single host. Transition to parasitism occurs when the host ingests ensheathed infective third stage larvae (L3) while grazing. Then, L3s exsheath (XL3) and develop into fourth stage larvae (L4), fifth stage larvae (L5) and mature adult worms.

In sheep, it has been previously reported that successive drug-abbreviated infection with *H. contortus* is able to induce a protective immune response against *T. circumcincta* challenge (Stankiewicz *et al*., 2000). In that respect, the investigation of molecular events involved in the early phase of host-trichostrongylid parasite interaction could provide a basis of considerable value to identify genes encoding for potential protective antigens effective on developing nematodes from both species. Recently, transcriptomic as well as proteomic approaches led to the identification of genes and proteins specifically expressed during the early parasitic phase of *T. circumcincta* (Nisbet & Gasser, 2004; Nisbet *et al.*, 2007). In contrast, little is known about the molecular events involved in the establishment of *H. contortus* into its host (Nikolaou & Gasser, 2006). Previous studies have focused on transcription profiles of various developmental stages of *H. contortus* using expressed sequence tag data sets (Hoekstra *et al.*, 2000) or differential display strategy comparing transcripts from L3 and adult stage (Hartman *et al.*, 2001). However, gene expression modulation associated with the early stage of transition to parasitism still has to be investigated in this species.

Supressive Subtractive Hybridization (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1996) has been described as a very efficient method for stage or gender specific gene isolation in animal and plant parasitic nematodes (Cottee *et al.*, 2006; Datu *et al.*, 2008; Dubreuil *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Nisbet & Gasser, 2004). In contrast with large scale SSH expressed sequence tag

(EST) sequencing performed to decipher global transcriptomic changes associated with transition to parasitism, in the present study our objective was to identify a restrain number of genes allowing a more detailed characterization for each candidate. In that respect, we have generated two distinct subtracted cDNA libraries enriched in transcript specifically expressed in *H. contortus* L4 stage 5 days post infection (5dpi) and characterized the most abundantly represented genes in both libraries.

Here we report the identification of 9 *H. contortus* full length cDNA sequences among which 7 encode for potentially secreted proteins. For all candidates, the expression kinetics through the lifecycle of *H. contortus* was carried out using RT-PCR experiments confirming their specific expression or over-expression in parasitic stages. We have also identified in *T. circumcincta* homologous sequences highly similar to their *H. contortus* counterparts highlighting their interest as new common potential targets against both species

## MATERIALS AND METHODS

### Parasites

Investigations were performed on the *H. contortus* ISE strain (Roos *et al.*, 2004) and the *T. circumcincta* SORIN strain from the INRA collection.

For *H. contortus*, donor sheep were infected with 10,000 L3 larvae. L4 larvae were collected from the abomasum of sheep 5 days post infection (L4 5dpi). Immature males and females (L5 larvae) were collected 10 days post-infection (L5 10dpi). Adult nematodes (males and females) were collected from the abomasal mucosa of sheep 21 days post infection (21dpi). Eggs were isolated from faeces as described by Rossanigo & Gruner, (1991). *H. contortus* L3s were harvested from coproculture as described by Rossanigo & Gruner, (1995). Subsequently, L3s were artificially exsheathed (XL3) by exposure to 0.1% hypochlorite solution for 10 min. For *T. circumcincta,* adult nematodes were collected at 30 days post infection from the abomasal mucosa of sheep infected with 10,000 L3s.

All samples were immediately frozen in 50µl RNA later (Ambion) after harvesting.

### RNA extraction

For *H. contortus*, total RNA was extracted from 25µl of eggs, 400 L4 (larvae 5dpi), 200 immature males or females L5 larvae (10dpi), 10 adult males or 10 adult females respectively.

For *T. circumcincta*, total RNA was extracted from 50 adult worms (mixed sexes).

Frozen worms or eggs were homogenised in Trizol reagent (Invitrogen) and total RNA was isolated according to the manufacturer's recommendations. RNA pellets were dissolved in

50 µl of RNA secure resuspension solution (Ambion) and were DNase treated with the TURBO DNA-free kit (Ambion). RNA concentration was measured using a nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific).

**Reverse transcription**

First strand cDNA synthesis was performed with the superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) on 3µg of total RNA according to the manufacturer's instructions.

For SSH experiments, the reverse transcription reaction was carried out with an oligo (dT) primer containing both *Rsa*I and *Alu*I enzyme restriction sites (underlined): 5'AAGCAGTACGACGATATCCAACGAGCTGAGT(18)VN3' (V = A, C, or G; N = A, T, C, or G). For RT-PCR experiments the reverse transcription reaction was carried out with the oligo (dT)RACER primer (Invitrogen).

**Supressive subtractive hybridization**

SSH was performed as described by Diatchenko *et al*. (1996) with some modifications. Primer and adapter sequences used during the SSH experiments are reported in table 1. In brief, double strand cDNAs from L3 and L4 (5dpi) were obtained by PCR reaction. In a final volume of 20 µl, 100 ng of first strand cDNA, 0.5µM of the SL1 primer (5'GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG 3') and the 3R1 (5'CAGTACGACGATATCCAACGAG 3') specific primer, designed upon an anchor site of the oligo T primer, were added to 1.25 mM $MgCl_2$ (Promega), Taq buffer 1X (Promega), 250 µM each dNTP (Euromedex) and 1U GoTaq Polymerase (Promega). The reaction mixture was denatured by heating at 94 °C for 5 min, followed by 20 cycles of 94°C for 45 sec, 55°C for 45 sec, 72 °C for 95 sec. A final extension step was performed at 72°Cfor 5 min. The resulting double strand cDNAs were subjected to blunt-ended digestion by the restriction enzyme *Rsa*I and *Alu*I respectively. For each subtraction, two L4 (5dpi) "tester" cDNA populations were created separately by ligating supressive adapter: adap1*Rsa*I or adap2*Rsa*I supplementary to the blunt-ended *Rsa*I-digested cDNAs, or adap1*Alu*I or adap2*Alu*I supplementary to the blunt-ended A*lu*I-digested cDNAs respectively.

The two tester cDNA populations were hybridized with an excess of L3 "driver" cDNA (without adaptor) in separate tubes to remove common cDNA species. Then, the two samples were mixed and hybridized together. The L4 (5dpi) specific cDNA population was subjected to two rounds of PCR amplification. The first PCR reaction was carried out using the P1 primer

for 25 cycles for both *Rsa*I and *Alu*I libraries. The second PCR was performed with nested primers specific of *Rsa*I and *Alu*I libraries (PN1 *Rsa*I, PN2 *Rsa*I and PN1 *Alu*I, PN2 *Alu*I) during 15 cycles. The amplification products corresponding to *Rsa*I and *Alu*I cDNA libraries were separately cloned in pGEM-T Easy vector (Promega). DG1 chemically competent *Escherichia coli* cells (Eurogentec) were transformed with the resulting constructs and plated on Luria–Bertani (LB) medium supplemented with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-Dgalactopyranoside (X-gal; 100 μg/ml), isopropyl-beta-D thiogalactopyranoside (IPTG; 60 μg/ml) and ampicillin (100 μg/ml) and were grown at 37°C for 16 hrs.

**Dot blot analysis**

A hundred randomly selected white colonies from each *RsaI* and *AluI* subtracted library were dotted in duplicate on Hybond N+ nylon membranes (Amersham). Colonies were denatured by soaking the nylon membranes during 5 min in NaOH 0.5M, NaCl 1.5 M, neutralised in Tris HCl 0.5 M, EDTA 1mM, NaCl 1.5 M, pH 7.2 and rinsed in 2X SSPE. DNA fixation was carried out by baking the hybond N+ membrane at 80°C for 2hrs. The probes, corresponding to un-subtracted L3 larvae cDNAs or subtracted L4 larvae cDNAs, were prepared and subsequently detected using the DIG High Prime DNA Labelling and Detection starter Kit II (Roche) following the manufacturer's recommendations. In brief, the nylon membranes were pre-hybridized in the DIG Easy Hyb buffer (Roche) for 30 min at 42°C in a hybridization oven. The probes were denatured 5 min by boiling for 5 min and added to fresh hybridization mixes for 16hrs at 42°C. After hybridization, membranes were washed 2 times in a low stringency solution (5 min in 2X SSC, 0.1% SDS at room temperature) and 2 times with a high stringency solution (15 min in 0.5X SSC, 0.1% SDS at 65°C). The membranes were treated with a blocking solution for 30 min and anti-DIG alkaline phosphatase antibodies (1/10.000 dilution) were added during 30 min at 37°C. The membranes were washed before adding the chemiluminescent substrate disodium 3-(4-methoxyspirol[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricycle[3.3.1.1(3,7)]decan]-4-yl) phenyl phosphate for 10 min at 37°C. Membranes were exposed to X-ray Film (kodax) for 2 hrs. Selected clones were sequenced by GATC biotech (Konstanz, Germany). SSH EST sequences were organized with the Cap3 contig assembly program (Huang & Madan. 1999).

**Full length cDNA cloning in *H. contortus* and *T. circumcincta***

Full-length cDNA corresponding to each *H. contortus* SSH EST were isolated by PCR using *H. contortus* first strand cDNA as template. The 3' ends of cDNAs were isolated by 3'RACE PCR using the GeneRacer kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The 5' end of the cDNAs were obtained by using the nematode spliced-leader sequence SL1 in association with reverse primers designed in sequences isolated during 3' RACE experiments (primer sequences available upon request). Identification of 5' and 3' ends corresponding to each transcript were carried out using two rounds of nested PCR, in a final volume of 20 µl, containing 100 ng of first strand cDNA (or 1µl of 1/100 dilution of amplification product from the first round of PCR), 1 unit of GoTaq polymerase (Promega), 0.25 mM dNTPs each and 0.3 µM of each primer. The reaction mixture was denatured by heating at 94 °C for 5 min, followed by 33 cycles of 94°C for 45 sec, 52 to 56°C (depending on specific melting temperature of primers) for 45 sec, 72 °C for 95 sec. A final extension step was performed at 72°C during 5 min.

Homologous full-length cDNA sequences were sought in *T. circumcincta* as follow: the 3' and 5'ends of cDNAs were identified using *T. circumcincta* first strand cDNA as previously described for *H. contortus* with primers designed upon *T. circumcincta* EST sequences (CB043435.1, AM744611, AM744854) or upon *H. contortus* sequences when no matching *T. circumcincta* EST was available (primer sequences available upon request).

Amplification products were cloned in pGEM-T Easy vector (Promega) and sequenced by GATC biotech (Konstanz, Germany).

**Transcriptional analysis in different developmental stages of *H. contortus***

PCR were carried out on *H. contortus* first strand cDNA prepared from eggs, L3, XL3, L4 (5dpi), immature males and females L5 (10 dpi), adult males and adult females. PCR reactions were carried out as described previously with specific primers designed in full-length cDNA sequenced from each candidate gene. Primer sequences are available upon request. Sample normalization was assessed using GAPDH as the reference transcript. The PCR products were subjected to electrophoresis through a 1.5% agarose gel.

**Sequence analysis**

Protein databank searches were performed with the BLAST Network Service (NCBI, National Center for Biotechnology Information), using the BLASTX algorithm (Altschul *et*

*al*.1997). Signal peptide predictions were carried out using the SignalP program (Nielsen *et al.*, 1997) and conserved protein domains were predicted using the SMART program (Shultz *et al*. 1998). Multiple alignments were performed using the program Muscle with standard parameters (Edgar 2004) and edited using the GeneDoc program (http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html).

## RESULTS

### *Haemonchus contortus* SSH libraries

Two Suppressive Subtractive Hybridization libraries enriched in cDNA fragments from *H. contortus* L4 (5dpi) were obtained using *Rsa*I or *Alu*I restriction enzymes respectively.

For each library 100 clones were randomly selected and subjected to dot-blot analysis. Clones that specifically hybridized with subtracted L4 probe were selected for further characterization. In total, 17 and 29 clones representing respectively *Rsa*I and *Alu*I libraries were sequenced. These 46 SSH sequences were found to cluster into 9 contigs named (HcL4-1 to HcL4-9), Table 2).

### Identification and characterization of full length cDNAs

In order to get more information about the putative function of the differentially expressed genes, the full-length cDNAs sequences corresponding to each EST contig were obtained. Their accession numbers, characteristics and closest homologs are summarized in table 2. To evaluate their interest as a multispecific target, homologous cDNA sequences corresponding to each *H. contortus* candidate were searched for *T. circumcincta*. Full-length cDNA sequences corresponding to previously uncharacterized genes have been named using three letter prefix to identify the species of origin (*Hco*: *Haemonchus contortus* and *Tci*: *Teladorsagia circumcincta*).

### Hc-L4-1 encodes a transthyretin-like protein: Hco-TTL-1

The Hc-L4-1 deduced protein sequence harboured a transthyretin-like domain (pfam DUF290) (E value: 8.20e-62) shared by members of the nematode transthyretin-like (TTL) protein family.

In protein databank, highest similarities were found with the *Ostertagia ostertagi* TTL-1 protein (CAP45649.1), (E value 3e-58) and the *C. briggsae* TTR-51 protein (XP_002634232.1) (E value 2e-50). Full length cDNA corresponding to a homologous sequence of Hc-L4-1 was identified in *T. circumcincta*. The alignment of Hc-L4-1 deduced amino acid sequence with the

TTL sequences from *T. circumcincta* and *O. ostertagi* revealed a high degree of conservation of this protein family within trichostrongylid species with percentage identity ranging from 78 to 81% (figure 1). Hc-L4-1 and its homolog in *T. circumcincta* harboured signature motif of class I TTL as defined by Saverwyns *et al.* (Saverwyns *et al.* 2008). To maintain consistency with the current nomenclature of TTL sequences in other parasitic nematodes, Hc-L4-1 and its *T. circumcincta* counterpart were named *Hco-ttl-1* and *Tci-ttl-1* respectively.

**Hc-L4-2 encodes a saposin like protein: Hco-SLP-1**

Hc-L4-2 deduced protein harboured a saposin B domain (smart SM00741), (E value: 6.35e-07), that typified a family of lipid interacting proteins referred as saposin-like proteins (SAPLIPs). Protein databank searches identified one nematode saposin like protein showing significant similarities with the deduced amino acid sequence of Hc-L4-2: the *Ancylostoma caninum* SLP-1 protein (ABH88210.1), (E value: 6e-05). Protein sequence alignment indicated a poor overall conservation between the two strongylid SLP proteins with 35% identities and 54% similarities respectively (figure 2). Despite intensive search, the PCR approach failed to identify a homologous transcript in *T. circumcincta*. The *H. contortus* predicted protein corresponding to Hc-L4-2 was named Hco-SLP-1 based on its homology with the Aca-SLP-1 sequence.

**Hc-L4-3 encodes a SCP domain containing protein similar to the *C.elegans* LON-1 protein: Hco-LON-1**

Hc-L4-3 encode a putatively secreted protein containing a Sperm Coating Protein /Tpx-1/Ag5/Pr-1/Sc7 (SCP) motif (smart SM00198) shared by a protein superfamily referred as the cysteine rich secreted proteins: CRISP (Kratzschmar *et al*. 1996). Among this large protein family, the deduced amino acid sequence of Hc-L4-3 was found to be highly similar to the *C. elegans* LON-1 protein (NP_498166.1), (E value: 6e-100) and the *C. briggsae* LON-1 protein (XP_002641281.1) (E value: 2e-97) respectively. Full length cDNA corresponding to a homologous sequence of Hc-L4-3 was successfully identified in *T. circumcincta.* An alignment of the *C. elegans* and *C. briggsae* LON-1 sequences with the homologous sequences identified in *H. contortus* and *T. circumcincta* is presented figure 3. Trichostrongylid and *Caenorhabditis* sequences appeared to be strongly conserved from position 82 to 258 (*C. elegans* sequence) with percentage identity ranging from 70 to 88 % using Hc-L4-3 sequence as reference. The Hc-L4-3 full-length cDNA sequence and its homolog in *T. circumcincta* were named *Hco-lon-1* and *Tci-lon-1* respectively.

**Hc-L4-4 encodes a lipase 3 domain containing protein: Hco-LIP-1**

Hc-L4-4 predicted protein harboured a Lipase-3 domain (pfam PF01764) (E value: 7.30e-48). Protein databank searches identified two hypothetical nematode proteins showing similarities with the deduced amino acid sequence of Hc-L4-4: the *C. briggsae* CBG09691 hypothetical protein (XP_002637173), (E value: 8e-77) and the *C. elegans* F28H7.3 hypothetical protein (NP_505743), (E value: 9e-76) that also possess a Lipase-3 domain. PCR experiments performed on *T. circumcincta* cDNA led to the identification of a full length cDNA homologous to Hc-L4-4. The *H. contortus* and *T. circumcincta* deduced amino acid sequences shared 58% identity and 73% similarity respectively (figure 4). As their closest homologs in *C. elegans* remain uncharacterized, Hc-L4-4 full-length cDNA sequence and its *T. circumcincta* homolog were named *Hco-lip-1 and Tci-lip*-1 (for lipase protein-1) respectively.

**Hc-L4-5 corresponds to a *H. contortus* Parasitic Stages Specific Protein: Hco-PSSP-1**

No conserved protein domain was identified in Hc-L4-5 deduced protein sequence. Highest sequence similarities were found with hypothetical proteins from *Angiostrongylus cantonensis* (CAR63559.1), (E value: 1e-32) and the hypothetical protein CBG02759 from *C. briggsae* (XP 002631007.1), (E value: 1e-10). A full length cDNA corresponding to a homologous sequence of Hc-L4-5 was identified in *T. circumcincta*. The *H. contortus* and *T. circumcincta* deduced amino acid sequences shared 60% identities and 74% similarities respectively (figure 5). Hc-L4-5 full-length cDNA sequence and its *T. cirucumcincta* homolog were named *Hco-pssp-1* and *Tci-pssp-1* (for Parasitic Stages Specific Protein-1) respectively.

**Hc–L4-6 and Hc-L4-7 correspond to the *H. contortus nim-1* and *nim-2* genes respectively.**

The full-length cDNA sequences corresponding to Hc-L4-6 and Hc-L4-7 matched unambiguously to the previously characterized *H. contortus nim-1* and *nim-2* genes respectively (Geldhof *et al.*, 2005). For both genes, complete coding cDNA sequences are available in Genbank under accession numbers AM040235 and AM040236 respectively. Both PCR and bioinformatical approaches failed to identify homolog of *nim-1* and *nim-2* genes in *T. circumcincta*.

**Transcription in different developmental stage of *H. contortus***

Transcription of *Hco-ttl-1*, *Hco-slp-1*, *Hco-lon-1*, *Hco-lip-1*, *Hco-pssp-1*, *Hco-nim-1* and *Hco-nim-2* gene was investigated through different developmental stages of *H. contortus* including eggs, infective L3 larvae, *in-vitro* exsheathed L3 larvae, L4 larvae (5dpi), immature males and females L5 larvae (10 dpi) and adult males and females (21 dpi), (figure 6). For *Hco-ttl-1*, *Hco-lip-1*, *Hco-pssp-1*, *Hco-nim-1* and *Hco-nim-2* transcripts were detected in RNA extracted from L4, L5 and adults, whereas no amplification products were observed in eggs, L3 and exsheathed L3 stages. In contrast, transcripts of *Hco-lon-1* and *Hco-slp-1* were observed in all developmental stages except in the eggs. However, transcripts of *Hco-lon-1* and *Hco-slp-1* were clearly more abundant from L4 stage onward.

**DISCUSSION**

For strongylid parasitic nematodes, the successful transition to parasitism implies major adaptations such as host immune response evasion, changes in nutrition and metabolism, growth and sexual maturation. Therefore we speculate that genes involved in these physiological changes could represent prime targets for the development of novel control strategies. In the present study we have developed a SSH based strategy to identify and characterise some of these genes in *H. contortus*. In order to accelerate candidate gene validation, two different subtracted cDNA libraries enriched in L4 (5dpi) cDNA fragments were generated using *Rsa*I or *Alu*I as restriction enzymes. Some SSH ESTs (i.e. Hc-L4-1, Hc-L4-3 Hc-L4-6, and Hc-L4-7) independently identified in both subtracted libraries were found to correspond to different portions of the same transcript demonstrating the reliability of the SSH approach. In addition, the identification of sequences specific to *Rsa*I or *Alu*I generated library (Hc-L4-2, Hc-L4-4 Hc-L4-5, Hc-L4-8 and Hc-L4-9) highlighted the interest of using different restriction enzymes to optimize candidate discovery. The 46 dot-blot selected SSH clone sequences were found to be clustered into 9 contigs for which the corresponding full-length cDNA sequences were obtained. As nematode excretory/secretory (ES) products have been reported as a major source of antigen in several parasitic nematode species (Hawdon *et al.*, 1999; Lightowlers & Rickard, 1988; Maizels *et al.*, 2001; Yatsuda *et al.*, 2003), we have focused our attention on the 7 genes encoding for proteins harbouring a signal peptide of secretion. These 7 genes were found to be specifically expressed or over expressed during the transition to parasitism as well as during the later parasitic stages (L5 and adults). Therefore we could speculate that in addition to their putative involvement in the early parasitic phase they could also play a role in the persistence of the parasite into its host.

Two of them corresponded to the previously characterized *H. contortus nim-1* and *nim2* genes (Geldhof *et al.*, 2005). Even though the precise role of *Hco-nim-1* and *Hco-nim-2* remain to be established, these genes are among the most abundantly transcribed during the parasitic stages of *H. contortus* (Geldhof *et al.*, 2005). However, in the absence of evidence for close homologs in other strongyle species, their interest as potential cross-species protective antigens appeared to be limited. Interestingly, ESTs representing the *Hco-pssp-1* and *Hco-pssp-2* gene described in the present work are also among the most abundant in the *H. contortus* EST databank (data not shown). Therefore, it is tempting to hypothesize that the high level of redundancy observed in the SSH libraries might reflect a high level of transcription of those genes during transition to parasitism. The alignment of Hco-PSSP-1 sequences with its homologous sequences identified in *T. circumcincta* (Tci-PSSP-1) revealed some conservation among these proteins (i.e. 60% identities, 74% similarities). However, for *Hco-pssp-1*, no putative function could have been assigned. Clearly, further investigations will be needed in order to evaluate their interest as protective antigens against *H. contortus* and other trichostrongylid species.

Another secreted protein for which the precise function remains to be elucidated is the member of the transthyretin like protein Hco-TTL-1. The nematode specific TTL proteins were first identified in the free living nematode *C. elegans* (Sonnhammer & Durbin, 1997). They share weak homology with the transthyretin proteins of vertebrate which are involved in hormones transport (Sonnhammer & Durbin, 1997). Homologues of TTL have been found in several human, animal and plant parasitic nematodes such as *Xiphinema index* (Furlanetto *et al.*, 2005), *Heterodera glycines* (Gao *et al.*, 2003), *Meloidogyne incognita* (McCarter *et al.*, 2003), *Radopholus similis* (Jacob *et al.*, 2007), *O. ostertagi* (Vercauteren *et al.*, 2003), *Brugia malayi* (Hewitson *et al.*, 2008) and *A. caninum* (Mulvenna *et al.*, 2009). In protein databank, the closest homolog of Hco-TTL-1 corresponded to the Oos-TTL-1 sequence from the trichostrongylid species *O. ostertagi*. In this bovine parasite, an analysis of the TTL gene family has been carried out, revealing an extensive diversity of TTL sequences (Saverwyns *et al.*, 2008). The transcription profiles in pre-parasitic and parasitic stages have been investigated for 18 TTL genes and a specific expression in parasitic stage has been reported for only two of them, including *Oos-ttl-1* (Saverwyns *et al*,. 2008). Therefore, the similar expression pattern of *Oos-ttl-1* and *Hco-ttl-1* could suggest a role of these particular TTLs in the host-parasite interaction. In *H. contortus*, TTL proteins were found in the excretion/secretion products of adult worms providing direct evidence for their secretion into the host (Yatsuda *et al.*, 2003). Moreover, it has been reported that *H. contortus* TTLs were highly immunogenic as revealed by western blot

analyses of ES products from adult worms probed with sera from naturally immunized sheep (Yatsuda *et al.*, 2003). In addition to these characteristics, the high degree of conservation (i.e. up to 81% identities) of the Hco-TTL-1 and Tci-TTL-1 sequences with the previously identified Oos-TTL-1 sequence of *O. ostertagi* (Vercauteren *et al.*,2003) provides another argument to propose trichostrongylid TLL proteins as a multispecific protective antigen candidate of particular interest.

Among the other *H. contortus* potentially secreted proteins identified in the present study, Hco-LIP-1 and Hco-SLP-1 encode a class 3 lipase and a saposin-like protein respectively. As parasitic nematodes are not able to synthesize all of the lipids required for their metabolism, we could speculate that potentially secreted lipid interacting proteins such as lipases or saposin-like proteins that are specifically produced during the parasitical phase of *H. contortus* could interact with host lipids. Lipases can hydrolyze long-chain acyl-triglycerides into di- and monoglycerides, glycerol, and free fatty acids, however their precise function remain to be established in parasitic nematode species. The Hco-LIP-1 sequence and its homolog in *T. circumcincta* (Tci-LIP-1) correspond to our knowledge to the first report of class 3 lipase complete cDNA sequences in strongylid species. Clearly, further functional investigations have to be performed in order to investigate their ability to use the host lipids as substrate. Moreover, as Hco-LIP-1 and Tci-LIP-1 sequences were found to be conserved (i.e. 58% identities, 73% similarities), future work will also evaluate their interest as cross-protective antigens.

*Hco-slp*-1 encodes a saposin-like protein (SAPLIP). Saposin-like proteins are membrane interacting protein involved in various functions such as antimicrobial activity, innate immunity or lipid metabolism (for review Bruhn, 2005). The SAPLIP have been identified in a variety of organisms including the strongyle species *A. caninum* for which a role in the lysis of host cells during tissue migration has been suggested (Don *et al*. 2007). However, with the exception of the 6 conserved residues that typify the SAPLIP domain, Hco-SLP-1 share low sequences identities with those from other strongylid species. Therefore, we could speculate that the poor overall conservation within SAPLIP sequences could explain our failure to identify a homologous gene in *T. circumcincta* using a PCR strategy. Even though their interest as vaccine candidate has been demonstrated in helminth species such as *Fasciola hepatica* (Espino & Hillyer 2003), the low amino acid sequence similarity between the strongylid SAPLIP reported to date render them less attractive as potential cross-protective antigens.

The last *H. contortus* gene found to be specifically expressed during the parasitic phase was designated *Hco-lon-1*, based on its high similarity with the *C. elegans lon-1* gene. In *C.*

*elegans*, knock out mutants for the *lon-1* gene are abnormally long sized, suggesting a role in body size regulation (Morita *et al.*, 2002). The Hco-LON-1 protein sequence contains a SCP/Tpx-1/ag5/ PR-1 SC7 domain that is also found in other parasitic nematode proteins referred as "activation associated secreted proteins (ASP)". These proteins have been described in many parasitic nematode species such as *Cooperia punctata* (Yatsuda *et al.*, 2002), *O. ostertagi* (Geldhof *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2008), *A. caninum* (Hawdon *et al.*, 1999), *B. malayi* (Murray *et al.*, 2001) and *H. contortus* (Schallig & Van Leeuwen, 1997; Schallig *et al.*, 1997a; Schallig *et al.*, 1997b). In contrast with these ASP proteins for which a precise function remains to be elucidated, the high degree of similarity between the amino-acid sequences of Hco-LON-1 and Tci-LON-1 with their *C. elegans* and *C. briggsae* counterparts could indicate that the strongylid LON-1 proteins might be involved in body size regulation. As a matter of priority, future investigations will focus on their ability to trigger a host immune response.

In conclusion, we have reported a suite of genes differentially expressed between the free living and the early parasitic larval stage of *H. contortus*. Some of those genes encode potentially secreted proteins that appeared to be conserved in *T. circumcincta* and other strongylid species. Those candidates harbour characteristics of prime interest as cross-species vaccine candidates as they are nematode specific and potentially involved in the survival and/or development of the parasites..The *H. contortus* and *T. circumcincta* full-length cDNA sequences reported here will undoubtedly contribute to accelerate the identification of homologous sequences in other pathogenic species. In that respect, the present work provides a strong basis to refine vaccine target choice in order to control co-infecting trichostrongylid species

**ACKOWLEDGEMENTS**

The authors thank the constructive suggestions of Alexandra Blanchard-Letort, Pascal Boireau, Marie-Noëlle Rosso, Pierre Abad and Philippe Castagnone. Alexia Delannoy-Normand is a grateful recipient of a PhD grant from "INRA Animal Health Division".

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* **25,** 3389-3402.

Bethony, J. M., Loukas, A., Hotez, P. J., Knox, D. P., 2006. Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitology,* **133 Suppl,** S63-79.

Bruhn, H., 2005. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem. J.,* **389**, 249-257.

Cottee, P. A., Nisbet, A. J., Abs el-osta, Y. G., Webster, T. L., Gasser, R. B., 2006. Construction of gender-enriched cDNA archives for adult *Oesophagostomum dentatum* by suppressive-subtractive hybridization and a microarray analysis of expressed sequence tags. *Parasitology,* **132,** 691-708.

Datu, B. J., Gasser, R. B., Nagaraj, S. H., Ong, E. K., O'donoghue, P., Mcinnes, R., Ranganathan, S., Loukas, A., 2008. Transcriptional Changes in the Hookworm, *Ancylostoma caninum*, during the Transition from a Free-Living to a Parasitic Larva. *PLoS Negl Trop Dis,* **2,** e130.

Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **93,** 6025-6030.

Don, T. A., Oksov, Y., Lustigman, S., Loukas, A., 2007. Saposin-like proteins from the intestine of the blood-feeding hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Parasitology,* **134,** 427-436.

Dubreuil, G., Magliano, M., Deleury, E., Abad, P., Rosso, M. N., 2007. Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytol*. **176**, 426-436

Edgar, R. C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res,* **32,** 1792-1797.

Espino, A. M., Hillyer, G. V., 2003. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol,* **89,** 545-552.

Furlanetto, C., Cardle, L., Brown, D. J. F., Jones, J. T., 2005. Analysis of expressed sequence tags from the ectoparasitic nematode *Xiphinema index*. *Nematology,* **7**(1).

Gao, B., Allen, R., Maier, T., Davis, E. L., Baum, T. J., Hussey, R. S., 2003. The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. *Mol Plant Microbe Interact,* **16,** 720-726.

Geldhof, P., Vercauteren, I., Gevaert, K., Staes, A., Knox, D. P., Vandekerckhove, J., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2003. Activation-associated secreted proteins are the most abundant antigens in a host protective fraction from *Ostertagia ostertagi*. *Mol Biochem Parasitol,* **128,** 111-114.

Geldhof, P., Whitton, C., Gregory, W. F., Blaxter, M., Knox, D. P., 2005. Characterisation of the two most abundant genes in the *Haemonchus contortus* expressed sequence tag dataset. *Int J Parasitol,* **35,** 513-522.

Gilleard, J. S., 2006. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. *Int J Parasitol,* **36,** 1227-1239.

Hartman, D., Donald, D. R., Nikolaou, S., Savin, K. W., Hasse, D., Presidente, P. J., Newton, S. E., 2001. Analysis of developmentally regulated genes of the parasite *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol,* **31,** 1236-1245.

Hawdon, J. M., Narasimhan, S., Hotez, P. J., 1999. Ancylostoma secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. *Mol Biochem Parasitol,* **99,** 149-165.

Hewitson, J. P., Harcus, Y. M., Curwen, R. S., Dowle, A. A., Atmadja, A. K., Ashton, P. D., Wilson, A., Maizels, R. M., 2008. The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory-secretory products. *Mol Biochem Parasitol,* **160,** 8-21.

Hoekstra, R., Visser, A., Otsen, M., Tibben, J., Lenstra, J. A., Roos, M. H., 2000. EST sequencing of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* suggests a shift in gene expression during transition to the parasitic stages. *Mol Biochem Parasitol,* **110,** 53-68.

Huang, X., Madan, A., 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res,* **9,** 868-877.

Jacob, J., Vanholme, B., Haegeman, A., Gheysen, G., 2007. Four transthyretin-like genes of the migratory plant-parasitic nematode *Radopholus similis*: members of an extensive nematode-specific family. *Gene,* **402,** 9-19.

Knox, D. P., Redmond, D. L., Newlands, G. F., Skuce, P. J., Pettit, D., Smith, W. D., 2003. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *Int J Parasitol,* **33,** 1129-1137.

Kratzschmar, J., Haendler, B., Eberspaecher, U., Roosterman, D., Donner, P., Schleuning, W. D., 1996. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem,* **236,** 827-836.

Lightowlers, M. W., Rickard, M. D., 1988. Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology,* **96 Suppl,** S123-166.

Liu, M. Y., Wang, X. L., Fu, B. Q., Li, C. Y., Wu, X. P., Le rhun, D., Chen, Q. J., Boireau, P. ; 2007. Identification of stage-specifically expressed genes of *Trichinella spiralis* by suppression subtractive hybridization. *Parasitology,* **134,** 1443-1455.

Maizels, R. M., Gomez-escobar, N., Gregory, W. F., Murray, J. and Zang, X. (2001). Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol,* **31,** 889- 898.

Mccarter, J. P., Mitreva, M. D., Martin, J., Dante, M., Wylie, T., RaO, U., Pape, D., Bowers, Y., Theising, B., Murphy, C. V., Kloek, A. P., Chiapelli, B. J., Clifton, S. W., Bird, D. M., Waterston, R. H., 2003. Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. *Genome Biol,* **4,** R26.

Morita, K., Flemming, A. J., Sugihara, Y., Mochii, M., Suzuki, Y., Yoshida, S., Wood, W. B., Kohara, Y., Leroi, A. M., Ueno, N., 2002. A *Caenorhabditis elegans* TGF-beta, DBL-1, controls the expression of LON-1, a PR-related protein, that regulates polyploidization and body length. *Embo J,* **21,** 1063-1073.

Mulvenna, J., Hamilton, B., Nagaraj, S. H., Smyth, D., Loukas, A., Gorman, J. J., 2009. Proteomics analysis of the excretory/secretory component of the blood-feeding stage of the hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Mol Cell Proteomics,* **8,** 109-121.

Murray, J., Gregory, W. F., Gomez-escobar, N., Atmadja, A. K., Maizels, R. M., 2001. Expression and immune recognition of *Brugia malayi* VAL-1, a homologue of vespid venom allergens and Ancylostoma secreted proteins. *Mol Biochem Parasitol,* **118,** 89-96.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Von heijne, G., 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst,* **8,** 581-599.

Nikolaou, S., Gasser, R. B., 2006. Prospects for exploring molecular developmental processes in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol,* **36,** 859-868.

Nisbet, A. J., Gasser, R. B., 2004. Profiling of gender-specific gene expression for *Trichostrongylus vitrinus* (Nematoda: Strongylida) by microarray analysis of expressed sequence tag libraries constructed by suppressive-subtractive hybridisation. *Int J Parasitol,* **34,** 633-643.

Nisbet, A. J., Redmond, D. L., Matthews, J. B., Watkins, C., Yaga, R., Jones, J. T., Nath, M., Knox, D. P., 2007. Stage-specific gene expression in *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Strongylida) infective larvae and early parasitic stages. *Int J Parasitol*.

Redmond, D. L., Knox, D. P., 2006. Further protection studies using recombinant forms of *Haemonchus contortus* cysteine proteinases. *Parasite Immunol,* **28,** 213-219.

Roos, M. H., Otsen, M., Hoekstra, R., Veenstra, J. G., Lenstra, J. A., 2004. Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol,* **34,** 109-115.

Rossanigo, C. E., Gruner, L., 1991. Accuracy of two methods for counting eggs of sheep nematode parasites. *Vet Parasitol,* **39,** 115-121.

Rossanigo, C. E., Gruner, L., 1995. Moisture and temperature requirements in faeces for the development of free-living stages of gastrointestinal nematodes of sheep, cattle and deer. *J Helminthol,* **69,** 357-362.

Sangster, N. C., 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int J Parasitol,* **29,** 115-124; discussion 137-118.

Saverwyns, H., Visser, A., Van durme, J., Power, D., Morgado, I., Kennedy, M.W., Knox, D.P., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Gevaert, K., Vercruysse, J., Claerebout, E., Geldhof,P., 2008. Analysis of the thransthyretin-like (TTL) gene family in *Ostertagia ostertagi* – Comparison with other strongylid nematodes and *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol,* **38,** 1545-1556.

Schallig, H. D., Van leeuwen, M. A., 1997. Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology,* **114 ( Pt 3),** 293-299.

Schallig, H. D., Van leeuwen, M. A., Cornelissen, A. W., 1997a. Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunol,* **19,** 447-453.

Schallig, H. D., Van leeuwen, M. A., Verstrepen, B. E., Cornelissen, A. W., 1997b. Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol,* **88,** 203-213.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C. P., 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **95,** 5857-5864.

Smith, W. D., 1999. Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *Int J Parasitol,* **29,** 17-24.

Smith, S.K., Nisbet, A.J., Meikle, L.I., Inglis, N.F., Sales, J., Beynon, R.J., Matthews, J.B., 2009. Proteomic analysis of excretory/secretory products released by *Teladorsagia circumcincta* larvae early post-infection. *Parasite immunol*, **31**, 10-19.

Sonnhammer, E. L., Durbin, R., 1997. Analysis of protein domain families in *Caenorhabditis elegans*. *Genomics,* **46,** 200-216.

Stankiewicz, M., Hadas, E., Shaw, R. , Green, R., 2000. Immunisation of lambs with drug-abbreviated *Haemonchus contortus* infections: protection against homologous and heterologous challenge. *Parasitol Res,* **86,** 758-761.

Vercauteren, I., Geldhof, P., Peelaers, I., Claerebout, E., Berx, G., Vercruysse, J., 2003. Identification of excretory-secretory products of larval and adult *Ostertagia ostertagi* by immunoscreening of cDNA libraries. *Mol Biochem Parasitol,* **126,** 201-208.

Visser, A., Van zeveren, A. M., Meyvis, Y., PeelaerS, I., Van den broeck, W., Gevaert, K., Vercruysse, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2008. Gender-enriched transcription of activation associated secreted proteins in *Ostertagia ostertagi*. *Int J Parasitol,* **38,** 455-465.

Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Von samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N. C., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol,* **20,** 469-476.

Yatsuda, A. P., Eysker, M., Vieira-Bressan, M. C., De vries, E., 2002. A family of activation associated secreted protein (ASP) homologues of *Cooperia punctata*. *Res Vet Sci,* **73,** 297-306.

Yatsuda, A. P., Krijgsveld, J., Cornelissen, A. W., Heck, A. J., De vries, E., 2003. Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J Biol Chem,* **278,** 16941-16951.

## LEGENDS AND FIGURES

| Adaptor or primer name | Sequence |
|---|---|
| Adap1 *Rsa*I | 5’CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT 3’<br>3’GGCCCGTCCA 5’ |
| Adap2 *Rsa*I | 5’CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3’<br>3’GCCGGCTCCA 5’ |
| Adap 1 *Alu*I | 5’CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGAG 3’<br>3’GGCCCGTCTC 5’ |
| Adap 2 *Alu*I | 5’CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGAG 3’<br>3’GCCGGCTCTC 5’ |
| P1 | 5’CTAATACGACTCACTATAGGC 3’ |
| PN1 *Rsa*I | 5’TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT 3’ |
| PN2 *Rsa* I | 5’AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3’ |
| PN1 *Alu*I | 5’TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGAG 3’ |
| PN2 *Alu* I | 5’AGCGTGGTCGCGGCCGAGAG 3’ |

**Table 1** SSH adaptor and primer sequences used for the two independent sets of experiment performed with the restriction enzyme *Rsa*I or *Alu*I respectively.

| Contig name | Number of clones in SSH libraries | | Corresponding full-length cDNA name | Full length cDNA size (bp) | Deduced Amino acid sequence size (aa) | Accession number | Homologous protein | | | Predicted signal peptide |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Rsa*I | *Alu*I | | | | | Species | Highest homology | BlastX e-value | |
| Hc-L4-1 | 4 | 1 | *Hco-ttl-1* | 505 | 137 | HM003621 | *O. ostertagi* | Transthyretin like protein (TTL-1) | 3e-58 | yes |
| Hc-L4-2 | - | 2 | *Hco-slp-1* | 409 | 105 | HM003623 | *A. caninum* | Saposin like protein (SLP-1) | 6e-05 | yes |
| Hc-L4-3 | 1 | 1 | *Hco-lon-1* | 1163 | 297 | HM003624 | *C. elegans* | LONg family member (lon-1) | 6e-100 | yes |
| Hc-L4-4 | 3 | - | *Hco-lip-1* | 1041 | 301 | HM003626 | *C. briggsae* | Hypothetical protein CBG09691 | 8e-77 | yes |
| Hc-L4-5 | - | 9 | *Hco-pssp-1* | 780 | 223 | HM003628 | *A. cantonensis* | Hypothetical protein CAR63559.1 | 1e-32 | yes |
| Hc-L4-6 | 2 | 2 | *Hco-nim-1* | 537 | 178 | AM040235 | *H. contortus* | NIM-1 | 0 | yes |
| Hc-L4-7 | 2 | 9 | *Hco-nim-2* | 579 | 192 | AM040236 | *H. contortus* | NIM-2 | 0 | yes |
| Hc-L4-8 | | 4 | *Hco-col-166* | 1064 | 302 | HM003630 | *C. elegans* | Collagen family member (col-166) | 2e-36 | no |
| Hc-L4-9 | 6 | - | *Hco-pssp-2* | 492 | 123 | HM003631 | *C. elegans* | Hypothetical protein R02C2.7 | 3e-09 | no |

**Table 2** Summary of the selected *H. contortus* fourth stage larvae (L4 5dpi) clones and their corresponding full-length cDNA sequences.

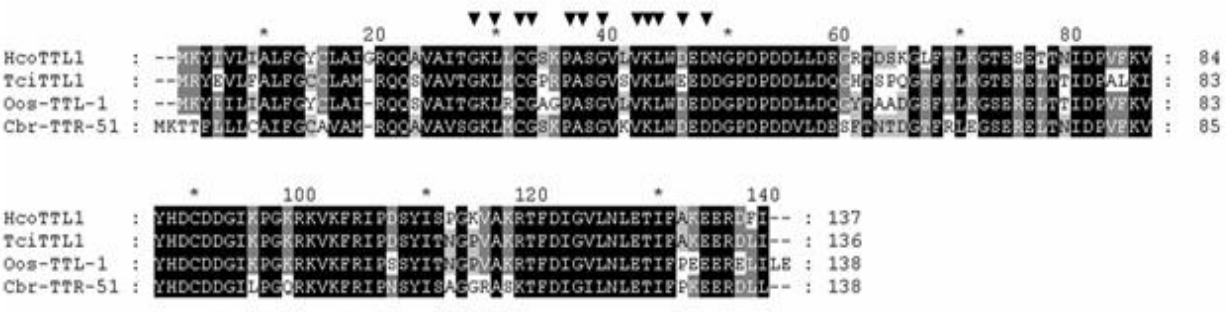



Fig. 1

**Fig. 1** Alignment of Hco-TTL-1 (HM003621) and Tci-TTL-1 (HM003622) deduced amino acid sequences with their closest homologs identified in GenBank: *Ostertagia ostertagi* Oos-TTL-1 (CAP45649.1) and *Caenorhabitis briggsae* Cbr-TTR-51 (XP_002634232.1). Regions of consensus are shaded. Black arrows indicate amino-acids that typify Class I TTL (Saverwyns *et al*. 2008)




Fig. 2

**Fig. 2** Alignment of Hco-SLP-1 (HM003623) deduced amino acid sequences with the *Ancylostoma caninum* Aca-SLP-1 sequence (ABH88210.1). Regions of consensus are shaded.

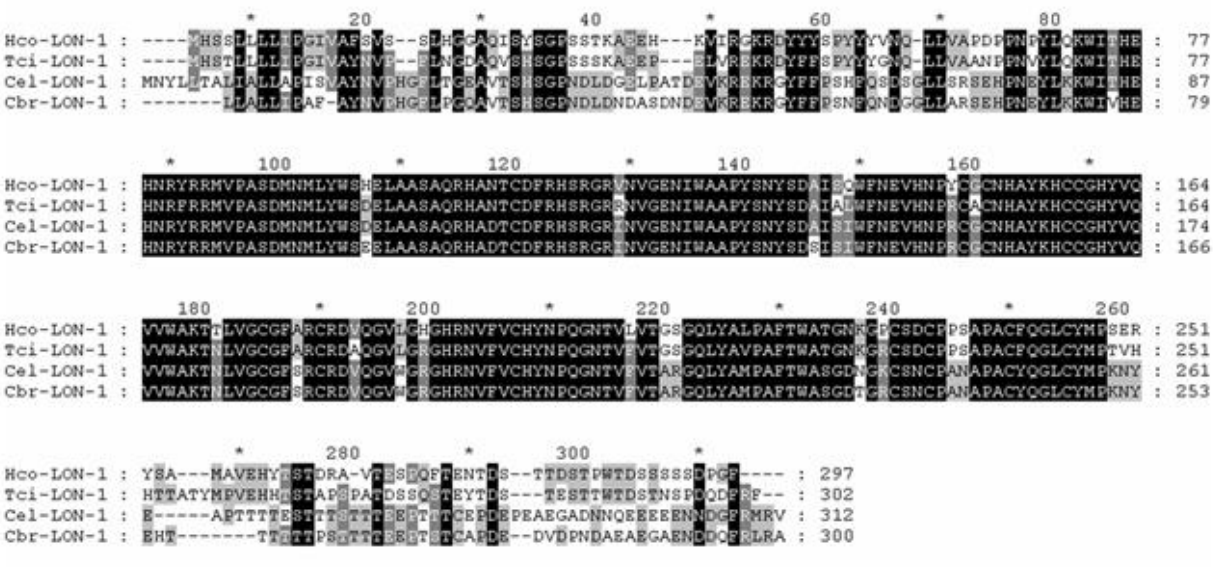



Fig.3

**Fig. 3** Alignment of Hco-LON-1 (HM003624) and Tci-LON-1 (HM003625) deduced amino acid sequences with their closest homologs identified in GenBank: *Caenorhabditis elegans* Cel-LON-1 (NP_498166.1) and *Caenorhabditis briggsae* Cbr-LON-1 (XP_002641281.1). Regions of consensus are shaded.

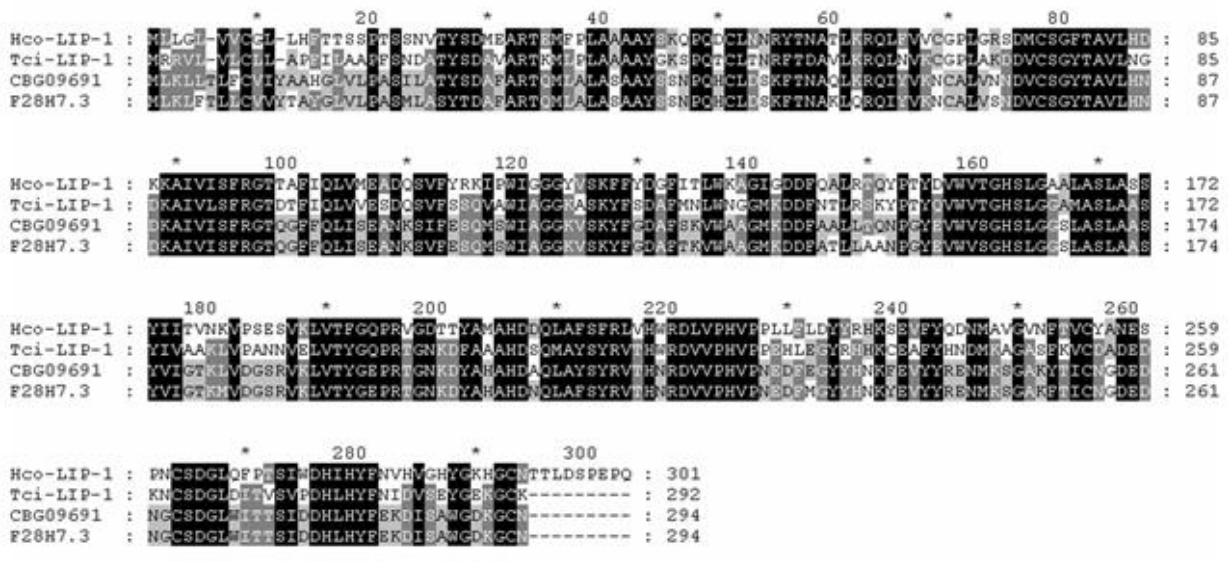



Fig. 4

**Fig. 4** Alignment of Hco-LIP-1 (HM003626) and Tci-LIP-1 (HM003627) deduced amino acid sequences with their closest homologs identified in GenBank: *Caenorhabditis briggsae* CBG09691 hypothetical protein (XP_002637173) and *Caenorhabditis elegans* F28H7.3 hypothetical protein (NP_505743) and. Regions of consensus are shaded.

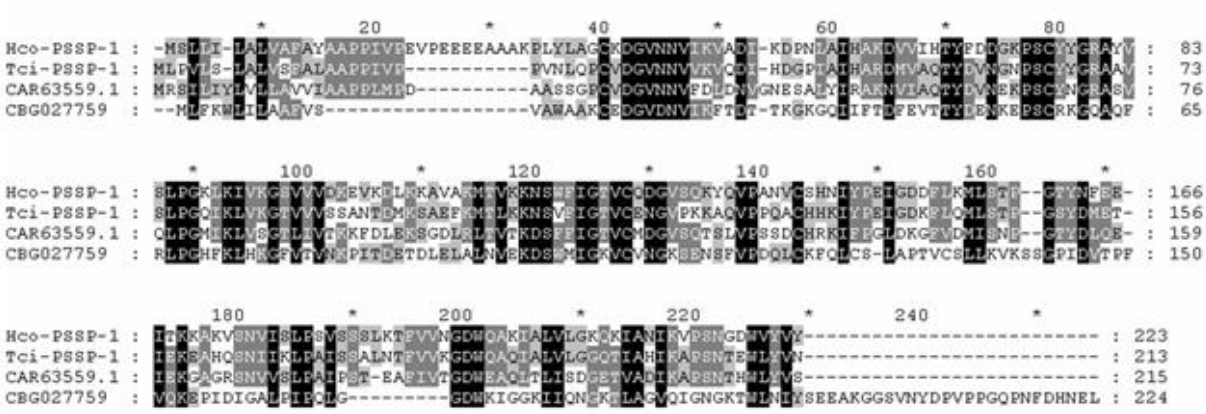



Fig. 5

**Fig. 5** Alignment of Hco-PSSP-1 (HM003628) and Tci-PSSP-1 (HM003629) deduced amino acid sequences with their closest homologs identified in GenBank: *Angiostrongylus cantonensis* CAR63559.1 hypothetical protein and *Caenorhabditis briggsae* CBG02759 hypothetical protein (XP_002631007.1). Regions of consensus are shaded.

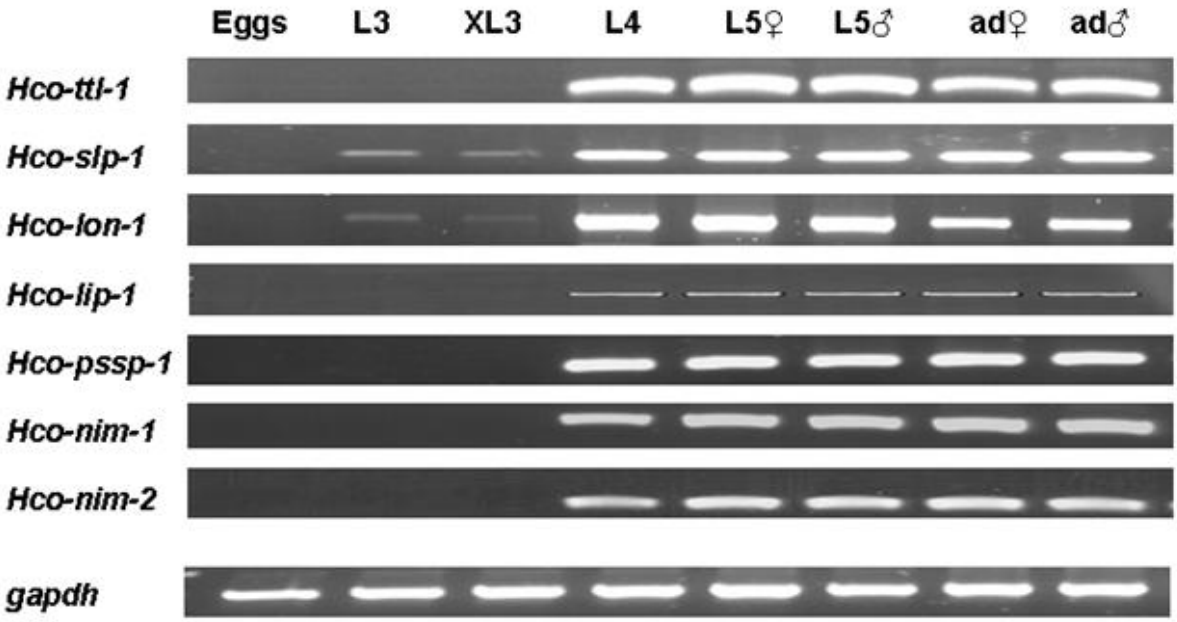



**Fig. 6** Transcription of *Hco-ttl-1*, *Hco-slp-1*, *Hco-lon-1*, *Hco-lip-1*, *Hco-pssp-1*, *Hco-nim-1* and *Hco-nim-2* genes through the *H. contortus* lifecycle as revealed by RT-PCR experiments. L3: ensheated third stage larvae, XL3: *in-vitro* exsheated third stage larvae, L4: fourth stage larvae collected 5 days post infection (5dpi). L5♂ and L5♀: immature fifth stage larvae (10 dpi) males and females respectively. ad ♂ and ad ♀: mature adult males and females (21 dpi). Integrity of cDNA preparations was verified by PCR using primers designed to amplify a 380bp of fragment of the *H. contortus* gapdh.

# Bibliographie

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. and LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol,* **215,** 403-410.

BABA, T., DOWNS, D., JACKSON, K. W., TANG, J. and WANG, C. S. (1991). Structure of human milk bile salt activated lipase. *Biochemistry,* **30,** 500-510.

BALIC, A., BOWLES, V. M., LIU, Y. S. and MEEUSEN, E. N. (2003). Local immune responses in sensitized sheep following challenge infection with Teladorsagia circumcincta. *Parasite Immunol,* **25,** 375-381.

BANYAI, L. and PATTHY, L. (1998). Amoebapore homologs of Caenorhabditis elegans. *Biochim Biophys Acta,* **1429,** 259-264.

BASAVARAJU, S., ZHAN, B., KENNEDY, M. W., LIU, Y., HAWDON, J. and HOTEZ, P. J. (2003). Ac-FAR-1, a 20 kDa fatty acid- and retinol-binding protein secreted by adult Ancylostoma caninum hookworms: gene transcription pattern, ligand binding properties and structural characterisation. *Mol Biochem Parasitol,* **126,** 63-71.

BEISSON, F., FERTE, N., BRULEY, S., VOULTOURY, R., VERGER, R. and ARONDEL, V. (2001). Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta,* **1531,** 47-58.

BENTOUNSI, B. and CABARET, J. (1999). Analysis of helminth genetic data: comparative examples with Haemonchus contortus isozymes using exact tests or resampling procedures. *Parasitol Res,* **85,** 855-857.

BETHONY, J. M., LOUKAS, A., HOTEZ, P. J. and KNOX, D. P. (2006). Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitology,* **133 Suppl,** S63-79.

BEUGNET, F., COSTA, R. and CHARDONNET, L. (1994). Adaptation of strategies of tick control to the problem of drug resistance : Boophilus microplus in New Caledonia. *Revue de Medecine Veterinaire,* **145,** 931-940.

BEUGNET F, K. D. (1997). La résistance aux antiparasitaires chez les parasites des ruminants. *Point Veterinaire Numéro spécial "Parasitologie des Ruminants",* **28,** 167-174.

BJORN, H. (1994). Workshop summary: anthelmintic resistance. *Vet Parasitol,* **54,** 321-325.

BLACKHALL, W. J., PRICHARD, R. K. and BEECH, R. N. (2003). Selection at a gamma-aminobutyric acid receptor gene in Haemonchus contortus resistant to avermectins/milbemycins. *Molecular and Biochemical Parasitology,* **131,** 137-145.

BORGSTEEDE, F. H., ROOS, M. H., SMITH, G. and PRICHARD, R. K. (1996). Workshop summary: anthelmintic resistance. *Vet Parasitol,* **64,** 129-132.

BOWLES, V. M., BRANDON, M. R. and MEEUSEN, E. (1995). Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite Haemonchus contortus. *Immunology,* **84,** 669-674.

BRADLEY, J. E., NIRMALAN, N., KLAGER, S. L., FAULKNER, H. and KENNEDY, M. W. (2001). River blindness: a role for parasite retinoid-binding proteins in the generation of pathology? *Trends Parasitol,* **17,** 471-475.

BRUHN, H. (2005). A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J,* **389,** 249-257.

CARMAN, J. A., POND, L., NASHOLD, F., WASSOM, D. L. and HAYES, C. E. (1992). Immunity to Trichinella spiralis infection in vitamin A-deficient mice. *J Exp Med,* **175,** 111-120.

CHANDRAWATHANI, P., JAMNAH, O., WALLER, P. J., HOGLUND, J., LARSEN, M. and ZAHARI, W. M. (2002). Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on Duddingtonia flagrans. *Vet Res,* **33,** 685-696.

CHARTIER, C. and RECHE, B. (1992). Gastrointestinal helminths and lungworms of French dairy goats: prevalence and geographical distribution in Poitou-Charentes. *Vet Res Commun,* **16,** 327-335.

CHERMETTE, R. (1982). Ovine haemonchosis and its characteristics: significance and current state of the disease in France. *Point Veterinaire,* **13,** 21-28.

CONDER, G. A. and CAMPBELL, W. C. (1995). Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. *Adv Parasitol,* **35,** 1-84.

COOK, A., APTEL, N., PORTILLO, V., SINEY, E., SIHOTA, R., HOLDEN-DYE, L. and WOLSTENHOLME, A. (2006). Caenorhabditis elegans ivermectin receptors regulate locomotor behaviour and are functional orthologues of Haemonchus contortus receptors. *Mol Biochem Parasitol,* **147,** 118-125.

COOP, R. L. and HOLMES, P. H. (1996). Nutrition and parasite interaction. *Int J Parasitol,* **26,** 951-962.

COYNE, M. J., SMITH, G. and JOHNSTONE, C. (1991). A study of the mortality and fecundity of Haemonchus contortus in sheep following experimental infections. *Int J Parasitol,* **21,** 847-853.

DALTON, J. P., BRINDLEY, P. J., KNOX, D. P., BRADY, C. P., HOTEZ, P. J., DONNELLY, S., O'NEILL, S. M., MULCAHY, G. and LOUKAS, A. (2003). Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol,* **33,** 621-640.

DALZELL, J. J., MCMASTER, S., FLEMING, C. C. and MAULE, A. G. (2010). Short interfering RNA-mediated gene silencing in Globodera pallida and Meloidogyne incognita infective stage juveniles. *Int J Parasitol,* **40,** 91-100.

DATU, B. J., GASSER, R. B., NAGARAJ, S. H., ONG, E. K., O'DONOGHUE, P., MCINNES, R., RANGANATHAN, S. and LOUKAS, A. (2008). Transcriptional Changes in the Hookworm, Ancylostoma caninum, during the Transition from a Free-Living to a Parasitic Larva. *PLoS Negl Trop Dis,* **2,** e130.

DIATCHENKO, L., LAU, Y. F., CAMPBELL, A. P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E. D. and SIEBERT, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **93,** 6025-6030.

DIATCHENKO, L., LUKYANOV, S., LAU, Y. F. and SIEBERT, P. D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol,* **303,** 349-380.

DON, T. A., OKSOV, Y., LUSTIGMAN, S. and LOUKAS, A. (2007). Saposin-like proteins from the intestine of the blood-feeding hookworm, Ancylostoma caninum. *Parasitology,* **134,** 427-436.

DUBREUIL, G., MAGLIANO, M., DELEURY, E., ABAD, P. and ROSSO, M. N. (2007). Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytol*.

EIJKMANN (1901). Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Parasitenkd. Infektionskr,* **29,** 841-848.

EMERY, D. L. (1996). Vaccination against worm parasites of animals. *Vet Parasitol,* **64,** 31-45.

ENEQVIST, T., LUNDBERG, E., NILSSON, L., ABAGYAN, R. and SAUER-ERIKSSON, A. E. (2003). The transthyretin-related protein family. *Eur J Biochem,* **270,** 518-532.

ESLAMI, A., RANJBAR-BAHADORI, S., ZARE, R. and RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2005). The predatory capability of Arthrobotrys cladodes var. macroides in the control of Haemonchus contortus infective larvae. *Vet Parasitol,* **130,** 263-266.

ESPINO, A. M. and HILLYER, G. V. (2003). Molecular cloning of a member of the Fasciola hepatica saposin-like protein family. *J Parasitol,* **89,** 545-552.

EYSKER, M., BAKKER, N., KOOYMAN, F. N., VAN DER LINDEN, D., SCHRAMA, C. and PLOEGER, H. W. (2005). Consequences of the unusually warm and dry summer of

2003 in The Netherlands: poor development of free living stages, normal survival of infective larvae and long survival of adult gastrointestinal nematodes of sheep. *Vet Parasitol,* **133,** 313-321.

FEITELSON, J. S., PAYNE, J. and KIM, L. (1992). Bacillus thuringiensis: insects and beyond. *Bio/Technology,* **10,** 271-275.

FETTERER, R. H. and RHOADS, M. L. (1993). Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet Parasitol,* **46,** 103-111.

FU, B. Q., LIU, M. Y., KAPEL, C. M., MENG, X. P., LU, Q., WU, X. P., CHEN, Q. J. and BOIREAU, P. (2005). Molecular cloning of a cDNA encoding a putative cuticle collagen of Trichinella spiralis. *Vet Parasitol,* **132,** 31-35.

FURLANETTO, C., CARDLE, L., BROWN, D. J. F. and JONES, J. T. (2005). Analysis of expressed sequence tags from the ectoparasitic nematode Xiphinema index. *Nematology,* **7**.

GAO, B., ALLEN, R., MAIER, T., DAVIS, E. L., BAUM, T. J. and HUSSEY, R. S. (2003). The parasitome of the phytonematode Heterodera glycines. *Mol Plant Microbe Interact,* **16,** 720-726.

GAROFALO, A., KENNEDY, M. W. and BRADLEY, J. E. (2003a). The FAR proteins of parasitic nematodes: their possible involvement in the pathogenesis of infection and the use of Caenorhabditis elegans as a model system to evaluate their function. *Med Microbiol Immunol,* **192,** 47-52.

GAROFALO, A., KLAGER, S. L., ROWLINSON, M. C., NIRMALAN, N., KLION, A., ALLEN, J. E., KENNEDY, M. W. and BRADLEY, J. E. (2002). The FAR proteins of filarial nematodes: secretion, glycosylation and lipid binding characteristics. *Mol Biochem Parasitol,* **122,** 161-170.

GAROFALO, A., ROWLINSON, M. C., AMAMBUA, N. A., HUGHES, J. M., KELLY, S. M., PRICE, N. C., COOPER, A., WATSON, D. G., KENNEDY, M. W. and BRADLEY, J. E. (2003b). The FAR protein family of the nematode Caenorhabditis elegans. Differential lipid binding properties, structural characteristics, and developmental regulation. *J Biol Chem,* **278,** 8065-8074.

GELDHOF, P., MURRAY, L., COUTHIER, A., GILLEARD, J. S., MCLAUCHLAN, G., KNOX, D. P. and BRITTON, C. (2006). Testing the efficacy of RNA interference in Haemonchus contortus. *Int J Parasitol,* **36,** 801-810.

GELDHOF, P., VERCAUTEREN, I., GEVAERT, K., STAES, A., KNOX, D. P., VANDEKERCKHOVE, J., VERCRUYSSE, J. and CLAEREBOUT, E. (2003). Activation-associated secreted proteins are the most abundant antigens in a host protective fraction from Ostertagia ostertagi. *Mol Biochem Parasitol,* **128,** 111-114.

GELDHOF, P., WHITTON, C., GREGORY, W. F., BLAXTER, M. and KNOX, D. P. (2005). Characterisation of the two most abundant genes in the Haemonchus contortus expressed sequence tag dataset. *Int J Parasitol,* **35,** 513-522.

GUILIANO, D. B. and BLAXTER, M. L. (2006). Operon conservation and the evolution of trans-splicing in the phylum Nematoda. *PLoS Genet,* **2,** e198.

HARRISON, G. B., PULFORD, H. D., GATEHOUSE, T. K., SHAW, R. J., PFEFFER, A. and SHOEMAKER, C. B. (1998). Studies on the role of mucus and mucosal hypersensitivity recations during rejection of *Trichostrongylus colubriformis* from the intestine of immune sheep using an experimental challenge model. *International Journal for Parasitology,* **29,** 459-468.

HAWDON, J. M., NARASIMHAN, S. and HOTEZ, P. J. (1999). Ancylostoma secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from Ancylostoma caninum. *Mol Biochem Parasitol,* **99,** 149-165.

HE, H., CHENG, M., YANG, X., MENG, J., HE, A., ZHENG, X., LI, Z., GUO, P., PAN, Z. and ZHAN, X. (2009). Preliminary molecular characterization of the human pathogen Angiostrongylus cantonensis. *BMC Mol Biol,* **10,** 97.

HEIN, W. R. and MACKAY, C. R. (1991). Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol Today,* **12,** 30-34.

HERNANDEZ LINARES, I., LOPEZ ARELLANO, M. E., MENDOZA DE GIVES, P., LIEBANO HERNANDEZ, E. and DE LA PARRA, A. B. (2008). Lethal activity of two Bacillus thuringiensis strains against Haemonchus contortus histotropic larvae. *Ann N Y Acad Sci,* **1149,** 164-166.

HEWITSON, J. P., HARCUS, Y. M., CURWEN, R. S., DOWLE, A. A., ATMADJA, A. K., ASHTON, P. D., WILSON, A. and MAIZELS, R. M. (2008). The secretome of the filarial parasite, Brugia malayi: proteomic profile of adult excretory-secretory products. *Mol Biochem Parasitol,* **160,** 8-21.

HOLMES, P. H. (1985). Pathogenesis of Trichostrongylosis. *Veterinary Parasitology,* **18,** 89-101.

HOSTE, H., HUBY, F., MALLET, S., (1997). Strongyloses gastro-intestinales des ruminants : conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. *Point vétérinaire, Numéro Spécial "Parasitologie des Ruminants",* **28,** 53-59.

HOTEZ, P. J., ZHAN, B., BETHONY, J. M., LOUKAS, A., WILLIAMSON, A., GOUD, G. N., HAWDON, J. M., DOBARDZIC, A., DOBARDZIC, R., GHOSH, K., BOTTAZZI, M. E., MENDEZ, S., ZOOK, B., WANG, Y., LIU, S., ESSIET-GIBSON, I., CHUNG-DEBOSE, S., XIAO, S., KNOX, D., MEAGHER, M., INAN, M., CORREA-OLIVEIRA, R., VILK, P., SHEPHERD, H. R., BRANDT, W. and RUSSELL, P. K. (2003). Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: the Human Hookworm Vaccine Initiative. *Int J Parasitol,* **33,** 1245-1258.

HUANG, X. and MADAN, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res,* **9,** 868-877.

HUGOT, J. P., BAUJARD, P. & MORAND, S. (2001.). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study : an overview. *Nematology,* **3,** 199-208.

HUMBERT, J. F. and CABARET, J. (1995). Use of random amplified polymorphic DNA for identification of ruminant trichostrongylid nematodes. *Parasitology Research,* **81,** 81-85.

HUSSEIN, A. S., KICHENIN, K. and SELKIRK, M. E. (2002). Suppression of secreted acetylcholinesterase expression in Nippostrongylus brasiliensis by RNA interference. *Mol Biochem Parasitol,* **122,** 91-94.

JACOB, J., VANHOLME, B., HAEGEMAN, A. and GHEYSEN, G. (2007). Four transthyretin-like genes of the migratory plant-parasitic nematode Radopholus similis: members of an extensive nematode-specific family. *Gene,* **402,** 9-19.

JACQUIET, P., HUMBERT, J. F., COMES, A. M., CABARET, J., THIAM, A. and CHEIKH, D. (1995). Ecological, morphological and genetic characterization of sympatric Haemonchus spp. parasites of domestic ruminants in Mauritania. *Parasitology,* **110 ( Pt 4),** 483-492.

JI, W., WRIGHT, M. B., CAI, L., FLAMENT, A. and LINDPAINTNER, K. (2002). Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics,* **3,** 12.

JOHNSON, K. S., HARRISON, G. B., LIGHTOWLERS, M. W., O'HOY, K. L., COUGLE, W. G., DEMPSTER, R. P., LAWRENCE, S. B., VINTON, J. G., HEATH, D. D. and RICKARD, M. D. (1989). Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature,* **338,** 585-587.

JOHNSTONE, I. L. (2000). Cuticle collagen genes. Expression in Caenorhabditis elegans. *Trends Genet,* **16,** 21-27.

JOHNSTONE, I. L., SHAFI, Y., MAJEED, A. and BARRY, J. D. (1996). Cuticular collagen genes from the parasitic nematode Ostertagia circumcincta. *Mol Biochem Parasitol,* **80,** 103-112.

JONES DG and DP, K. (1990). Evidence for the presence of nematode-derived acetylcholinesterase in sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Res Vet Sci,* **48,** 136-137.

KAMATH, R. S. and AHRINGER, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans. *Methods,* **30,** 313-321.

KENNEDY, M. W., GARSIDE, L. H., GOODRICK, L. E., MCDERMOTT, L., BRASS, A., PRICE, N. C., KELLY, S. M., COOPER, A. and BRADLEY, J. E. (1997). The Ov20 protein of the parasitic nematode Onchocerca volvulus. A structurally novel class of small helix-rich retinol-binding proteins. *J Biol Chem,* **272,** 29442-29448.

KNOX, D. (1993). Characterisation of proteases in extracts of adult Haemonchus contortus, the ovine abomasal nematode. *Parasitology,* **106,** 395-404.

KNOX, D. (1996). Nutritional enhancement of parasite control in small ruminant production systems in developping countries of south-east Asia and the Pacific. *Journal for Parasitologie,* **26,** 963-970.

KNOX, D. P. and REDMOND, D. L. (2006). Parasite vaccines - recent progress and problems associated with their development. *Parasitology,* **133 Suppl,** S1-8.

KNOX, D. P., REDMOND, D. L., NEWLANDS, G. F., SKUCE, P. J., PETTIT, D. and SMITH, W. D. (2003). The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for Haemonchus contortus and other ruminant trichostrongyloids. *Int J Parasitol,* **33,** 1129-1137.

KNOX, D. P. and SMITH, W. D. (2001). Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Vet Parasitol,* **100,** 21-32.

KOOYMAN, F. N., SCHALLIG, H. D., VAN LEEUWEN, M. A., MACKELLAR, A., HUNTLEY, J. F., CORNELISSEN, A. W. and VERVELDE, L. (2000). Protection in lambs vaccinated with Haemonchus contortus antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG1 antibody. *Parasite Immunol,* **22,** 13-20.

KOTZE, A. C., O'GRADY, J., GOUGH, J. M., PEARSON, R., BAGNALL, N. H., KEMP, D. H. and AKHURST, R. J. (2005). Toxicity of Bacillus thuringiensis to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *Int J Parasitol,* **35,** 1013-1022.

KRATZSCHMAR, J., HAENDLER, B., EBERSPAECHER, U., ROOSTERMAN, D., DONNER, P. and SCHLEUNING, W. D. (1996). The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem,* **236,** 827-836.

KUANG, L., COLGRAVE, M. L., BAGNALL, N. H., KNOX, M. R., QIAN, M. and WIJFFELS, G. (2009). The complexity of the secreted NPA and FAR lipid-binding protein families of Haemonchus contortus revealed by an iterative proteomics-bioinformatics approach. *Mol Biochem Parasitol,* **168,** 84-94.

LANUSSE, C. E. and PRICHARD, R. K. (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Veterinary Parasitology,* **49,** 123-158.

LARSEN, M. (1999). Biological control of helminths. *Int J Parasitol,* **29,** 139-146; discussion 153-134.

LARSEN, M., FAEDO, M., WALLER, P. J. and HENNESSY, D. R. (1998). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: studies with Duddingtonia flagrans. *Vet Parasitol,* **76,** 121-128.

LEE, D. L. (1996). Why do some nematode parasites of the alimentary tract secrete acetylcholinesterase? *International Journal for Parasitology,* **26,** 499-508.

LEIPPE, M., TANNICH, E., NICKEL, R., VAN DER GOOT, G., PATTUS, F., HORSTMANN, R. D. and MULLER-EBERHARD, H. J. (1992). Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic Entamoeba histolytica. *Embo J,* **11,** 3501-3506.

LIGHTOWLERS, M. W., FLISSER, A., GAUCI, C. G., HEATH, D. D., JENSEN, O. and ROLFE, R. (2000). Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol Today,* **16,** 191-196.

LIU, M. Y., WANG, X. L., FU, B. Q., LI, C. Y., WU, X. P., LE RHUN, D., CHEN, Q. J. and BOIREAU, P. (2007). Identification of stage-specifically expressed genes of Trichinella spiralis by suppression subtractive hybridization. *Parasitology,* **134,** 1443-1455.

LIZOTTE-WANIEWSKI, M., TAWE, W., GUILIANO, D. B., LU, W., LIU, J., WILLIAMS, S. A. and LUSTIGMAN, S. (2000). Identification of potential vaccine and drug target candidates by expressed sequence tag analysis and immunoscreening of Onchocerca volvulus larval cDNA libraries. *Infect Immun,* **68,** 3491-3501.

LOPEZ ME (2006). Use of *Bacillus thuringiensis* Toxin as an alternative Method of Control against *Haemonchus contortus*. *N.Y.Acad.Sci***,** 347-354.

MADUZIA, L. L., GUMIENNY, T. L., ZIMMERMAN, C. M., WANG, H., SHETGIRI, P., KRISHNA, S., ROBERTS, A. F. and PADGETT, R. W. (2002). lon-1 regulates Caenorhabditis elegans body size downstream of the dbl-1 TGF beta signaling pathway. *Dev Biol,* **246,** 418-428.

MAEDA, I., KOHARA, Y., YAMAMOTO, M. and SUGIMOTO, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in Caenorhabditis elegans by high-throughput RNAi. *Curr Biol,* **11,** 171-176.

MAGGENTI, A. R. (1991). Nemata : higher classification. *Manual of Agricultural Nematology***,** 147-187.

MAIZELS, R. M. and YAZDANBAKHSH, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol,* **3,** 733-744.

MAK, C. H., SU, K. W. and KO, R. C. (2001). Identification of some heat-induced genes of Trichinella spiralis. *Parasitology,* **123,** 293-300.

MARTIN, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J,* **154,** 11-34.

MARTIN, R. J., VERMA, S., LEVANDOSKI, M., CLARK, C. L., QIAN, H., STEWART, M. and ROBERTSON, A. P. (2005). Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole. *Parasitology,* **131 Suppl,** S71-84.

MCCARTER, J. P., MITREVA, M. D., MARTIN, J., DANTE, M., WYLIE, T., RAO, U., PAPE, D., BOWERS, Y., THEISING, B., MURPHY, C. V., KLOEK, A. P., CHIAPELLI, B. J., CLIFTON, S. W., BIRD, D. M. and WATERSTON, R. H. (2003). Analysis and functional classification of transcripts from the nematode Meloidogyne incognita. *Genome Biol,* **4,** R26.

MEI, B., KENNEDY, M. W., BEAUCHAMP, J., KOMUNIECKI, P. R. and KOMUNIECKI, R. (1997). Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, Ascaris suum. *J Biol Chem,* **272,** 9933-9941.

MENDOZA-DE GIVES, P. and VAZQUEZ-PRATS, V. M. (1994). Reduction of Haemonchus contortus infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Vet Parasitol,* **55,** 197-203.

MILLER, T. A. (1978). Industrial development and field use of the canine hookworm vaccine. In *Advances in parasitology. Volume 16.* pp. 333-342.

MORITA, K., FLEMMING, A. J., SUGIHARA, Y., MOCHII, M., SUZUKI, Y., YOSHIDA, S., WOOD, W. B., KOHARA, Y., LEROI, A. M. and UENO, N. (2002). A

Caenorhabditis elegans TGF-beta, DBL-1, controls the expression of LON-1, a PR-related protein, that regulates polyploidization and body length. *Embo J,* **21,** 1063-1073.

MPAGI, J. L., ERTTMANN, K. D. and BRATTIG, N. W. (2000). The secretory Onchocerca volvulus protein OvS1/Ov20 exhibits the capacity to compete with serum albumin for the host's long-chain fatty acids. *Mol Biochem Parasitol,* **105,** 273-279.

MULVENNA, J., HAMILTON, B., NAGARAJ, S. H., SMYTH, D., LOUKAS, A. and GORMAN, J. J. (2009). Proteomics analysis of the excretory/secretory component of the blood-feeding stage of the hookworm, Ancylostoma caninum. *Mol Cell Proteomics,* **8,** 109-121.

MUNFORD, R. S., SHEPPARD, P. O. and O'HARA, P. J. (1995). Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res,* **36,** 1653-1663.

MURRAY, J., GREGORY, W. F., GOMEZ-ESCOBAR, N., ATMADJA, A. K. and MAIZELS, R. M. (2001). Expression and immune recognition of Brugia malayi VAL-1, a homologue of vespid venom allergens and Ancylostoma secreted proteins. *Mol Biochem Parasitol,* **118,** 89-96.

MURRAY, L., GELDHOF, P., CLARK, D., KNOX, D. P. and BRITTON, C. (2007). Expression and purification of an active cysteine protease of Haemonchus contortus using Caenorhabditis elegans. *Int J Parasitol,* **37,** 1117-1125.

NAGARAJ, S. H., GASSER, R. B. and RANGANATHAN, S. (2008). Needles in the EST haystack: large-scale identification and analysis of excretory-secretory (ES) proteins in parasitic nematodes using expressed sequence tags (ESTs). *PLoS Negl Trop Dis,* **2,** e301.

NEWTON, S. E. and MEEUSEN, E. N. (2003). Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol,* **25,** 283-296.

NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. and VON HEIJNE, G. (1997). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst,* **8,** 581-599.

NIKAWA, T., ODAHARA, K., KOIZUMI, H., KIDO, Y., TESHIMA, S., ROKUTAN, K. and KISHI, K. (1999). Vitamin A prevents the decline in immunoglobulin A and Th2 cytokine levels in small intestinal mucosa of protein-malnourished mice. *J Nutr,* **129,** 934-941.

NISBET, A. J., REDMOND, D. L., MATTHEWS, J. B., WATKINS, C., YAGA, R., JONES, J. T., NATH, M. and KNOX, D. P. (2007). Stage-specific gene expression in Teladorsagia circumcincta (Nematoda: Strongylida) infective larvae and early parasitic stages. *Int J Parasitol.*

PATTHY, L. (1991). Homology of the precursor of pulmonary surfactant-associated protein SP-B with prosaposin and sulfated glycoprotein 1. *J Biol Chem,* **266,** 6035-6037.

PLOEGER, H. W. (2002). Dictyocaulus viviparus: re-emerging or never been away? *Trends Parasitol,* **18,** 329-332.

POPPI, D. P., SYKES, A. R. and DYNES, R. A. (1990). The effect of endoparasitism on host nutrition - the implications for nutrient manipulation. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production,* **50,** 237-243.

PRIOR, A., JONES, J. T., BLOK, V. C., BEAUCHAMP, J., MCDERMOTT, L., COOPER, A. and KENNEDY, M. W. (2001). A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode Globodera pallida: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. *Biochem J,* **356,** 387-394.

RALEIGH, J. M., BRANDON, M. R. and MEEUSEN, E. (1996). Stage-specific expression of surface molecules by the larval stages of Haemonchus contortus. *Parasite Immunol,* **18,** 125-132.

REINECKE RK, D. V. I., BRÜCKNER C. (1982). Studies on Haemonchus contortus. VI. Attempts to stimulate immunity to abomasal trichostrongylids in Merino sheep. *Onderstepoort J Vet Res,* **49,** 3-6.

RHOADS, M. L. and FETTERER, R. H. (1995). Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by Haemonchus contortus. *J Parasitol,* **81,** 505-512.

ROBERSON (1982). Antimetodal drugs in veterinary pharmacology and therapeutics. In *5 ed by Booth N and Mc Donald L* pp. 803-851.

ROOS, M. H., OTSEN, M., HOEKSTRA, R., VEENSTRA, J. G. and LENSTRA, J. A. (2004). Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode Haemonchus contortus. *Int J Parasitol,* **34,** 109-115.

ROSSANIGO, C. E. and GRUNER, L. (1991). Accuracy of two methods for counting eggs of sheep nematode parasites. *Vet Parasitol,* **39,** 115-121.

ROSSO, M. N., DUBRANA, M. P., CIMBOLINI, N., JAUBERT, S. and ABAD, P. (2005). Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins. *Mol Plant Microbe Interact,* **18,** 615-620.

ROTHEL, J. S., WOOD, P. R., SEOW, H. F. and LIGHTOWLERS, M. W. (1997). Urea/DTT solubilization of a recombinant Taenia ovis antigen, 45W, expressed as a GST fusion protein results in enhanced protective immune response to the 45W moiety. *Vaccine,* **15,** 469-472.

SASSER, J. N. F., D.W. (1987). A world perspective on nematology. *Vistas in nematology***,** 7-14.

SAVERWYNS, H., VISSER, A., VAN DURME, J., POWER, D., MORGADO, I., KENNEDY, M. W., KNOX, D. P., SCHYMKOWITZ, J., ROUSSEAU, F., GEVAERT, K., VERCRUYSSE, J., CLAEREBOUT, E. and GELDHOF, P. (2008). Analysis of the transthyretin-like (TTL) gene family in Ostertagia ostertagi - Comparison with other strongylid nematodes and Caenorhabditis elegans. *Int J Parasitol*.

SAYERS, G. and SWEENEY, T. (2005). Gastrointestinal nematode infection in sheep--a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Anim Health Res Rev,* **6,** 159-171.

SCHALLIG, H. D. (2000). Immunological responses of sheep to Haemonchus contortus. *Parasitology,* **120 Suppl,** S63-72.

SCHALLIG, H. D., MOYO, D. Z., HENDRIKX, W. M. and EYSKER, M. (1996). Bovine humoral immune responses to Haemonchus placei excretory secretory antigens. *Vet Parasitol,* **65,** 289-296.

SCHALLIG, H. D. and VAN LEEUWEN, M. A. (1997). Protective immunity to the blood-feeding nematode Haemonchus contortus induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology,* **114 ( Pt 3),** 293-299.

SCHALLIG, H. D., VAN LEEUWEN, M. A. and HENDRIKX, W. M. (1994). Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult Haemonchus contortus. *Parasitology,* **108 ( Pt 3),** 351-357.

SCHALLIG, H. D., VAN LEEUWEN, M. A. and HENDRIKX, W. M. (1995). Isotype-specific serum antibody responses of sheep to Haemonchus contortus antigens. *Vet Parasitol,* **56,** 149-162.

SCHALLIG, H. D., VAN LEEUWEN, M. A., VERSTREPEN, B. E. and CORNELISSEN, A. W. (1997). Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of Haemonchus contortus. *Mol Biochem Parasitol,* **88,** 203-213.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D. R. and DEAN, D. H. (1998). Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev,* **62,** 775-806.

SEMBA, R. D., MUHILAL, WARD, B. J., GRIFFIN, D. E., SCOTT, A. L., NATADISASTRA, G., WEST, K. P., JR. and SOMMER, A. (1993). Abnormal T-cell subset proportions in vitamin-A-deficient children. *Lancet,* **341,** 5-8.

SIDDIQUI, Z. A. and MAHMOOD, I. (1996). Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresource Technology,* **58,** 229-239.

SMITH, T. S., MUNN, E. A., GRAHAM, M., TAVERNOR, A. S. and GREENWOOD, C. A. (1993). Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against Haemonchus contortus. *Int J Parasitol,* **23,** 271-280.

SMITH, W. D. and ANGUS, K. W. (1980). Haemonchus contortus: attempts to immunise lambs with irradiated larvae. *Research in Veterinary Science,* **29,** 45-50.

SONNHAMMER, E. L. and DURBIN, R. (1997). Analysis of protein domain families in Caenorhabditis elegans. *Genomics,* **46,** 200-216.

STANKIEWICZ, M., HADAS, E., SHAW, R. and GREEN, R. (2000). Immunisation of lambs with drug-abbreviated Haemonchus contortus infections: protection against homologous and heterologous challenge. *Parasitol Res,* **86,** 758-761.

STEWART, D. (1948). A preliminary note on a complement fixation test to detect circulating antibodies in sheep infested with Haemonchus contortus and Trichostrongylus spp. *Aust Vet J,* **24**.

STOREY, D. M. (1982). Vitamin A deficiency and the development of Litomosoides carinii (Nematoda, Filarioidea) in cotton rats. *Z Parasitenkd,* **67,** 309-315.

STURCHLER, D., WYSS, F. and HANCK, A. (1981). Retinol, onchocerciasis and Onchocerca volvulus. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **75,** 617.

SWEETSER, D. A., BIRKENMEIER, E. H., KLISAK, I. J., ZOLLMAN, S., SPARKES, R. S., MOHANDAS, T., LUSIS, A. J. and GORDON, J. I. (1987). The human and rodent intestinal fatty acid binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships. *J Biol Chem,* **262,** 16060-16071.

TRAP, C. and BOIREAU, P. (2000). [Proteases in helminthic parasites.]. *Vet Res,* **31,** 461-471.

TREE, T. I., GILLESPIE, A. J., SHEPLEY, K. J., BLAXTER, M. L., TUAN, R. S. and BRADLEY, J. E. (1995). Characterisation of an immunodominant glycoprotein antigen of Onchocerca volvulus with homologues in other filarial nematodes and Caenorhabditis elegans. *Mol Biochem Parasitol,* **69,** 185-195.

URQUHART, G. M., JARRETT, W. F., JENNINGS, F. W., MCINTYRE, W. I., MULLIGAN, W. and SHARP, N. C. (1966). Immunity to Haemonchus contortus infection. Failure of x-irradiated larvae to immunize young lambs. *Am J Vet Res,* **27,** 1641-1643.

URWIN, P. E., LILLEY, C. J. and ATKINSON, H. J. (2002). Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Mol Plant Microbe Interact,* **15,** 747-752.

VEGLIA, F. (1916 ). The anatomy and life-history of Haemonchus contortus.

VERCAUTEREN, I., GELDHOF, P., PEELAERS, I., CLAEREBOUT, E., BERX, G. and VERCRUYSSE, J. (2003). Identification of excretory-secretory products of larval and adult Ostertagia ostertagi by immunoscreening of cDNA libraries. *Mol Biochem Parasitol,* **126,** 201-208.

VERVELDE, L., VAN LEEUWEN, M. A., KRUIDENIER, M., KOOYMAN, F. N., HUNTLEY, J. F., VAN DIE, I. and CORNELISSEN, A. W. (2002). Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of Haemonchus contortus. *Parasite Immunol,* **24,** 189-201.

VISSER, A., VAN ZEVEREN, A. M., MEYVIS, Y., PEELAERS, I., VAN DEN BROECK, W., GEVAERT, K., VERCRUYSSE, J., CLAEREBOUT, E. and GELDHOF, P. (2008). Gender-enriched transcription of activation associated secreted proteins in Ostertagia ostertagi. *Int J Parasitol,* **38,** 455-465.

VLASSOFF, A. and MCKENNA, P. B. (1994). Nematode parasites of economic importance in sheep in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology,* **21,** 1-8.

WALLER, P. J., KNOX, M. R. and FAEDO, M. (2001). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with Duddingtonia flagrans. *Veterinary Parasitology,* **102,** 321-330.

WALLER, P. J., RUDBY-MARTIN, L., LJUNGSTROM, B. L. and RYDZIK, A. (2004). The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Vet Parasitol,* **122,** 207-220.

WATSON, D. L. and GILL, H. S. (1991). Effect of weaning on antibody responses and nematode parasitism in Merino lambs. *Res Vet Sci,* **51,** 128-132.

WOJTCZAK, A., CODY, V., LUFT, J. R. and PANGBORN, W. (1996). Structures of human transthyretin complexed with thyroxine at 2.0 A resolution and 3',5'-dinitro-N-acetyl-L-thyronine at 2.2 A resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* **52,** 758-765.

YATSUDA, A. P., EYSKER, M., VIEIRA-BRESSAN, M. C. and DE VRIES, E. (2002). A family of activation associated secreted protein (ASP) homologues of Cooperia punctata. *Res Vet Sci,* **73,** 297-306.

YATSUDA, A. P., KRIJGSVELD, J., CORNELISSEN, A. W., HECK, A. J. and DE VRIES, E. (2003). Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite Haemonchus contortus reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J Biol Chem,* **278,** 16941-16951.

# Annexes

| | |
|---|---|
| eslip sl1 | GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGG(T)21VN |
| sl1 | GGTTTAATTACCCAAGTTTGAG |
| In | CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATA |
| Out | GCGAGCACAGAATTAATACGACT |
| Sl2 | GGTTTTAACCCAGTTACTAAG |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGG |
| SP6 | GATTTAGGTGACACTATA |
| M13F | CAGGAAACAGCTATGACC |
| M13R | GTAAAACGACGGCCAG |

**Annexe n°1 : Amorces utilisées pour le clonage des ADNc complets**

| | |
|---|---|
| P1 | 5’ctaatacgactcactatagggc 3’ |
| PN1F rsaI | 5’tcgagcggccgcccgggcag**gt** 3’ |
| PN2R rsaI | 5’agcgtggtcgcggccgag**gt** 3’ |
| A1 rsaI | 5’ctaatacgactcactatagggctcgagcggccgcccgggcag**gt** 3’ |
| Ad1F rsaI | 5’**ac**ctgcccgg 3’ |
| A2 rsaI | 5’ctaatacgactcactatagggcagcgtggtcgcggccgag**gt** 3’ |
| Ad2 rsaI | 5’**ac**ctcggccg 3’ |
| Pn1f aluI | 5’tcgagcggccgcccgggcag**ag** 3’ |
| Pn2r aluI | 5’agcgtggtcgcggccgag**ag** 3’ |
| Ad2 aluI | 5’**ct**ctcggccgcgacgct 3’ |
| A2 aluI | 5’ctaatacgactcactatagggcagcgtcgcggccgag**ag** 3’ |
| Ad1aluI | 5’**ct**ctgcccgggcggccgc 3’ |
| A1 aluI | 5’ctaatacgactcactatagggctcgagcggccgcccgggcag**ag** 3’ |
| Pcr oligo dT | 5’aagcagtacgacgatatccaacgag 3’ |
| oligodT | 5’aagcagtacgacgatatccaacgagctgagttttttttttttttttvn 3’ |

**Annexe n°2 : amorces utilisées lors de la réalisation de la technique SSH.**

| Nom | Amorce 5′→3′ | Nom | Amorce 5′→3′ |
|---|---|---|---|
| **Protéine ribosomale (témoin négatif)** | | | |
| PR f1 | GCTGCTCTCATCCTTCAGGAT | PR r1 | CTCCAGAAGACACCGACGTTA |
| PR f2 | AAAAGTGATGAGACGCCGGTAT | PR r2 | TGGTAGGTGGTACCACCTCTT |
| **GAPDH** | | | |
| GAPDHF | GTGTGAACCACGAGACCTACA | GAPDHR | TATCGTCCATGCTAGCTGGTT |
| **far-1** | | | |
| Hc-far-1 f1 | GGAGAAATCACCCGAACTTGGAT | Hc-far-1 r1 | ccatcctgacatctgtcttca |
| Hc-far-1 f2 | CAAGGCTCTGTCTGAGCCGGCTA | Hc-far-1 r2 | TCGTCCCTCTCCCACATCGCT |
| **ttl** | | | |
| Hc-ttl-1 f1 | GCCGTACCGACAGCAAAGGT | Hc-ttl-1 r1 | GTACTCCGATATCGAAAGTTCGT |
| **slp** | | | |
| Hc-slp-1 f1 | ATATGCCTACACTGAGCCGAT | Hc-slp-1 r1 | TTGTTCAAGGGCTTCCTTGAT |
| Hc-slp-1 r1 | TCTGCAAGGAAACCGTGGAT | Hc-slp-1 r2 | ttcttaccggacggcgacaaa |
| **lon-1** | | | |
| Hc-lon-1 f1 | CATAGCACTGTAGCGTTCAGA | Hc-lon-1 r1 | ACAGCAATTATTCCGATGCTA |
| Hc-lon-1 f2 | ACTACTATGTCAATCAACTGT | Hc-lon-1 r2 | TACTCGTCACTGGATCAGGAC |
| Tci-lon-1 f1 | TACCGTGTTTCCTTGTGGATT | Tci-lon-1 r1 | AAGGAACGTCGGCGAGAATAT |
| Tci-lon-1 f2 | CAAGCATTGCTGTGGTCACTA | Tci-lon-1 r2 | TCACGACATCTGGCGAAACCA |
| lon-1 fx1 | CTACAAGCAYTGCTGTGGTCA | lon-1 rx1 | CGTGTTTCCTTGTGGATTGTA |
| lon-1 fx2 | GTTCAGGTGGTMTGGGCAAAG | lon-1 rx2 | CTTTGCCCAKACCACCTGAAC |
| lon-1 fx3 | AATCCACAAGGAAACACGTA | lon-1 rx3 | TGACCACAGCARTGCTTGTAG |
| **Nim** | | | |
| Nim1 f1 | CAACACGGCAACCCAGAAATT | Nim1 r1 | CTGGTCCGTTCCAAAGAAGC |
| Nim2 f1 | TGGCAACGCTCTGCAGAAGTT | Nim2 r1 | CGATACAAGTGTTGGCGTTGC |
| **Cytochrome b5** | | | |
| Hccytochrome b5 f1 | ACTAGAAGTGGCTGGTCGAGA | Hccytochrome b5 r1 | CAATTGTTTGCATGATCACTTGA |
| **Lip-1** | | | |
| Hc-lip-f0 | TGCTCAGGATTCACAGCTGTA | Hc-lip-r0 | AATACAACCTTGGATTCCCCA |
| Hc-lip-f1 | ACATTGGAGGGACCTTGTGCC | Hc-lip-r1 | GCTGCAGTTTCCAACATCCATT |
| Hc-lip-f2 | GCTGCAGTTTCCAACATCCATT | Hc-lip-r2 | TCCGAGGTCTTCTATCAAGAT |
| Tci-Tcolipf1 | CCACTCGCAGCGGCTGCC | Tci-Tcolipr2 | TTTGGGTTACTGGACATTCCC |
| Tci-Tcolipf2 | AGTTTCAGAGGGACAGACTCG | Tci-Tcolipr2 | AGGACGATTTTAACACACTAA |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Lip-2** | | | |
| Hclip2f1 | CGTGCAGTTGGCTTCATGGCT | Hclip2r1 | AACTGGGAATGCTCACTTCTC |
| **Collagène** | | | |
| Colla f1 | GTCATGCAGAGCGAAGTCGAT | Colla r1 | ATGGTGCTGATGGTCAACCTG |
| **Hypothetical protein R02C2.7 (pssp-2)** | | | |
| R02C2.7 f1 | AGAGGCAAAGGAGCTTACTACGGC | R02C2.7 r1 | GTCAAATGACACACAAATGCAGCA |
| R02C2.7 f2 | GGATGTTGCTCCTCGAAGAGTCAG | R02C2.7 r2 | TATTGTGGCTGTGAATGCTGC |
| **Hypothetical protein T23F2.3** | | | |
| T23F2.3 f1 | TGGCACTTACCTGCACCGATT | T23F2.3r1 | CGATTAGCTCTGATTGGCGGA |
| **Hypothetical protein CBG 027559 (pssp-1)** | | | |
| CBG027559 f0 | TATGGCCGTGCATATGTCTCA | CBG027559 r0 | CTTGCCAAGAACCAAAGCGAT |
| CBG027559 f1 | CCAAGATGGAGTCAGCCAGAA | CBG027559 r1 | CCAAGATGGAGTCAGCCAGAA |
| CBG027559 f2 | ACGTTCGATACCTTAGCCTTC | CBG027559 r2 | ACCAAGTCCCTGCGAATGTAT |
| Univ CBG027559f1 | GACGGWGTSAACAATGTC | Univ CBG027559r1 | TRCCRGGKGTGCTGAGCATCT |
| **No homology Hc 1** | | | |
| Hc1 f1 | AGAATGGAGAATGGGCAAGTA | Hc1 r1 | AGAAATCACTCAGGCAGGGTT |
| Hc1 f2 | TCAGTGTCGAGATCTTCGAAA | Hc1 r2 | AGAATGGAGAATGGGCAAGTA |

**Annexe n°3 : amorces validées au cours des expérimentations de RT PCR et utilisées pour le clonage des ADNc complets.**

| Nom | Amorce 5’ | Nom | Amorce 3’ |
|---|---|---|---|
| **No homology (B4)** | | | |
| B4f1 | AGGGTTGCTATTTGGATGCGA | B4r1 | GACGTGAGTCGCGGACATCAA |
| **Hypothetical protein F53F4** | | | |
| F53F4f1 | TGAGGTGCTACTATGCTGTAT | F53F4 r1 | ACTGAACGGTTCACGACTTCTA |
| **TCTP** | | | |
| Tctp f1 | TATGAGTTCAAGGGAAGGCAT | Tctp r1 | ATCAAGGTGGGCACCTCTTCA |
| **Nadh déshydrogénase** | | | |
| Nadhf1 | AGTATCGTGGAACGCCGTCAA | Nadhr1 | ATGGTTACCCCAGTACTCTGG |
| **Ubiquitin** | | | |
| Ubif1 | ATCACCCTCCAGGACTACGAA | Ubir1 | GCTCAAGTCACTGCTGGTAAT |
| **Hypothetical protein F44ES.1 (F6)** | | | |
| F44ES.1f1 | TTTGTCGTGCTGCTCTTGCAA | F44ES.1r1 | TGTACGAGCCAGCGCATCATT |
| **Hypothetical protein CBG08576** | | | |
| CBG08576f1 | GAAGCAGGCCACATCACACAT | CBG08576r1 | TACCACCGTCACACAATGTGCT |
| **Hypothetical protein ZK1098.11** | | | |
| ZK1098.11 f1 | TTAGCAACGGTAGTCGAGCAA | ZK1098.11r1 | TACTGACACGCATGTGGCAGA |
| **Peroxisome** | | | |
| Pero f1 | CCAAGAGGCTCGAGCATCTAT | Pero r1 | TCCGCATCACGTTGAGTTAC |
| **GTP cyclohydrolase** | | | |
| GTP r1 | ACAAGAACGGTTAACTAAGCAGCA | GTP r1 | AGAGACTTCTCCGTCCATTCA |
| **Survival motor neurone (SMN)** | | | |
| SMN f1 | TCTGCTGACGATATTGTTCCT | SMN r1 | CTGATAGTATCCCGTATGGTA |
| **Actine** | | | |
| Actine f1 | GTCCCCATCTATGAGGGTTAT | Actine r1 | TCCTTACGGATATCGATATCGC |

**Annexe n°4 : amorces utilisées et non validées au cours des expérimentations de RT-PCR**

| Nom | Amorces 5’ | Nom | Amorces 3’ |
|---|---|---|---|
| Hc-far-1 f | catatgtccGCTCCGTTCACCAGCCTCGAG | Hc-far-1 r | gcggccgcGTTCTTGGCCAGCAACGTTTC |
| Hc-ttl f | catatgtccATCGGCCGACAACAAGCGGT | Hc-ttl-1 r | gcggccgcGATGAAGTCCCGTTCTTCTTT |
| Hc-slp-1 f | catatgtccGAGCCGATTCCACCTCAGTTC | Hc-slp-1 r | gcggccgcGCATGCTAGAATCTTTTTACA |
| Hc-lon-1 f | catatgtccTTTAGTGTTTCATCTCTGCAT | Hc-lon-1 r | gcggccgcGAATCCTGGATCGGATGAGCT |
| Hc-lfp-1 f | catatgtccTCACCAACTTCGAGCAATGTGA | Hc-lfp-1 r | gcggccgcCTGCGGTTCTGGGGAATCCAA |
| Hc-CBG027559 f | catatgtccGCTCCACCAATTGTACCAGAG | Hc-CBG027559 r | gcggccgcATAGACATAGACCCAATCACC |

**Annexe n°5 : Amorces utilisées pour la construction des protéines recombinantes.**

Les séquences soulignées correspondent au site d’enzyme de restriction.

Alexia Delannoy-Normand

# Recherche de gènes impliqués dans l'installation du strongle *Haemonchus contortus* par une approche transcriptomique


## Résumé

Parmi les nématodes gastro-intestinaux ayant un impact majeur sur la santé des ruminants *Haemonchus contortus* est l'espèce la plus pathogène. Actuellement, le contrôle des populations parasitaires repose sur les traitements anthelminthiques dont l'efficacité est limitée par l'émergence de parasites résistants. L'établissement de nouvelles stratégies de lutte (thérapeutiques ou vaccinales) repose actuellement sur l'identification de nouvelles cibles moléculaires. Ainsi, les gènes spécifiquement régulés lors de la phase précoce d'interaction du parasite *H. contortus* avec son hôte sont des cibles de choix. Afin d'identifier ces gènes, 4 banques d'*H. contortus* enrichies en ADNc spécifiquement exprimés au stade L4 (5 jours après infestation) ont été obtenues par la technique d'Hybridation Suppressive et Soustractive (SSH). Sur 400 clones criblés (dot-blot, RT-PCR), 51 clones d'intérêts ont été regroupés en 10 contigs. Les candidats possèdant un peptide signal de sécrétion ont fait l'objet d'une étude plus approfondie. Les homologues de ces candidats ont été recherchés chez les deux autres principales espèces de strongles gastro-intestinaux (*T. circumcincta* et *T. colubriformis*) dans le but d'évaluer leur polymorphisme. La production et la purification des protéines recombinantes correspondant à ces candidats a également été réalisée afin de tester leur éventuel pouvoir immunogène.



## Résumé en anglais

Gastro-intestinal nematodes such as *Haemonchus contortus* have a major impact on health of small ruminants world-wide. The control of infections remains largely based on anthelminthic treatments, but spreading of resistance has reduced their efficiency. An attractive solution would be the development of anti-nematode vaccines. Genes expressed during the early parasitic stage of *H. contortus* constituted our main targets. We have developed an approach based on SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) technique and generated 4 subtracted cDNA libraries of *H. contortus* enriched in cDNA specifically expressed during L4 stage (five days post infection). 400 clones were analyzed by dot-blot and 51 clones regrouped in 10 contigs. All contigs were validated by RT-PCR. Homologues of candidates possessing a signal peptide were searched in *T. colubriformis* and *T. circumcincta* to evaluate their polymorphism. Recombinant proteins of theses candidates were produced and purified in order to know if they have a good vaccine potential with cross protection against two major gastro-intestinal nematodes.